



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

NUEVAS APROXIMACIONES PARA EL
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE OVARIO

MARÍA OVEJERO SÁNCHEZ

2022



El Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y la Dra. Ana Belén Herrero Hernández, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Medicina de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Nuevas aproximaciones para el tratamiento del cáncer de ovario” que presenta la graduada en Biotecnología Dña. María Ovejero Sánchez, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal correspondiente, a fin de optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Salamanca, a 24 de mayo de 2022.

Dr. Rogelio González Sarmiento

Dra. Ana Belén Herrero Hernández

El presente trabajo ha sido financiado por los siguientes organismos:

- Instituto de Salud Carlos III mediante los proyectos FIS PI16/01920 y PI20/01569 cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León mediante el proyecto CSI264P20.

La doctoranda fue beneficiaria de un contrato de personal investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) (IBpredoc17/00010, 11 enero 2018).



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Rogelio González Sarmiento por confiar en mí desde el primer momento, animarme a embarcarme en esta aventura y permitirme trabajar a su lado todo este tiempo; por todos sus consejos y orientación y por sacar un rato entre su apretada agenda siempre que lo he necesitado. Por supuesto, agradecer también a la Dra. Ana Belén Herrero Hernández su dedicación, disponibilidad y apoyo durante estos años. Agradecer también sus consejos, no solo a nivel laboral sino a nivel personal. Ha sido un verdadero placer poder compartir este tiempo a su lado y aprender todo lo que he podido de ella. Muchas gracias a los dos por haberme guiado todo este tiempo.

Me gustaría agradecer también al Dr. Rafael Peláez y al Dr. Miguel Vicente Manzanares por abrirme las puertas de sus laboratorios, permitirme colaborar con ellos y con todo ello completar mi formación. Esto me ha permitido conocer a personas estupendas que me han ayudado y enseñado todo lo que han podido. Muchas gracias, Myriam y Gloria, por vuestro apoyo.

Mi siguiente agradecimiento es para todos mis compañeros de la Unidad de Medicina Molecular y del Laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer. Muchas gracias a todos, los que continuáis y los que habéis pasado por aquí, por haber compartido este tiempo conmigo. Gracias por la ayuda, el apoyo, los consejos, las risas, los viajes, los karaokes, las cenas y las fiestas. No habría sido igual sin vosotros. Sé que no solo me llevo compañeros de trabajo sino también amigos. En especial, gracias a Nuria, Diego, Carlos, Sergio y Pamela, por ese apoyo y confianza incondicional y por soportarme estos últimos meses de estrés y caos. No me puedo olvidar de agradecer a Javi y Vanessa, con quienes comencé esta aventura. Javi, muchísimas gracias por enseñarme a trabajar en equipo, por tus consejos, y por tu apoyo. Nieves, Marian, Estrella, Eva y Jessi, gracias por estar siempre ahí. También me gustaría agradecer a todas las personas de prácticas, TFGs y TFMs que han pasado por el laboratorio y con las que he compartido este tiempo, especialmente a Jorge y a Carmen por su implicación en este trabajo. Todos me habéis permitido aprender cómo trabajar en equipo y cómo enseñar o intentarlo, al menos.

Agradecer también a todas las personas que me han ayudado durante este tiempo del Centro de Investigación del Cáncer, especialmente al servicio de Microscopía y Citometría (Ana, Ángel, David y Sara), a Laura, Marisan y Jesús por su ayuda con los ratones y a Juan Luis, Alberto y Marina por su disposición y ayuda siempre que lo he necesitado. Gracias también al servicio de Oncología, de Ginecología y Obstetricia y de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca por su disposición y su ayuda siempre que ha sido necesaria. Me gustaría también agradecer a Moni, Eli, Cris y Vero por su apoyo, su ayuda y por recordarme la importancia de que la investigación sea traslacional. Ha sido un placer trabajar con vosotras.

Por supuesto, no podría olvidarme de agradecer a todos mis amigos, la familia que se elige, por estar en los buenos y malos momentos, por su apoyo, por soportarme y por recordarme que no todo en el mundo es ciencia.

Por último, gracias a mi familia por su amor y apoyo incondicional. En especial, gracias a mis padres por confiar en todo momento en mí y animarme en esta aventura, por estar en los buenos y los malos momentos, escucharme y tratar de ayudarme en todo momento.

ÍNDICES



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ABREVIATURAS.....	12
INTRODUCCIÓN	17
1. El ovario.....	17
2. El cáncer de ovario	19
2.1. Epidemiología del cáncer de ovario.....	19
2.2. Etiología del cáncer de ovario	20
2.2.1. Teoría de la ovulación incesante	21
2.2.2. Teoría de las trompas de Falopio	21
2.2.3. Teoría dualista	22
2.2.4. Otras teorías	23
2.3. Clasificación del cáncer de ovario	23
2.3.1. Tumores epiteliales de ovario en base al grado de diferenciación histológica	24
2.3.2. Tumores epiteliales de ovario en función del grado de malignidad	24
2.3.3. Tumores epiteliales de ovario en función de las características histológicas y moleculares.....	25
2.3.3.1. Carcinoma seroso	25
2.3.3.2. Carcinoma endometriode	26
2.3.3.3. Carcinoma de células claras	26
2.3.3.5. Carcinoma mucinoso.....	27
2.4. Estadificación del cáncer de ovario.....	28
2.5. Factores de riesgo en cáncer de ovario.....	30
2.5.1. Cáncer de ovario hereditario.....	30
2.5.2. Condiciones ginecológicas benignas	30
2.5.3. Fertilidad e infertilidad	31
2.5.4. Factores hormonales y terapia hormonal sustitutiva.....	31
2.5.5. Edad.....	32
2.5.6. Dieta y hábitos personales.....	32
2.5.7. Raza.....	32
2.6. Factores de protección en cáncer de ovario	33
2.7. Factores pronósticos del cáncer de ovario	34
2.7.1. Factores clínico-patológicos.....	34
2.7.2. Factores inmunológicos	35
2.7.3. Factores moleculares.....	35
2.8. Diagnóstico del cáncer de ovario.....	36
2.9. Caracterización molecular del cáncer de ovario.....	37
2.9.1. Alteraciones de las vías de reparación del DNA.....	38
2.9.1.1. Reparación del DNA por recombinación homóloga (HRR)	39
2.9.1.2. Reparación del DNA por la unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	40
2.9.2. Alteraciones de la vía de Wnt/ β -catenina	42
2.9.3. Alteraciones de la vía de MAPK/ERK	43
2.9.4. Alteraciones de la vía de PI3K/AKT/mTOR	44
2.9.5. Alteraciones de los receptores de la familia ErbB	46
2.9.6. Alteraciones de la autofagia.....	47
2.9.7. Alteraciones epigenéticas	49
2.9.7.1. Metilación del DNA.....	49
2.9.7.2. Acetilación de las histonas	49
2.9.7.3. ARID1A	51
2.10. Tratamiento del cáncer de ovario.....	51
2.10.1. Tratamiento convencional del carcinoma epitelial de ovario	51

2.10.1.1.	Tratamiento convencional en estadios I y II	52
2.10.1.2.	Tratamiento convencional en estadios III y IV.....	52
2.10.1.3.	Tratamiento convencional en enfermedad recurrente.....	53
2.10.1.4.	Tratamiento de mantenimiento.....	54
2.10.2.	Nuevas estrategias terapéuticas en carcinoma epitelial de ovario.....	54
2.10.2.1.	Terapias antiangiogénicas	54
2.10.2.2.	Inhibidores de PARP	55
2.10.2.3.	Inhibidores de las vías de reparación del DNA	56
2.10.2.4.	Inhibidores de tirosina quinasas de la familia de ErbB.....	57
2.10.2.5.	Inhibidores del receptor de folato	57
2.10.2.5.	Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR.....	58
2.10.2.6.	Inhibidores de la vía de señalización de Src	59
2.10.2.7.	Moduladores epigenéticos	59
2.10.2.8.	Inmunoterapia	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		63
MATERIAL Y MÉTODOS		65
1.	Líneas celulares	65
2.	Fármacos.....	66
3.	Ensayos de viabilidad celular	68
4.	Ensayos de ciclo celular	69
5.	Ensayos de apoptosis	69
6.	Análisis de la expresión de proteínas	70
6.1.	Extracción de proteínas	70
6.2.	Western blot.....	70
6.3.	Detección de α -tubulina acetilada mediante citometría de flujo.....	71
7.	Ensayos de detección de especies reactivas de oxígeno.....	73
8.	Ensayos funcionales de reparación por recombinación homóloga	73
9.	Ensayos funcionales de reparación mediante unión de extremos no homólogos....	74
10.	Ensayos de inmunofluorescencia	76
10.1.	Protocolo de inmunofluorescencia seguido de microscopia confocal.....	76
10.2.	Protocolo de inmunofluorescencia seguido de microscopia de campo amplio.....	76
11.	Generación de líneas celulares de ovario que expresan la luciferasa	78
12.	Modelo <i>xenograft</i> de cáncer de ovario	79
13.	Análisis estadístico	80
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		81
CAPÍTULO 1: Efecto de la combinación de cloroquina y Panobinostat en líneas celulares de cáncer de ovario		82
CAPÍTULO 2: Efecto de la combinación de cloroquina con inhibidores de la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).....		105
CAPÍTULO 3: Efecto de la combinación de Panobinostat con agentes desestabilizantes de microtúbulos		124
CONCLUSIONES		141
BIBLIOGRAFÍA		142
ANEXOS		160
ANEXO I		160
ANEXO II		174

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histología del ovario. En la figura se pueden ver el epitelio germinal, la túnica albugínea, la región medular y la región cortical que contiene los folículos ováricos. Imagen adaptada de referencia ⁵	17
Figura 2. Número estimado de casos nuevos y muertes por cáncer en mujeres en España. Adaptado de GLOBOCAN 2020.....	20
Figura 3. Esquema en el que se representa la teoría dualista de origen de cáncer de ovario. Imagen adaptada de referencia ²⁷	22
Figura 4. Tinción hematoxilina-eosina de los cinco subtipos principales de cáncer de ovario. (A) Carcinoma seroso de alto grado, (B) carcinoma seroso de bajo grado, (C) carcinoma de células claras, (D) carcinoma mucinoso y (E) carcinoma endometrioide. Imagen adaptada de referencia ⁴⁶	25
Figura 5. Principales causas del daño en el DNA y daño generado en el mismo. Creado con la herramienta Biorender.....	38
Figura 6. Esquema del proceso de reparación por recombinación homóloga, en el que se resumen las fases de este y las principales proteínas implicadas en el mismo. Adaptado de referencia ¹⁰³	40
Figura 7. Esquema que resume el proceso de reparación del DNA por NHEJ, y las principales proteínas implicadas en el mismo. Adaptado de referencia ¹⁰⁴	41
Figura 8. Esquema de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Creado con la herramienta Biorender.....	42
Figura 9. Esquema de la vía de señalización de MAPK. Creado con la herramienta Biorender.....	44
Figura 10. Esquema del proceso de autofagia. Adaptado de referencia ¹²⁴	48
Figura 11. Cassette reportero de HRR integrado en las distintas líneas celulares tumorales. Adaptado de referencia ¹⁵³	74
Figura 12. (A) Mapa del plásmido pEGFP-Pem-Ad2. (B) Cassette reportero de NHEJ integrado en las distintas líneas celulares tumorales. Adaptada de referencia ^{153,157}	75
Figura 13. Esquema del vector lentiviral pLenti CMV Puro LUC (w168-1). Fuente: addgene.....	78
Figura 15. Efecto de la cloroquina en el ciclo celular. Panel superior: ciclo celular tras el tratamiento con CQ (50 μ M) durante 72h. Panel medio: distribución de ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas comparando las células tratadas con 50 μ M de CQ con las no tratadas excluyendo la población sub-G0. Panel inferior: porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con 50 μ M de CQ. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).....	83
Figura 14. Efecto de la cloroquina en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de CQ indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.	83
Figura 16. Efecto de la cloroquina en la supervivencia celular. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de CQ indicadas y posteriormente se marcaron con yoduro de propidio y anexina V. Se muestran dot plots en los que se observa el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas) y necróticas (PI positivas). La supervivencia celular tras los tratamientos se muestra en el gráfico de la derecha donde	

los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.....84

Figura 17. Efecto de la cloroquina en el proceso de autofagia. (A) Niveles de las proteínas de autofagia después del tratamiento con 25 o 50 μM de CQ durante 24, 48 o 72 horas. Los niveles de β -actina se emplearon como control de carga. Los valores se normalizaron con los correspondientes a 0h que se tomaron como 100. (B) Inmunofluorescencia de LC3B después del tratamiento durante 72h con 25 μM de CQ.84

Figura 18. Efecto del Panobinostat en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de LBH indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.85

Figura 19. Efecto del LBH en el ciclo celular. Panel superior: porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de LBH. Panel inferior: porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con 50 nM de LBH. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).85

Figura 20. Efecto del Panobinostat en la supervivencia celular. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de LBH indicadas y se marcaron con yoduro de propidio y anexina V. Se muestran dot plots en los que se observa el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas) y necróticas (PI positivas). La supervivencia celular tras los tratamientos se muestra en el gráfico de la derecha donde los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.86

Figura 21. Efecto del Panobinostat en el proceso de autofagia. Se muestran los niveles de expresión de las proteínas de autofagia después del tratamiento con 25 o 50 nM de LBH durante 24, 48 o 72 horas. Los niveles de β -actina se emplearon como control de carga. Los valores se normalizaron con los correspondientes a 0h que se tomaron como 100.86

Figura 22. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y Panobinostat. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa, fracción de células muertas) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.88

Figura 23. Generación de ROS después del tratamiento con CQ y LBH y efecto en la letalidad generada por el tratamiento combinado. (A) Panel superior: figura representativa de la producción de ROS tras 15 minutos de tratamiento con las dosis indicadas de CQ (μM) y como se evita esta generación con la adición de NAC (mM). Panel medio: generación de ROS con los distintos tratamientos indicados de 15 minutos. Panel inferior: producción de ROS con los distintos tratamientos indicados de 24h. En todos los casos, se empleó como control células tratadas durante 15 minutos con H_2O_2 (1 mM). (B) Supervivencia celular tras 72h de tratamiento con las distintas dosis indicadas. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05).89

Figura 24. El tratamiento con cloroquina induce roturas de doble cadena que se evitan con la adición de NAC. (A) Los focos de γH2AX se visualizaron por microscopia confocal y (B) el porcentaje de células con más de cinco focos de γH2AX tras 48h (A2780,

OVCAR-8) o 72h (IGROV-1, SK-OV-3) de tratamiento con 25 μ M de CQ o CQ y NAC. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos 50 células por condición y línea celular y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,001; *p < 0,01; *p < 0,05).....90

Figura 25. El tratamiento con Panobinostat induce roturas de doble cadena que no se evitan con la adición de NAC. (A) Los focos de γ H2AX se visualizaron por microscopia confocal y (B) el porcentaje de células con más de cinco focos de γ H2AX tras 48h (A2780, OVCAR-8) o 72h (IGROV-1, SK-OV-3) de tratamiento con 25 nM de LBH o LBH y NAC. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos 50 células por condición y línea celular y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,001; *p < 0,01; *p < 0,05).91

Figura 26. El Panobinostat inhibe la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga. (A) Las líneas celulares reporteras fueron pretratadas o no con LBH 24h y después transfectadas o no (ST) con 5 μ g de un plásmido que codifica la endonucleasa I-SceI y 0,5 μ g de pDsRed2-N1. Las células se incubaron de nuevo con LBH otras 72h. (B) Eficiencia de HRR calculada como el ratio de células verdes entre células rojas. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).92

Figura 27. Efecto del Panobinostat en el correcto reclutamiento de la proteína Rad51 a las roturas de doble cadena del DNA. Inmunofluorescencia de las líneas OVCAR-8 y SK-OV-3 tratadas con 25 μ M de CQ, 25 nM de LBH o ambos y las células se marcan con DAPI (núcleos), Rad51 (rojo) y γ H2AX (verde).....93

Figura 28. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con mirin/cloroquina y Panobinostat/bafilomicina A1. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.95

Figura 29. Efecto de los inhibidores respuesta al daño en el DNA en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de (A) KU-55933 o (B) VE-821 indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.....96

Figura 30. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina/VE-821 y cloroquina/KU-55933. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y VE-821/KU-55933 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.97

Figura 31. Efecto del cisplatino en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de cisplatino indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.98

Figura 32. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y cisplatino. Las células se trataron durante 72h con LBH y Panobinostat a las dosis indicadas y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.....99

Figura 33. (A) Panel izquierdo: niveles de las proteínas Ku70 y Ku80 después del tratamiento con 50 nM de LBH durante 24, 48 o 72 horas. Panel derecho: niveles de expresión de Ku70 y Ku80 tras 24 h de tratamiento con LBH (20 nM). Los niveles de β -actina se emplearon como control de carga. (B) Porcentaje de NHEJ empleando el plásmido digerido con las enzimas HindIII o I-SceI en las líneas IGROV-1 y SK-OV-3. Las células se pretrataron o no con las dosis de LBH o NU-7026 indicadas, se transfectaron con el plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 linealizado o el plásmido circular pEGFP-Pem1 junto con el plásmido rojo pDsRedN1 y se volvieron a tratar con las mismas dosis de LBH o NU-7026 durante 72 horas. El porcentaje se calculó tal y como se indica en material y métodos. (C) Dot plots de las células sin transfectar con el cassette integrado (SK-OV-3-NHEJ, IGROV-1-NHEJ) y transfectadas con 5 μ g de un plásmido que codifica para la endonucleasa I-SceI y 0,5 μ g de pDsRedN1 tras el pretratamiento de 24h con LBH o NU-7026. Estas últimas se incubaron en la presencia o ausencia de LBH o NU-7026 72 horas después de la transfección. La eficiencia de NHEJ se calculó como la proporción de células verdes entre células rojas. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).107

Figura 34. El daño en el DNA generado por la CQ se repara por NHEJ. Las líneas celulares SK-OV-3 y OVCAR-8 se trataron durante 24h con 25 μ M de CQ. El tratamiento se eliminó y las células se trataron o no con inhibidores de NHEJ durante 48h. Además, se trataron solo con estos inhibidores. (A) Focos de γ H2AX (verde) detectados mediante microscopía confocal. (B) Porcentaje de células con γ H2AX (>5 focos/célula). Los datos representados corresponden a la media de al menos 50 células por línea y condición.108

Figura 35. Efecto de los inhibidores de NHEJ en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de (A) KU-57788, (B) NU-7026 y (C) SCR7 pirazina indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.109

Figura 36. Efecto del inhibidor KU-57788 en el ciclo celular. (A) Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de KU-57788 (B) Porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con KU-57788. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).110

Figura 37. Efecto del inhibidor NU-7026 en el ciclo celular. (A) porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de NU-7026. (B) Porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con NU-7026. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).111

Figura 38. Efecto del inhibidor SCR7 pirazina en el ciclo celular. (A) Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de SCR7. (B) Porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con SCR7 pirazina. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).112

- Figura 39.** Efecto de los inhibidores de NHEJ en la supervivencia celular. Porcentaje de células vivas tras el tratamiento con KU-57788 (5, 7,5 y 10 μ M) y con NU-7026 (40, 60 y 80 μ M). Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).112
- Figura 40.** Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y KU-57788. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y KU-57788 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.114
- Figura 41.** Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y NU-7026. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y NU-7026 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.115
- Figura 42.** Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y SCR7 pirazina. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y SCR7 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.116
- Figura 43.** La citotoxicidad del tratamiento con CQ/NHEJi depende de la producción de ROS. (A) Las células fueron tratadas durante 72 horas con las concentraciones indicadas de CQ (μ M), KU-57788 (μ M) o (B) NU-7026 y el antioxidante NAC (mM) y el porcentaje de células apoptóticas se midió marcando con anexina V y yoduro de propidio por citometría de flujo. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).117
- Figura 44.** La triple combinación CQ-LBH-NHEJi ejerce un efecto sinérgico más potente que las combinaciones dobles. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ, LBH y KU-57788/NU-7026 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.118
- Figura 45.** Bioluminiscencia de las líneas celulares con/sin luciferasa en presencia de luciferina. Se midió la bioluminiscencia de las líneas celulares indicadas en ausencia de luciferina (gris), una vez medida se añadió luciferina y se volvió a medir (azul). Los valores de bioluminiscencia se muestran en escala logarítmica.119
- Figura 46.** Bioluminiscencia de los tumores del modelo xenograft de cáncer de ovario. En el panel superior se muestran imágenes representativas de los cuatro grupos de ratones de estudio al inicio del tratamiento mientras que en el panel inferior se muestran imágenes representativas tras 9 días de tratamiento. Para ambos casos, se inyectó luciferina en los animales por vía intraperitoneal y tras 10 minutos, previa anestesia de los animales, se obtuvo la imagen en el equipo de bioluminiscencia Xenogen IVIS® Spectrum In Vivo Imaging System.....120
- Figura 47.** Evolución del tamaño tumoral a lo largo del tratamiento y peso final de los tumores. (A) Tamaño medio de los tumores a los distintos días de tratamiento. (B) Violin plot en el que se muestra la distribución del peso de los tumores al final del tratamiento, en el que aparece marcada la mediana de cada grupo y los cuartiles.120
- Figura 48.** Estructura química de los agentes desestabilizantes de microtúbulos empleados en este trabajo. (A) Estructura química de la combretastatina A4 y la sulfonamida ABT-751 a partir de la cual se diseñaron los compuestos MDS y de los

compuestos 38, 42 y 45. Adaptado de referencia¹⁵⁵. (B) Estructura química de la combretastatina A4 y la isocombretastatina PILA9. Realizado con el editor JSME Molecular Editor.....125

Figura 49. Efecto de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos en las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de (A) 38, (B) 42, (C) 45 y (C) PILA9 indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.....126

Figura 50. Efecto del paclitaxel en las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de paclitaxel indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.....127

Figura 51. Efecto de los compuestos MDS en el ciclo celular y en la supervivencia celular de la línea celular SK-OV-3. (A) Panel superior: Distribución de ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas comparando las células tratadas con 38 (600 nM), 42 (50 nM) o 45 (400 nM) con las no tratadas excluyendo la población sub-G0. Panel inferior: porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con los compuestos MDS. (B) Porcentaje de células vivas tras el tratamiento con 38 (400 nM), 42 (50 nM) y 45 (600 nM). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).....127

Figura 52. Efecto del compuesto PILA9 en el ciclo celular y en la supervivencia celular. (A) Panel superior: perfiles de ciclo celular con o sin el tratamiento con P9 a las dosis indicadas durante 72h. Panel medio: Distribución de ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas comparando las células tratadas con P9 con las no tratadas excluyendo la población sub-G0. Panel inferior: porcentaje de células muertas tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con P9. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05). (B) Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis indicadas del fármaco y tras el marcaje con yoduro de propidio y anexina V se obtuvieron los distintos dot plots en los que se observa el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas) y necróticas (PI positivas).....128

Figura 54. Efecto de los compuestos MDS en la α -tubulina de la línea celular SK-OV-3. Mediante microscopia confocal se observa en la α -tubulina en verde y los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul) de las células sin tratar y tratadas 72 horas con los compuestos 38 (600 nM), 42 (50 nM) y 45 (400 nM).....129

Figura 53. Efecto del compuesto PILA9 en la α -tubulina. (A) La línea A2780 se trató con 1,75 nM del compuesto y (B) la línea SK-OV-3 fue tratada con 7,5 nM del compuesto durante 24 horas. Mediante microscopia de inmunofluorescencia se observa la α -tubulina en verde y la actina marcada en rojo de las células sin tratar y las tratadas con PILA9. Escala: 10 μ m.129

Figura 55. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto 38. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.....130

Figura 56. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto 42. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el

porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.....131

Figura 57. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto 45. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.....132

Figura 58. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto PILA9. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.....133

Figura 59. Efecto del Panobinostat en la acetilación de la α -tubulina. Se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada y la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100.....134

Figura 60. Efecto de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos en la acetilación de la α -tubulina. Las células se trataron con dosis crecientes de (A) 38 y (B) P9 y los niveles de α -tubulina total y acetilada y la proporción de α -tubulina acetilada se muestran. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100.135

Figura 61. La combinación de Panobinostat y el compuesto 38 induce una gran acetilación de la α -tubulina. Las líneas celulares (A) A2780, (B) OVCAR-8 y (C) SK-OV-3 se trataron con Panobinostat (20 nM) y el compuesto 38 a las dosis indicadas durante 24 horas. En la parte superior de los paneles se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada por western blot (izquierda) y citometría de flujo (derecha) y la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100. En la parte inferior de los paneles se observa mediante microscopia de inmunofluorescencia la α -tubulina acetilada marcada en verde, la actina marcada en rojo y los núcleos marcados en azul de las células sin tratar y las tratadas con los distintos compuestos. Escala: 10 μ m.....136

Figura 62. La combinación de Panobinostat y los compuestos 42 y 45 induce una gran acetilación de la α -tubulina. (A) Las líneas celulares A2780, OVCAR-8 y SK-OV-3 se trataron con Panobinostat y los compuestos 42/45 a las dosis indicadas durante 24 horas. En la parte superior de los paneles se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada por western blot y en la parte inferior la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100. (B) Imágenes representativas obtenidas por microscopia de inmunofluorescencia en las que se observa la α -tubulina acetilada en verde, la actina en rojo y los núcleos en azul de las células sin tratar y las tratadas con los distintos compuestos. Escala: 10 μ m.....137

Figura 63. La combinación de Panobinostat y PILA9 una gran acetilación de la α -tubulina. (A) Las líneas celulares de cáncer de ovario se trataron con LBH y PILA9 a las

dosis indicadas durante 24 horas. Se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada por western blot y la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100. (B) Imágenes representativas obtenidas por microscopia de inmunofluorescencia en las que se observa la α -tubulina acetilada en verde y la actina en rojo de las células sin tratar y las tratadas con los distintos compuestos. Escala: 10 μ m.....138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las características clínicas y moleculares de los distintos tipos de cáncer de ovario epitelial. Adaptada de referencias ^{45,49}	28
Tabla 2. Estadificación del cáncer de ovario en base al sistema TNM. Adaptada de referencia ⁵⁰	29
Tabla 3. Información de las líneas celulares de cáncer de ovario empleadas en el trabajo.	65
Tabla 4. Información de las líneas celulares JJN3 y HEK293T empleadas en el trabajo.	66
Tabla 5. Fármacos empleados, mecanismo de acción y efecto de éstos a nivel celular.	67
Tabla 6. Fármacos y concentración a la que se realizaron los ensayos de viabilidad celular.....	68
Tabla 7. Anticuerpos empleados en este trabajo para western blot	72
Tabla 8. Anticuerpos empleados para los ensayos de inmunofluorescencia.	77

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

#

4EBP1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1

A

A-RAF: A-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

ADP: Adenosín difosfato

AJCC: American Joint Committee of Cancer

AKT: AKT Serine/Threonine Kinase

AMBRA1: Autophagy And Beclin 1 Regulator 1

AMPS: persulfato de amonio

AMPK: Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 2

APE1: Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1

APC: Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor

ARID: AT- Rich Interaction Domain

ARID1A: AT-Rich Interaction Domain 1A

ATCC: American Type Culture Collection

ATM: ATM Serine/Threonine Kinase

ATG3/4/5/7/9/10/12/14L/16L1: Autophagy Related 3/4/5/7/9/10/12/14/16 Like 1

ATP: Adenosín trifosfato

ATP7A/B: ATPase Copper Transporting Alpha/Beta

ATR: ATR Serine/Threonine Kinase

AXIN1/2: Axis Inhibition Protein 1/2

B

Baf: Bafilomicina A1

BARD1: BRCA1 Associated RING Domain 1

Bcl-2: BCL2 Apoptosis Regulator

BER: Base Excision Repair/ Reparación por escisión de bases

BRAF: B-raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

BRIP1: BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1

BRCA1/2: BRCA1/2 DNA repair associated

BSA: Bovine Serum Albumin/Albúmina Sérica Bovina

C

C-: Control negativo, células sin tratar

C-RAF: Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

CA 125: Cancer antigen 125

CA 19-9: Carbohydrate antigen 19-9

CCNE1: Cyclin E1

CD3: Cluster of Differentiation 3

CD28: Cluster of Differentiation 28

CDH1: Cadherin 1

CDK12: Cyclin Dependent Kinase 12

CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

CEA: Carcinoembryonic antigen/Antígeno carcinoembrionario

CHEK1/2: Checkpoint kinase 1/2

CI: Índice de combinación
 CK1: Casein Kinase 1
 CO: Cáncer de ovario
 CQ: Cloroquina
 CSMD3: CUB And Sushi Multiple Domains 3
 CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4
 CTNNB1: Catenin (Cadherin-associated protein) beta 1

D

DAPI: Dihidroclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
 DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceina diacetato
 dH₂O: agua destilada
 DKK1/2: Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1/2
 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 DMSO: Dimetilsulfóxido
 DNA: Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucleico
 DNA-PK: DNA-dependent Protein Kinase/ Quinasas dependientes de DNA
 DRAM2: DNA Damage Regulated Autophagy Modulator/2
 DSB: Double Strand DNA Break/Rotura de cadena doble del DNA
 DSMZ: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures GmbH

E

ECACC: European Collection of Authenticated Cells Cultures
 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
 EGF: Epidermal Growth Factor
 EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor/Receptor del factor de crecimiento epithelial
 EGTA: Ácido egtazico
 EMSY: EMSY Transcriptional Repressor, BRCA2 Interacting
 ErbB: Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene
 ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase
 ERK1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2

F

Fa: Fracción alterada (Fracción de células muertas)
 FAT3: FAT Atypical Cadherin 3
 FBS: Suero fetal bovino
 FBXW7: F-Box and WD repeat containing protein 7
 FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
 FOXA2: Forkhead Box A2
 FSH: Hormona estimulante de folículos

G

G418: Geneticina
 GABRA6: Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha6
 GFP: Green Fluorescent Protein
 GnHR: Hormona liberadora de gonadotropina
 GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
 GSK3B: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

H

HDAC: Histona deacetilasa
HDACi: Inhibidor de histona deacetilasa
HLA: Human Leukocyte Antigen/Antígenos leucocitarios humanos
HR: Homologous Recombination/ Recombinación homóloga
HRR: Homologous Recombination Repair/Reparación por recombinación homóloga
HE4: Human epididymis protein 4/Proteína del epidídimo humana 4
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
HER2/Neu: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3/4: Human Epidermal Growth Factor Receptor 3/4
Het: Mutación heterocigota
HGSC: High Grade Serous Carcinoma/Carcinoma seroso de alto grado
HNF1-β: Hepatocyte Nuclear Factor 1-Beta
Hom: Mutación homocigota

I

IC50: Concentración inhibitoria 50
IGFBP-4: Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4
INPP4B: Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type II B
iPARP: PARP inhibitors/Inhibidores de PARP

K

KRAS: KRAS Proto-Oncogene, GTPase
KU: KU-57788
Ku70: ATP-Dependent DNA Helicase 2 Subunit 1
Ku80: ATP-Dependent DNA Helicase 2 Subunit 2

L

LAMP1/2: Lysosomal Associated Membrane Protein 1/2
LBH: Panobinostat (Farydak®) o LBH589
LC3B: Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta
LGSC: Low Grade Serous Carcinoma/Carcinoma seroso de bajo grado
LH: Hormona luteinizante
LPR5/6: LDL Receptor Related Protein 5/6

M

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MDS: Microtubule Destabilizing Sulfonamides/ Sulfonamidas desestabilizantes de microtúbulos
MDR1: Multidrug Resistance Protein 1
MEK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MEK1/2: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2
MET: Tyrosine-Protein Kinase Met
MGMT: O⁶-metilguanina DNA metiltransferasa
MLH1: MutL Homolog 1
MMR: Mismatch Repair/Reparación por apareamiento erróneo
MRE11A: MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
MSH2/3/6: MutS Homolog 2/3/6

MTOR: Mammalian Target Of Rapamycin
MTORC1/2: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MYC: MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor

N

NAC: N-Acetil-L-cisteína
NAD⁺/NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NER: Nucleotide Excision Repair/Reparación por escisión de nucleótidos
NF1: Neurofibromatosis-Related Protein NF-1
NHEJ: Non-Homologous End Joining/Reparación por unión de extremos no homólogos
Nsb1: Nijmegen Breakage Syndrome 1/Nibrin
NU: NU-7026

O

OMS: Organización Mundial de la Salud
OGG1: 8-Oxoguanine DNA Glycoxylase

P

P21: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1
P9: compuesto PILA9
PALB2: Partner and Localizer of BRCA2
PARP: Poly(ADP-Ribose) polimerase/Poli(ADP-Ribosa) polimerasa
PAX8: Paired Box 8
PBS: Phosphate-Buffered Saline/Tampón fosfato salino
PBSst: PBS *staining*
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD-1: Programmed Death cell protein 1
PD-L1: Ligando de PD-1
PDK1: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PE: fosfatidiletalonamina
PEG400: Polietilenglicol 400
PI: propidium iodide/ yoduro de propidio
PI3K: Fospatidylinositol 3-kinase
PIK3CA: Fospatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PIPES: Piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico)
PMS2: PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
PP2A: Protein Phosphatase 2A
PPP2R1A: Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha
PTEN: Phospatase And Tensin Homolog
PVDF: Fluoruro de polivinilideno

R

RAD50: RAD50 Double Strand Break Repair protein
RAD51C/RAD51D: RAD51 Recombinase paralog C/RAD51 paralog D
Raf: RAF serine/threonine-specific protein kinases
Ras: Ras small GTPases

ABREVIATURAS

RB1: RB Transcriptional Corepressor 1
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RPA: Replication Protein A

S

SCR7: SCR7 pyrazine/ SCR7 pirazina
SDS: Sodium-Dodecylsulfate/ Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SHP-2: Src homology region 2 (SH2)-containing protein tyrosine phosphatase 2
SMAD4: SMAD Family Member 4
SSB: Single Strand DNA Break/ Rotura de cadena sencilla del DNA
SWI/SNF: Switch/Sucrose Non-Fermentable

T

TBS: Tris-Buffered Saline/ Solución salina tamponada con Tris
TBS-T: Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween® 20 Detergent/ Solución salina tamponada con Tris con el 0,1% del detergente Tween® 20
TEMED: Tetrametiletilendiamina
TGF: Transforming Growth Factor
TGFBR2: Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TGF- β : Transforming Growth Factor Beta
TSH: Terapia hormonal sustitutiva
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TP53: Tumor Protein 53
TSC2: TSC Complex Subunit 2

U

ULK1: Serine/Threonine-protein kinase ULK1

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor/Factor de crecimiento endotelial vascular
VMP1: Vacuole Membrane Protein 1
VPS15: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 4/ *PIK3R4*
VPS34: Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3/ *PIK3C3*

W

WEE1: WEE1 G2 Checkpoint Kinase
WES: Whole Exome Sequencing/Secuenciación del exoma completo
WT1: Wilms Tumor 1 Transcription Factor
WNT1/5A/7A: Wnt Family Member 1/5A/7A
WGS: Whole Genome Sequencing/Secuenciación del genoma completo

X

XLF: XRCC4-Like Factor
XRCC1/4: X-Ray Repair Cross Complementing 1/4

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. El ovario

Los ovarios son órganos sexuales femeninos internos al igual que la vagina, el útero y las trompas de Falopio. Presentan forma ovoide y se localizan en la pelvis menor, próximos a la cavidad abdominal, a ambos lados del útero, suspendidos por varios ligamentos (el ligamento mesovárico, el ligamento suspensorio del ovario y el ligamento útero-ovárico). Los ovarios presentan dos funciones principales que son: la producción de hormonas y la de los gametos femeninos¹⁻⁴.

El ovario está formado por el epitelio germinal, la túnica albugínea, la corteza y la médula (**Figura 1**). El epitelio germinal se encuentra en la capa exterior, recubriendo al ovario y se trata de un epitelio cúbico simple. Bajo esta capa, se encuentra la túnica albugínea que es una capa de tejido conectivo formado por células fusiformes. A continuación, se encuentra la corteza que contiene los folículos ováricos en cuyo interior se encuentran los oocitos en los distintos estadios de maduración. La región más interna del ovario es la médula (también denominada hilio) que está compuesta por tejido conectivo laxo y contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios^{1,2,5}.

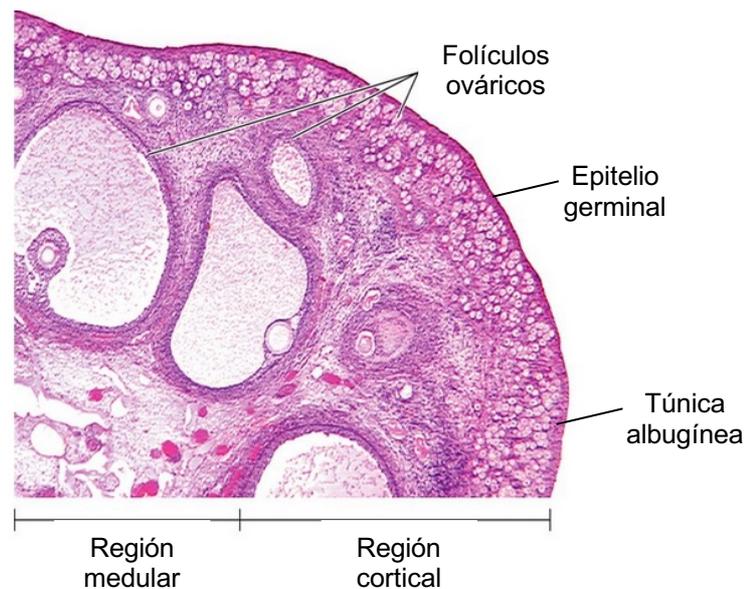


Figura 1. Histología del ovario. En la figura se pueden ver el epitelio germinal, la túnica albugínea, la región medular y la región cortical que contiene los folículos ováricos. Imagen adaptada de referencia⁵.

Durante la embriogénesis, los ovarios se originan a partir del mesodermo intermedio. En primer lugar, el ovario se diferencia a la médula y presenta una capa de epitelio germinal sobre su superficie. En cuanto a los folículos ováricos, éstos se originan alrededor de la cuarta semana de embarazo cuando las células germinales primordiales, que se encuentran en el endodermo dorsal del saco vitelino, migran a través del intestino posterior y luego por la cresta gonadal hasta los ovarios. Durante esta migración, estas oogonias van madurando y multiplicándose, hasta el quinto mes cuando cesa la división, para acabar dando lugar a los oocitos primarios (células precursoras de los óvulos). En el séptimo mes de la gestación, estos oocitos primarios entran en meiosis e inician la profase I de la primera división meiótica rodeados por una capa de tejido conectivo, que

se convertirá en las células de la granulosa o folículo. Estos oocitos primarios detienen la división meiótica en el diploteno I y permanecen parados en esta fase hasta que se alcanza la pubertad^{1,6}. Cuando se alcanza la pubertad, en ausencia de gestación, la mujer sufrirá una serie de cambios cíclicos en su útero y los ovarios. Estos ciclos tienen una duración de unos 28 días (ciclos menstruales) y conducirán a la formación y el desarrollo de gametos femeninos maduros y a la preparación del útero para recibir el óvulo fecundado. Todo este proceso está regulado por distintas hormonas y se pueden distinguir cuatro fases:

- **Fase menstrual:** se inicia en el día uno del ciclo menstrual y comienza con el desprendimiento del endometrio. En esta fase, el revestimiento endometrial del útero, que se desarrolló en el ciclo anterior, se vierte a través de la vagina junto con una pequeña cantidad de sangre. Este sangrado tiene una duración de entre 4 y 7 días³.
- **Fase folicular:** durante esta fase se produce la maduración del folículo en el ovario gracias a la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnHR), que estimula la síntesis de estrógeno, regulada por la hormona estimulante de folículos (FSH), dentro del folículo en desarrollo. La secreción de estrógenos por el folículo tiene a su vez efectos sobre el endometrio que comienza a proliferar y a desarrollar una red vascular a su alrededor³.
- **Fase ovulatoria:** al final de la fase anterior se produce un pico en la secreción de hormona luteinizante (LH), dicho pico coincide con el momento en el que el folículo se encuentra presionando la pared del ovario. En este momento se bloquea la producción de estrógenos y gracias a la acción de la LH se estimula la liberación de prostaglandinas y citoquinas inflamatorias que provocan la rotura de las células estromales, de la lámina basal que rodea el folículo y del epitelio germinal del ovario liberándose el oocito del folículo a las fimbrias de la trompa de Falopio. Asimismo, todos estos cambios conducen a la secreción de progesterona por parte de las células de la granulosa y a la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo vacío³.
- **Fase luteal:** tras la ovulación, el óvulo se libera del folículo y se forma el cuerpo lúteo. En ausencia de fecundación, el cuerpo lúteo degenera a los 14 días y se detiene la producción de progesterona. Esta parada conduce a la rotura del endometrio y al inicio de la menstruación³.

Los ovarios, como se ha comentado previamente, son los encargados de la secreción de distintas hormonas entre las que se incluyen hormonas esteroideas (estrógenos, andrógenos y progesterona) y péptidos (inhibina, activina y relaxina). La producción de las hormonas esteroideas por el ovario está regulada por la hormona estimulante de folículos y la hormona luteinizante. Las hormonas FSH y LH son secretadas por la glándula pituitaria que está bajo el control de la hormona liberadora de gonadotropina, que es secretada por el hipotálamo. La hormona FSH tiene afinidad sobre las células de la granulosa que promueven el crecimiento y maduración del folículo. Por otro lado, la hormona LH tiene afinidad por las células de la teca (células endocrinas que rodean el folículo) que producen andrógenos y los precursores de los estrógenos^{1,3}.

2. El cáncer de ovario

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y que se caracterizan por un crecimiento celular rápido y descontrolado que altera la forma y función del tejido afectado. Estas células pueden, a su vez, invadir tejidos cercanos y/o extenderse a otros órganos⁷. Esta enfermedad supone la segunda causa de muerte a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares. En 2020 se estima que se produjeron aproximadamente 9,9 millones de muertes por cáncer. Asimismo, se cree que la incidencia y mortalidad aumentará en las dos próximas décadas. En 2040 se estima que se producirán 27 millones de casos nuevos de cáncer y de 16 millones de muertes a causa de esta enfermedad en todo el mundo^{8,9}.

El origen de esta enfermedad es muy complejo y engloba alteraciones genéticas y epigenéticas que desregulan la expresión génica y causan la adquisición de fenotipos tumorales. Estos fenotipos se caracterizan por un aumento de la capacidad proliferativa, un potencial replicativo ilimitado, una capacidad de evasión de señales de muerte celular, una inducción de la invasión, metástasis y angiogénesis¹⁰.

El cáncer de ovario (CO) engloba un grupo de tumores que afectan a los ovarios, las trompas de Falopio y la cavidad peritoneal¹¹. Estos tumores se originan a partir de tres tipos celulares: las células epiteliales, las células estromales o de los cordones sexuales y las células germinales. Aproximadamente el 90% de los tumores malignos de ovario tienen un origen epitelial, un 5% corresponden a tumores de las células de los cordones sexuales o de las células estromales y el 3-5% restante a los de las células germinales¹¹⁻¹⁴. Dentro de los carcinomas con origen epitelial, teniendo en cuenta una clasificación histopatológica, inmunohistoquímica y molecular se pueden distinguir cinco tipos principales: carcinoma seroso de alto grado (70%), carcinoma seroso de bajo grado (<5%), carcinoma endometriode (10%), carcinoma de células claras (10%) y carcinoma mucinoso (5%)^{11,13}, cuyas características se explicarán en detalle más adelante.

2.1. Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario es el octavo tumor más frecuente en mujeres en todo el mundo, representando entre el 3 y el 4% de los tumores femeninos, y es la octava causa de muerte por cáncer en mujeres. La incidencia es superior en los países desarrollados, especialmente en Europa y Norteamérica, lo que se podría atribuir en gran parte a la baja tasa de natalidad presente en estos países, ya que una alta paridad se considera un factor de protección frente al CO. En estos países representa la primera causa de muerte por cánceres ginecológicos^{8,15}.

En Estados Unidos, el CO representa el 2,3% de todos los casos de cáncer en mujeres y el 5% de las muertes por cáncer debido a los bajos ratios de supervivencia y a su diagnóstico en estadios avanzados de la enfermedad. En este país, supone la quinta causa de muerte por cáncer entre las mujeres, siendo el cáncer ginecológico con mayor mortalidad^{16,17}.

En Europa, el CO es la séptima causa de cáncer más común en mujeres y es la región del mundo en la que se encuentra una mayor incidencia de la enfermedad, especialmente en los países del Norte y del Este¹⁸. En España, el CO es el octavo con mayor incidencia en mujeres, diagnosticándose unos 3.600 casos anuales que constituyen en torno al 3% de los cánceres entre las mujeres (**Figura 2**)⁹. En cuanto a

la mortalidad, el CO supone la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres tanto en Europa como en España (Figura 2)^{9,15,18,19}.

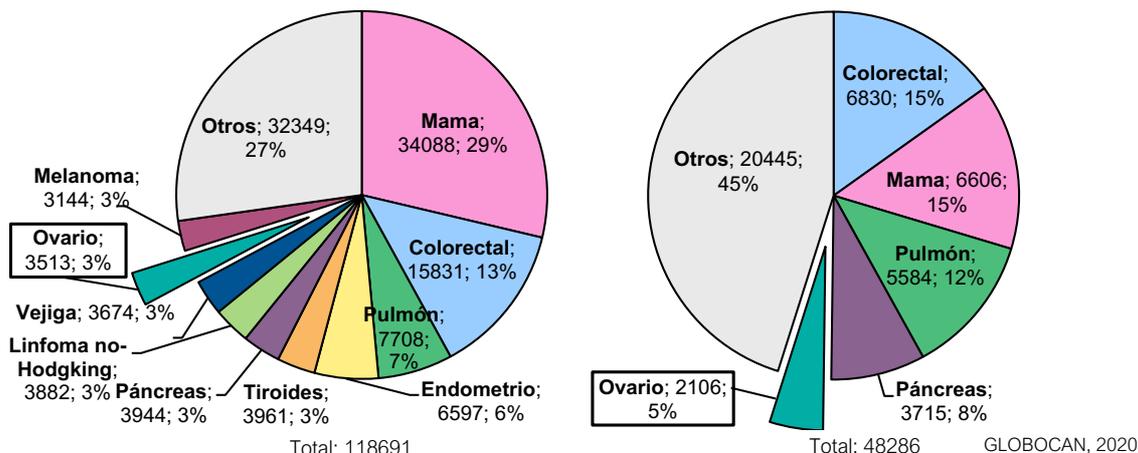


Figura 2. Número estimado de casos nuevos y muertes por cáncer en mujeres en España. Adaptado de GLOBOCAN 2020.

La supervivencia a cinco años varía de unos países a otros. En Europa, es de aproximadamente un 37%. Las mejores tasas de supervivencia se encuentran en Islandia, Austria, Portugal y España; en España, esta tasa es de un 44%. No obstante, la supervivencia varía dependiendo de distintos factores como la edad o el estadio en el que se diagnostique el tumor^{15,20}:

- En el caso de la edad, se observa que la supervivencia global a cinco años es el doble en mujeres menores de 65 años (60%) que en mujeres mayores de esta edad (31%)¹⁶.
- En cuanto al estadio del tumor, la supervivencia se correlaciona inversamente con el estadio en el que se diagnostica la enfermedad. En los casos en los que el tumor únicamente afecta a los ovarios, la supervivencia alcanza el 90% mientras que en los que afectan a los órganos cercanos baja al 60-70% y cuando se dan metástasis en otros órganos, más alejados, la supervivencia a cinco años cae al 20-30%^{16,20}.

2.2. Etiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario engloba un conjunto de enfermedades muy heterogéneo pudiéndose desarrollar a partir de células de diferentes orígenes. El 40% de los tumores de ovario tienen un origen no epitelial si bien no suelen progresar a un tumor maligno y cuando lo hacen representan el 10% de los cánceres de ovario, como se comentó previamente. Por lo que el 90% de los casos de CO corresponden a tumores cuyo origen se encuentra en las células epiteliales^{21,22}.

Los carcinomas epiteliales de ovario son un grupo heterogéneo que presentan distintas morfologías, manifestaciones clínicas y alteraciones genéticas. En la actualidad, el origen de este tipo de carcinomas es desconocido y existen múltiples teorías para explicar su origen:

2.2.1. Teoría de la ovulación incesante

Inicialmente se consideraba que todos los tipos de CO compartían un origen común que se encontraba en la superficie epitelial del ovario. De acuerdo con esta teoría durante la ovulación, la ruptura del folículo y la liberación del oocito provoca roturas en el epitelio ovárico que deben ser reparadas inmediatamente. A lo largo de la vida fértil de la mujer, se producen múltiples ciclos de ovulación repetidos que conllevan una generación de daño que ha de ser reparado. Asimismo, la ovulación genera una liberación de citoquinas inflamatorias que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar el DNA. La acumulación de daño en el DNA durante estos ciclos facilita la transformación de este epitelio y su internalización hacia el estroma del ovario. Esta internalización puede conducir a la formación de quistes de inclusión corticales donde las células epiteliales se ven expuestas a las hormonas generadas en el ovario y que pueden conducir a su transformación en células cancerosas^{21,22}.

Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que en tumores benignos de ovario aparecen quistes en el estroma del ovario y también en los datos epidemiológicos en los que se observa que un descenso en los ciclos de ovulación reduce el riesgo de desarrollo de cáncer de ovario. Sin embargo, esta teoría presenta ciertas limitaciones, no explicando la existencia de carcinomas peritoneales, con un origen en el exterior del ovario, o las diferencias moleculares entre los distintos tipos de tumores si todos comparten un origen común²².

2.2.2. Teoría de las trompas de Falopio

Tradicionalmente se consideraba que el origen del CO se encontraba en el propio ovario. Sin embargo, en los últimos años se han buscado otras lesiones precursoras de estos tumores en otros lugares, como las trompas de Falopio. Éstas están rodeadas por un epitelio cilíndrico compuesto por dos tipos de células (secretoras y ciliadas) y se conecta al ovario a través de la su porción fimbriada donde es el encargado de recoger el oocito secundario. En 2001, Piek describió que un 50% de las mujeres con mutaciones en los genes *BRCA1/2* presentaban una displasia epitelial en las trompas de Falopio. Esta displasia se parecía al carcinoma de ovario seroso de alto grado²³. Posteriormente, en otros estudios como el de Kindelberger, se encontraron características histológicas similares entre el carcinoma seroso de alto grado y las displasias epiteliales que se encontraron en las trompas de Falopio, independientemente del estado de *BRCA*²⁴. Estas displasias se localizaban principalmente en la región de las fimbrias de la trompa. En base a estos estudios, se postuló que la trompa de Falopio podría albergar las lesiones precursoras del cáncer de ovario que posteriormente se extendería al ovario adyacente²⁵.

Esta teoría ha comenzado a ser aceptada por los expertos, puesto que las fimbrias se encuentran próximas a la superficie epitelial del ovario y están sometidas al mismo microambiente que éstos. Además, como las trompas de Falopio están conectadas al peritoneo, sería fácil que las células epiteliales transformadas pudieran migrar al ovario o al peritoneo, lo que explicaría la existencia de carcinomas fuera del ovario. Sin embargo, esta teoría se basa únicamente en evidencias patológicas y no se ha validado experimentalmente por el momento^{21,22,25}.

2.2.3. Teoría dualista

Esta teoría fue propuesta por Shih y Kurman en 2004 para tratar de integrar los descubrimientos clínicos, histopatológicos y moleculares (**Figura 3**). Se basan en las frecuencias mutacionales en los genes *TP53* y *KRAS* en los tumores serosos, tanto benignos como malignos, y dividen los tumores de ovario en dos tipos²⁶⁻²⁸:

- **Tipo I:** en este grupo se incluyen los tumores serosos de bajo grado, los endometrioides, los mucinosos y los de células claras, así como los carcinomas de células de transición. Las lesiones precursoras se localizan en el ovario. En este caso el epitelio de la superficie del ovario se internaliza y forma quistes que reciben una estimulación de proliferación del microambiente y esto puede conducir a la transformación en células cancerosas. Las alteraciones moleculares más frecuentes en este grupo de tumores son mutaciones activadoras en *KRAS* y *BRAF* que conducen a una activación de la vía MAPK-ERK. También se pueden ver mutaciones en *PTEN* (activan la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR), *CTNNB1* y *TGFBR2* (afectan a la vía de Wnt/ β -catenina). En general son tumores con crecimiento lento, de bajo grado con células bien diferenciadas, genéticamente estables y suelen afectar únicamente al ovario cuando se diagnostican²⁵⁻²⁷.
- **Tipo II:** en este grupo se incluye los tumores serosos de alto grado, los indiferenciados y los carcinosarcomas. En este tipo de tumores, se cree que su origen se encuentra fuera del ovario, posiblemente en las trompas de Falopio. Suelen presentar mutaciones en *TP53* (50-80%), sobreexpresión de *HER2/Neu* (10-20%) y *AKT* (12-18%). El 50% de estos tumores se asocian a mutaciones en *BRCA1/2*. Estos tumores suelen ser más agresivos, genéticamente inestables y se suelen diagnosticar en estadios más avanzados de la enfermedad²⁵⁻²⁷.

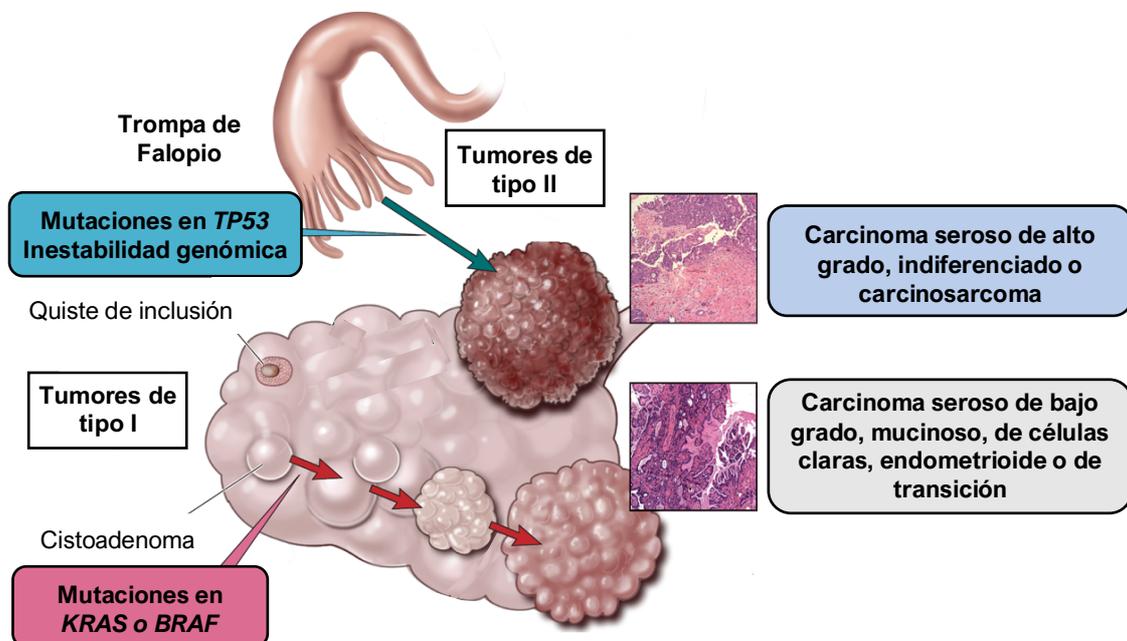


Figura 3. Esquema en el que se representa la teoría dualista de origen de cáncer de ovario. Imagen adaptada de referencia²⁷.

2.2.4. Otras teorías

1. **Teoría de la inflamación:** esta teoría propone que la inflamación crónica podría tener un papel en la carcinogénesis. Durante la ovulación se producen distintas citoquinas proinflamatorias, como TNF- α o metaloproteasas, que actúan a nivel de los componentes de la membrana basal epitelial y podrían contribuir a la transformación del epitelio. Además, el microambiente inflamatorio que rodea al ovario en el que se encuentran células estromales y leucocitos generan especies reactivas de oxígeno que pueden producir daño en el DNA dando lugar a la carcinogénesis del epitelio²⁹⁻³¹.
2. **Teoría de las gonadotropinas:** esta teoría sugiere que el origen del CO se puede deber a un incremento en los niveles de gonadotropinas, como la hormona luteinizante y la hormona estimulante de folículos. Esta teoría se basa en la observación de que las mujeres postmenopáusicas presentan niveles elevados de gonadotropinas y en que el riesgo a desarrollar CO aumenta a partir de la menopausia. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las gonadotropinas tienen un papel protector en lugar de inductor de la carcinogénesis²⁹.
3. **Teoría de la exposición a carcinógenos o contaminación en la pelvis:** esta teoría sugiere que la exposición a agentes carcinogénicos en el área genital femenina podría conducir al desarrollo de CO por su posible migración a los ovarios y la cavidad abdominal. Existen evidencias de que la exposición a asbestos o talcos incrementa el riesgo a desarrollar este tipo de cáncer^{29,32}.

2.3. Clasificación del cáncer de ovario

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2014 y la morfología y el origen del tumor, los tumores primarios de ovario se pueden dividir en distintos tipos: epiteliales (60%), de células germinales (30%), de células estromales o de los cordones sexuales (8%) y un subgrupo de tumores indiferenciados (1%)^{33,34}:

- **Tumores epiteliales:** estos tumores tienen un origen en el epitelio que recubre el ovario, el peritoneo o las trompas de Falopio. Aparece principalmente en mujeres con más de 60 años y constituyen aproximadamente el 90% de los tumores malignos de ovario¹².
- **Tumores de las células germinales:** representan en torno al 5% de los tumores malignos de ovario. Su origen se encuentra en las células precursoras de los óvulos (oogonias). El tipo de tumor de células germinales más común es el teratoma. Este tipo de tumores es mucho más frecuente en mujeres de menos de 40 años¹².
- **Tumores de las células estromales o de los cordones sexuales:** suponen entre el 3 y el 5% de los tumores malignos de ovario. Su origen se encuentra en las células estromales (células de la teca, fibroblastos y células de Leydig) y en las células de las gónadas primordiales (células de la granulosa y células de Sertoli). En este grupo se engloban la mayoría de los tumores de ovario con manifestaciones endocrinas. Dentro de este grupo, los tumores más habituales son los de las células de la granulosa y los de las células Sertoli-Leydig. Los tumores de la granulosa generalmente presentan una alta producción estrogénica mientras que los de células Sertoli-Leydig suelen tener

una alta producción androgénica. Estos tumores aparecen en mujeres de entre 40 y 60 años^{12,35}.

- **Otros:** existe otro tipo de tumores indiferenciados de ovario con muy baja frecuencia (en torno al 1%), entre los que se encuentra el carcinoma de célula pequeña ovárico de tipo hipercalcémico que afecta a mujeres muy jóvenes (de menos de 40 años) y cuyo origen es desconocido. Este tumor se suele asociar con una hipercalcemia (70%), es muy agresivo y presenta una alta letalidad¹².

Los tumores epiteliales de ovario pueden ser clasificados a su vez en función de las características histopatológicas y moleculares, en función del grado de diferenciación histológica y en función de su grado de malignidad.

2.3.1. Tumores epiteliales de ovario en base al grado de diferenciación histológica

Los tumores epiteliales de ovario se pueden clasificar en base al grado de diferenciación histológica. Teniendo en cuenta esta clasificación, se pueden distinguir tres grados³⁶⁻³⁸:

- **Grado 1:** Bien diferenciado. Las células presentan una morfología similar a la de las células sanas y están organizadas dentro del tumor como estarían en el tejido sano. Generalmente los tumores de grado 1 tienden a crecer de una manera más lenta y se asocian con una mayor supervivencia³⁷⁻³⁹.
- **Grado 2:** Moderadamente diferenciado. Las células presentan un fenotipo intermedio entre los otros dos grados con un crecimiento intermedio³⁷⁻³⁹.
- **Grado 3:** Pobrementemente diferenciado o sin diferenciar. La mayoría o la totalidad de las células tienen un aspecto alejado de la normalidad y no presentan la estructura típica del tejido. Los tumores con este grado suelen crecer más rápido y tener mayor tendencia a metastatizar y una peor supervivencia³⁷⁻³⁹.

2.3.2. Tumores epiteliales de ovario en función del grado de malignidad

Los tumores epiteliales de ovario se pueden clasificar en benignos, *borderline* o malignos en base a una observación microscópica del grado de proliferación celular, de la presencia o ausencia de invasión estromal y de la morfología e histología celular³³:

- **Tumores benignos:** constituyen el 60% del total de los tumores epiteliales del ovario y son más frecuentes en mujeres de menos de 40 años. Se trata de tumores no cancerosos que se localizan en el ovario y no diseminan a otras partes del cuerpo. Dentro de este grupo podemos encontrar adenomas serosos, adenomas mucinosos, cistoadenofibromas y tumores de Brenner (de células transicionales). A nivel celular, presentan un crecimiento no estratificado y atipias citológicas. Generalmente no son una amenaza para la vida de las pacientes y su tratamiento es quirúrgico, en el que se extirpa la parte del ovario que contiene este tumor^{33,40,41}.
- **Tumores *borderline*:** suponen entre el 10 y el 20% del total de tumores epiteliales de ovario. Estos tumores presentan atipia tanto nuclear como citoplasmática, una ausencia de estroma y un grado de proliferación inusual

con estratificación celular (arquitectura atípica y formación de protuberancias papilares). Dentro de este grupo se pueden distinguir distintos tipos: serosos, mucinosos, endometrioides, de células claras, de Brenner o de histologías mixtas. Generalmente, no invaden otros tejidos, pero cuando lo hacen crecen sobre el peritoneo, presentan buen pronóstico, buena supervivencia y bajo potencial de malignidad⁴²⁻⁴⁴.

- **Tumores malignos:** representan en torno al 30% del total de tumores epiteliales de ovario; si bien, dan lugar al 80-90% de todos los casos de cáncer de ovario. Estos tumores se caracterizan por presentar proliferación celular, atipia nuclear e invasión estromal. Se denominan carcinomas y tienen capacidad de metastatizar a otros tejidos. Este tipo de tumores es más frecuente en mujeres de más de 60 años³³.

2.3.3. Tumores epiteliales de ovario en función de las características histológicas y moleculares

Los carcinomas de ovario son un grupo heterogéneo de neoplasias que muestran diferencias morfológicas y moleculares, así como en la patogénesis y en su comportamiento. Teniendo en cuenta la morfología y las alteraciones moleculares presentes en los tumores, los carcinomas se pueden dividir en al menos cinco tipos (**Figura 4**)^{33,45,46}.

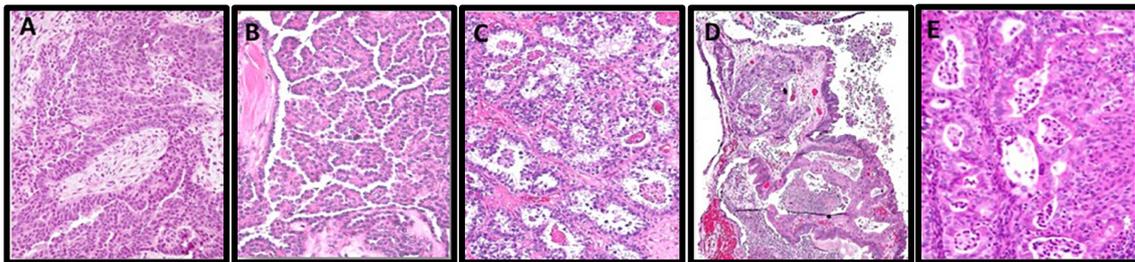


Figura 4. Tinción hematoxilina-eosina de los cinco subtipos principales de cáncer de ovario. (A) Carcinoma seroso de alto grado, (B) carcinoma seroso de bajo grado, (C) carcinoma de células claras, (D) carcinoma mucinoso y (E) carcinoma endometrioide. Imagen adaptada de referencia⁴⁶.

2.3.3.1. Carcinoma seroso

Los carcinomas serosos son los más frecuentes (70-75%) y están formados por células ciliadas cilíndricas. Estos carcinomas se pueden dividir en dos subtipos:

- **Carcinoma seroso de alto grado (HGSC):** es el tipo de cáncer de ovario más frecuente (70%) y se suele diagnosticar en estadios avanzados de la enfermedad (80%), cuando el tumor ya ha metastatizado a otros tejidos. En la mayoría de los casos (2/3) se da una afectación de los dos ovarios (bilateral). Por todo esto, suele tener un mal pronóstico. A nivel celular, es muy heterogéneo y el tipo más habitual presenta un crecimiento sólido y papilar con lúmenes glandulares en forma de hendidura. Las células presentan un tamaño intermedio con células gigantes mononucleares con nucleolos prominentes. A nivel molecular, en la práctica totalidad de los casos se producen alteraciones en el gen *TP53* (mutaciones de *splicing*, *nonsense*, inserciones o deleciones). Otras alteraciones comunes se dan en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (aproximadamente el 20% de los casos). Estos carcinomas expresan

frecuentemente las proteínas p16 y WT1, así como el receptor de estrógenos. Además, muestran inestabilidad genómica, alteraciones en el número de copias del DNA y un alto índice de proliferación (Ki-67 elevado). Algunos estudios genómicos han subdividido estos tumores en cuatro tipos en base a análisis de expresión génica: proliferativo, inmunológico, mesenquimal y diferenciado; sin embargo, esta clasificación todavía no se usa en clínica. Estos tumores suelen tener una sensibilidad inicial a agentes quimioterápicos y van adquiriendo resistencias tras las recaídas de la enfermedad^{45,47-49}.

- **Carcinoma seroso de bajo grado (LGSC):** este tipo de tumor es muy poco frecuente (5%). Se asocia con un tumor seroso *boderline* (con patrón micropapilar o no) o con una progresión que aparece tras el diagnóstico de un tumor seroso *borderline*. A nivel celular, muestran células papilares con pequeños núcleos uniformes y una cantidad variable de estroma con contenido hialino que puede presentar calcificaciones (cuerpos de psammoma). A nivel molecular, suelen presentar mutaciones en *BRAF* (40%), *KRAS* (20%) y *HER2/Neu* y no suelen tener inestabilidad cromosómica. Si aparece una mutación en *KRAS* o *BRAF* no aparece mutación en *HER2/Neu* y viceversa (son excluyentes). Generalmente presentan bajas respuestas a agentes citotóxicos y hormonales y un crecimiento lento del tumor (expresión de Ki-67 baja)^{33,47-49}.

2.3.3.2. Carcinoma endometriode

Los carcinomas endometrioides suponen el 10% de todos los casos de CO. Estos tumores son bilaterales en el 17% de los casos y se asocian entre un 15 y un 20% con el carcinoma de endometrio. Hasta el 42% de los casos se asocian con ovarios ipsilaterales y endometriosis pélvica u ovárica⁴⁷.

De acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) se pueden distinguir tres grados de carcinomas endometrioides en base a la presencia de áreas sólidas y al grado de atipia nuclear. Los de bajo grado (1 y 2) presentan el patrón glandular similar al de las glándulas del endometrio, bastante preservado y una frecuente diferenciación escamosa. La mayoría de los carcinomas endometrioides se engloban en estos dos grados. Los tumores de grado 1 con cápsula intacta suelen tener un pronóstico favorable y no requieren terapia adicional. En el caso de los tumores de grado 2, éstos requieren de tratamiento quimioterápico. Los carcinomas endometrioides de alto grado (grado 3) son difíciles de distinguir de los serosos de alto grado ya que presentan mutaciones en *TP53* y expresan WT1. La supervivencia a los cinco años se asocia con el momento de diagnóstico, siendo mayor cuando se detecta en estadios más tempranos, así como con el grado^{33,45,50}.

A nivel molecular, suelen presentar mutaciones en *CTNNB1* (48%), *PIK3CA* (40%), *ARID1A* (30%), *KRAS* (30%), *PPP2R1A* (16%) y *PTEN* (16%). En algunos casos presentan inestabilidad de microsatélites^{33,45,47,49}.

2.3.3.3. Carcinoma de células claras

Los carcinomas de células claras representan en torno al 10% de los carcinomas epiteliales de ovario. Generalmente, no afectan a los dos ovarios. En un porcentaje elevado de los casos (20-50%) se asocian con una endometriosis atípica pélvica u ovárica, presentando estos casos un pronóstico más favorable^{33,45,47,49}.

La mayoría de estos tumores son neoplasias adenofibromatosas y presentan un componente *borderline*. A nivel estructural, estos carcinomas muestran atipia en el epitelio glandular y no presentan invasión de células estromales. Los quistes están revestidos por células cilíndricas o aplanadas con un gran citoplasma claro o eosinófilo, pudiendo aparecer una membrana basal densa con cuerpos hialinos (25% de los casos). Los núcleos de estas células son pleomórficos, irregulares e hiper cromáticos. Estas células presentan además un bajo índice de proliferación^{33,45,47,49}.

Generalmente se detectan en estadios tempranos de la enfermedad, donde presentan un pronóstico favorable y una alta supervivencia a 5 años. Sin embargo, cuando metastatizan, son especialmente resistentes a agentes quimioterápicos^{33,45,47}.

A nivel molecular, las mutaciones en *ARID1A* (40-70%), *PTEN* (40%), *PIK3CA* (30%) y *KRAS* (30%) son frecuentes. La amplificación del gen *MET* también se puede ver en torno a un 20% de los casos y en un 10% de los casos se puede encontrar inestabilidad de microsatélites. Estos carcinomas suelen expresar HNF1 β , proteína que podría tener un papel importante en la patogénesis en este tipo de tumores. La expresión de esta proteína se suele emplear para el diagnóstico inmunohistoquímico de este tipo de carcinomas^{33,45,47-49}.

2.3.3.5. Carcinoma mucinoso

Los tumores mucinosos suponen el 10-15% de todos los tumores de ovario; si bien, un gran porcentaje son benignos (80%) y la mayoría de los restantes son *borderline*. Los carcinomas mucinosos primarios son muy raros. Si se excluyen las metástasis ováricas de tumores del tracto gastrointestinal, solo un 3 o un 4% de los carcinomas de ovario son mucinosos. Los carcinomas primarios suelen ser grandes con varios quistes que contienen moco y unilaterales, mientras que las metástasis son bilaterales y pequeñas^{33,47}.

Histológicamente, se componen de quistes y glándulas de tamaño variable, pudiendo contener áreas sólidas. En algunos casos, se han observado arquitecturas papilares. Las células que los componen son altas, cilíndricas y estratificadas con citoplasmas basófilos que contienen mucina^{33,47}.

Estos carcinomas son heterogéneos y suelen derivar de tumores *borderline* mucinosos. En éstos, pueden coexistir áreas de cistoadenomas mucinosos (benignos), áreas de tumores *borderline* mucinosos y áreas de adenocarcinomas mucinosos (malignos). Según su patrón de crecimiento, los carcinomas invasivos se pueden dividir en:

- **Tipo expansivo:** estas neoplasias no presentan invasión estromal o una invasión mínima. Las neoplasias asociadas a este patrón de crecimiento suelen encontrarse en pacientes más jóvenes, en estadios tempranos de la enfermedad y se asocia con un pronóstico más favorable.
- **Tipo infiltrativo:** estos carcinomas presentan una invasión estromal en forma de glándulas, nidos celulares o células individuales. Una infiltración desordenada del estroma se asocia frecuentemente con una reacción desmoplásica del estroma (con una elevada producción de tejido conectivo) y se puede observar en este grupo. Estos tumores diseminan fuera del ovario con mayor frecuencia que los de tipo expansivo.

A nivel molecular, se detectan mutaciones en los codones 12 y/o 13 de *KRAS* en aproximadamente el 50% de los carcinomas mucinosos. Las mutaciones en el gen *TP53*

también son frecuentes en pacientes con carcinoma mucinoso (25% de los casos), así como la amplificación o sobreexpresión de *HER2/Neu* (25% de los casos). Las alteraciones de *KRAS* y *HER2/Neu* son excluyentes y ambas alteraciones moleculares podrían asociarse con un pronóstico más favorable. Los carcinomas mucinosos no suelen expresar el receptor de estrógenos ni WT1; sin embargo, siempre expresan la citoqueratina 7 y en la mayoría de los casos también expresan la citoqueratina 20 (65%), lo que permite distinguirlos de otros carcinomas gastrointestinales. Su diagnóstico se da frecuentemente en estadios tempranos de la enfermedad, lo que hace que suelen presentar un buen pronóstico^{33,45,47-49}.

En la **Tabla 1** se presenta un resumen de las frecuencias, características moleculares y clínicas de los distintos tipos de carcinomas epiteliales de ovario en función de sus características histológicas y moleculares.

Tabla 1. Resumen de las características clínicas y moleculares de los distintos tipos de cáncer de ovario epitelial. Adaptada de referencias^{45,49}.

Subtipo y frecuencia	Características moleculares	Características clínicas
HGSC (70%)	Mutaciones en <i>TP53</i> (100%) y <i>BRCA1/2</i> (17%). Expresión p16, WT1 y receptor de estrógenos. Inestabilidad genómica.	Alta sensibilidad inicial a los agentes quimioterápicos (QT). Detección en estadios avanzados (mal pronóstico). Alto índice de proliferación.
LGSC (<5%)	Mutaciones en <i>BRAF</i> (40%), <i>KRAS</i> (20%) y <i>HER2/Neu</i> .	Baja respuesta a QT.
Carcinoma endometriode (10%)	Mutaciones en <i>CTNNB1</i> (50%), <i>PIK3CA</i> (40%), <i>ARID1A</i> (30%), <i>KRAS</i> (30%), <i>PPP2R1A</i> (16%) y <i>PTEN</i> (16%). Inestabilidad de microsatélites.	Frecuentemente deriva de una endometriosis atípica. Mala respuesta a QT.
Carcinoma de células claras (10%)	Mutaciones en <i>ARID1A</i> (40-70%), <i>PTEN</i> (40%), <i>PI3KCA</i> (30%) y <i>KRAS</i> (30%). Amplificación de <i>MET</i> (20%). Inestabilidad de microsatélites.	Puede derivar de una endometriosis atípica Baja respuesta a QT. Bajo índice de proliferación.
Carcinoma mucinoso (5%)	Mutación <i>KRAS</i> (50%) y <i>TP53</i> (25%). Amplificación o sobreexpresión de <i>HER2/Neu</i> (25%). Expresión citoqueratina 7 y 20.	Pueden derivar de cistoadenomas <i>borderline</i> mucinosos. Baja respuesta a QT.

2.4. Estadificación del cáncer de ovario

Los dos sistemas usados en la estadificación del cáncer de ovario son los propuestos por la FIGO y el American Joint Committee of Cancer (AJCC) y se basan en el sistema TNM. Este sistema tiene en cuenta la extensión del tumor primario (T), el grado de afectación de los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis a distancia (M)⁵⁰. Atendiendo a esos tres factores, la estadificación del CO se resume en la siguiente tabla (**Tabla 2**). Hay que tener en cuenta que la estadificación de este tipo de cáncer se ha de llevar a cabo tras la evaluación intraoperatoria de toda la cavidad abdominal.

Tabla 2. Estadificación del cáncer de ovario en base al sistema TNM. Adaptada de referencia⁵⁰.

Estadio		Clasificación TNM	Localización
I	IA	T1aN0M0	Tumor limitado a un ovario con la cápsula intacta o a la trompa de Falopio. No hay tumor en la superficie del ovario o de la trompa de Falopio ni células tumorales en el líquido ascítico o en los lavados peritoneales.
	IB	T1bN0M0	Tumor limitado a los dos ovarios con la cápsula intacta o a las trompas de Falopio. No hay tumor en la superficie del ovario o de la trompa de Falopio ni células tumorales en el líquido ascítico o en los lavados peritoneales.
	IC	T1cN0M0	Tumor limitado a uno o los dos ovarios o a una o las dos trompas de Falopio con una de las siguientes afectaciones: <ul style="list-style-type: none"> • IC1: derrame quirúrgico durante la operación. • IC2: rotura de la cápsula previa a la operación o presencia del tumor en la superficie ovárica o de la trompa de Falopio. • IC3: células tumorales en el líquido ascítico o en los lavados peritoneales.
II	IIA	T2aN0M0	Extensión y/o implantes en el útero y/o trompas de Falopio y/u ovarios.
	IIB	T2bN0M0	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales.
III	IIIA	T3aN0M0	IIIA1: afectación de los nódulos linfáticos retroperitoneales (N1, comprobado histológica o citológicamente): <ul style="list-style-type: none"> • IIIA1(i): metástasis de hasta 1cm. • IIIA1(ii): metástasis de más de 1cm. IIIA2: afectación microscópica extrapélvica con (N1) o sin (N0) nódulos linfáticos retroperitoneales afectados.
		T3aN1M0	
	IIIB	T3bN0M0	Metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis de hasta 2cm con (N1) o sin (N0) metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales (incluye la extensión del tumor a la cápsula del hígado y del bazo sin afectación del parénquima de estos órganos)
		T3bN1M0	
	IIIC	T3cN0M0	Metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis de más de 2cm con (N1) o sin (N0) metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales (incluye la extensión del tumor a la cápsula del hígado y del bazo sin afectación del parénquima de estos órganos)
		T3cN1M0	
IV	IVA	Cualquier T, Cualquier N, M1	Derrame pleural con citología positiva para células tumorales.
	IVB	Cualquier T, Cualquier N, M1	Metástasis parenquimatosas y en órganos extra-abdominales (incluyendo nódulos linfáticos inguinales y nódulos linfáticos fuera de la cavidad abdominal)

2.5. Factores de riesgo en cáncer de ovario

Existen distintos factores que incrementan el riesgo a desarrollar cáncer de ovario entre los que se incluyen: los factores genéticos, las condiciones ginecológicas benignas, la fertilidad o infertilidad, los factores hormonales y la terapia hormonal sustitutiva, la edad, la dieta y los hábitos personales o la raza. A continuación, se detalla cada uno de estos factores.

2.5.1. Cáncer de ovario hereditario

Múltiples factores genéticos se han asociado con un incremento en las posibilidades de sufrir CO. Aproximadamente el 25% de los CO son hereditarios y se asocian a la herencia de mutaciones en genes implicados en la reparación del DNA^{14,51,52}.

De todas las alteraciones moleculares, las más conocidas son las mutaciones en línea germinal de los genes *BRCA1/2*. Estas mutaciones se pueden encontrar en hasta el 17% de las pacientes, y se asocian principalmente con el desarrollo de carcinomas serosos de alto grado. Las pacientes con mutaciones en estos genes suelen presentar una mayor supervivencia que las pacientes sin alteraciones en estos genes. Generalmente, las mutaciones germinales en *BRCA2* se asocian con una mayor supervivencia global comparando con las mutaciones en *BRCA1*, probablemente debido a que estas alteraciones en *BRCA2* se asocian a una mejor respuesta a los platinos¹⁴. Dependiendo de la localización de la mutación dentro de los genes *BRCA* y del tipo de mutación, el riesgo a desarrollar CO puede variar, así como la edad media de diagnóstico¹⁴. Se ha observado que las portadoras de mutaciones en *BRCA1/2* presentan una mayor probabilidad de desarrollar CO antes de los 70 años que la población general; un 20% en aquellas con mutaciones en *BRCA2* y un 40% en aquellas portadoras de *BRCA1*, frente al 12% para la población general. Existen también otras mutaciones en genes implicados en la reparación del DNA que pueden aumentar el riesgo de padecer CO, entre los que se encuentran los genes *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *BARD1*, *PALB2*, *CHEK2*, *MRE11A*, *RAD50*, *ATM* y *TP53*. Estas alteraciones explican entre el 65 y el 85% de los cánceres de ovario hereditario y se asocian con el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario y el síndrome de Li-Fraumeni^{14,52,53}.

Existen otros síndromes hereditarios, como el síndrome de Lynch, que aumentan el riesgo a padecer CO. Este síndrome se caracteriza por la herencia de mutaciones germinales en genes implicados en la vía de reparación del DNA por apareamiento erróneo (MMR), como *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* o *MSH6*. Los pacientes con este síndrome suelen desarrollar CO de tipo endometriode o de células claras a una edad más temprana, en torno a los 50 años, además de otro tipo de tumores como de colon o endometrio^{14,52,54}.

2.5.2. Condiciones ginecológicas benignas

Existen distintos problemas ginecológicos como el síndrome de ovario poliquístico, la endometriosis o la enfermedad pélvica inflamatoria que se han estudiado por su posible implicación en el desarrollo de CO:

- **Síndrome de ovario poliquístico:** se ha observado que este síndrome predispone a desarrollar cáncer de endometrio; sin embargo, su relación con el CO no está del todo claro. Teniendo en cuenta distintos estudios, este

síndrome no parece aumentar el riesgo a desarrollar CO si bien podría aumentar el riesgo a desarrollar tumores de ovario *borderline*⁵⁵.

- **Endometriosis:** esta enfermedad se ha asociado con el desarrollo de CO, especialmente de los tipos endometrioides y de células claras. Esta asociación se podría deber a la alta concentración de estrógenos asociada a esta patología, a la mutación del gen *ARID1A* o al hierro producido en los quistes del endometrio que inducirían un estrés oxidativo que podría originar mutaciones y carcinogénesis de los quistes ováricos⁵⁶.
- **Enfermedad pélvica inflamatoria:** esta enfermedad provoca una inflamación del endometrio, las trompas de Falopio y los ovarios. La asociación de esta patología y el riesgo a desarrollar CO no es clara, si bien, se ha descrito que esta enfermedad aumenta el riesgo a desarrollar tumores de ovario *borderline*⁵⁷.

2.5.3. Fertilidad e infertilidad

La asociación entre el embarazo y el desarrollo de CO está muy estudiada. La nuliparidad se asocia con un mayor riesgo de desarrollar CO. Esto se puede explicar ya que durante el embarazo se produce una falta de ovulación y una menor secreción de gonadotropinas lo que reduce el riesgo a desarrollar CO^{13,58}. En el caso de la infertilidad, ésta parece estar asociada con un incremento en el riesgo a sufrir CO. En algunos estudios se ha descrito que la infertilidad provocada por causas biológicas, como la endometriosis, aumenta el riesgo de padecer CO en mayor medida que el tratamiento con fármacos inductores de la ovulación^{59,60}. Si bien, algunos estudios, sugieren que los tratamientos de fertilidad podrían aumentar el riesgo de desarrollar tumores *borderline*^{59,61}.

2.5.4. Factores hormonales y terapia hormonal sustitutiva

En cuanto a los factores hormonales, se ha observado que los estrógenos y otras proteínas esteroideas, como los andrógenos, podrían promover la carcinogénesis del epitelio ovárico; si bien, esta relación no está bien definida^{62,63}. En el caso de los estrógenos, las células tumorales de ovario inducen su crecimiento cuando son expuestas a estos y sus receptores están presentes en la mayoría de los tumores de ovarios⁶³. Por lo que el estudio del efecto de la terapia hormonal sustitutiva (TSH), en la que se emplean estrógenos aislados o estrógenos combinados con progesterona, ha cobrado mucha importancia para tratar de definir el papel de los estrógenos en el desarrollo de CO. Existen controversias entre los distintos estudios, pero estos apuntan a que el riesgo a desarrollar CO es independiente del tipo de TSH y que podría aumentar cuando el tratamiento se alarga más de cinco años. En estos casos existe un mayor riesgo a desarrollar tumores serosos y endometrioides⁶⁴.

Los andrógenos, por su parte, incrementan la proliferación celular y reducen la muerte celular, por lo que podrían tener un papel en la transformación neoplásica del ovario. De hecho, se ha observado una sobreexpresión del receptor de andrógenos en tumores de ovario, esta sobreexpresión es más prevalente en los subtipos serosos donde podría promover el desarrollo tumoral^{65,66}. Asimismo, se ha descrito que la aplicación exógena de andrógenos podría aumentar el riesgo de desarrollar CO y se han identificado altos niveles de andrógenos en el suero de pacientes con CO. Sin embargo, otros trabajos no encuentran una asociación entre los andrógenos con el

desarrollo de CO, por lo que serían necesarios más estudios para determinar si existe o no asociación entre los andrógenos y el riesgo de CO^{65,66}.

2.5.5. Edad

La distribución en edad de las pacientes con CO varía dependiendo del tipo de tumor, de la raza y otra serie de factores. Esto se podría explicar por el fondo genético de las pacientes o por la exposición a diversos factores de riesgo. No obstante, la edad en la que se encuentra el pico máximo de incidencia a nivel global se encuentra en los 70 años para los tumores epiteliales, en los 50 años, para los de cordones sexuales y en los 10-20 años para los tumores de células germinales²⁰.

En general, el CO es mucho más frecuente en mujeres de mayor edad. Esto se podría explicar teniendo en cuenta la teoría de la ovulación incesante, que, como se ha descrito anteriormente, postula que el riesgo a desarrollar este tipo de cáncer aumentaría con el número de ciclos de ovulación. En cada ciclo el epitelio ovárico ha de ser reparado y se ve sometido a un microambiente inflamatorio que fomentaría la aparición de mutaciones que favorecerían la transformación cancerosa. Por todo ello, una menarquia a edad temprana y una menopausia tardía aumentarían el número de ciclos de ovulación y con ello el riesgo a desarrollar CO^{67,68}. Sin embargo, analizando los datos epidemiológicos se ha visto que la duración de la vida fértil no afecta en gran medida a la patogénesis de este tipo de cáncer¹³.

2.5.6. Dieta y hábitos personales

En cuanto a la dieta, la asociación de ésta con la aparición de CO no es evidente. En distintos estudios, se ha observado que una mayor ingesta de grasa, productos fritos y de nitratos de origen animal podrían contribuir a un mayor riesgo a desarrollar CO. Esto se podría deber a que estos compuestos promueven una mayor inflamación, lo que genera un mayor estrés oxidativo y una mayor posibilidad de que se produzca un daño en el DNA, favoreciendo la carcinogénesis. Asimismo, en el tejido adiposo de mujeres con obesidad se suele generar una mayor producción de estrógenos que favorecería el crecimiento de las células tumorales, como se ha descrito previamente^{69,70}.

En cuanto a los hábitos personales, el sedentarismo aumentaría el riesgo a desarrollar esta enfermedad⁷¹. La obesidad, por su parte, se ha asociado en distintos estudios con un mayor riesgo a padecer CO. Esta asociación parece ser más fuerte en mujeres premenopáusicas que en mujeres postmenopáusicas. Los tumores asociados a este factor de riesgo son de tipo no seroso o seroso de bajo grado^{13,72,73}. La ingesta de alcohol no parece que aumente el riesgo a desarrollar CO ya que los estudios llevados a cabo no son concluyentes^{74,75}. Sin embargo, el hábito tabáquico sí se ha asociado con el desarrollo de cáncer de ovario mucinoso y tumores mucinosos *borderline*. Este riesgo parece ser proporcional a la cantidad de cigarrillos consumidos y se mantiene hasta unos 20 años después de dejar este hábito^{76,77}.

2.5.7. Raza

Algunos fondos genéticos presentes en ciertas etnias han mostrado un mayor riesgo a desarrollar CO. Este mayor riesgo aparece especialmente en mujeres descendientes de judíos, franceses, canadienses, daneses e islandeses¹¹. Asimismo, los datos epidemiológicos muestran que existe un menor riesgo a desarrollar esta enfermedad en mujeres de raza negra⁷⁸.

2.6. Factores de protección en cáncer de ovario

No se conoce una manera de prevenir el desarrollo de CO; sin embargo, existen factores que se asocian a una menor probabilidad de sufrirlo:

1. **Paridad, embarazo y lactancia:** como se ha comentado previamente, el embarazo ocasiona una falta de ovulación y una menor secreción de gonadotropinas. Todo esto en conjunto, reduce el riesgo a desarrollar CO entre un 30 y un 60%. Se ha visto también que cada embarazo se asocia con una reducción del riesgo de un 15%^{13,58}. Además, durante la lactancia posterior al embarazo también se suprime la secreción de gonadotropinas lo que conduce a una falta de ovulación. La lactancia se ha asociado con una reducción en el desarrollo de tumores en el ovario especialmente cuando ésta tiene una mayor duración⁷⁹.
2. **Anticoncepción hormonal:** los datos epidemiológicos de las pasadas décadas mostraron una relación inversa entre el uso de anticonceptivos orales y el CO. El efecto protector de los anticonceptivos se incrementaba con la duración del tratamiento, alcanzando un 20% tras cinco años de uso. Además su efecto protector se mantiene años después de dejar el tratamiento¹³. Esta reducción del riesgo a sufrir CO también se observa en portadoras de mutaciones en los genes *BRCA*, que toman anticonceptivos⁸⁰⁻⁸².
3. **Cirugía ginecológica:** algunos procedimientos quirúrgicos podrían ayudar a prevenir el riesgo a desarrollar CO. Entre las mujeres con alto riesgo (como pueden ser las portadoras de mutaciones en los genes *BRCA*), la ooforectomía profiláctica (extirpación de los ovarios), la histerectomía (extirpación de la matriz y los ovarios) o la ligación tubárica reduce este riesgo entre un 30 y un 40% especialmente de los tipos histológicos endometrioides y de células claras. Esta reducción del riesgo se estima que dura al menos diez años^{13,83}.
4. **Progesterona:** la progesterona puede atenuar y regular a la baja los mediadores inflamatorios, lo que le otorga propiedades antiproliferativas y antiinflamatorias. Además, es capaz de promover la respuesta inmune humoral. En estudios *in vitro*, el uso de progesterona suprime la tumorigenicidad e induce la muerte de células tumorales de ovario. Los datos epidemiológicos demuestran que mujeres expuestas a niveles más altos de progesterona, por un mayor número de embarazos, por ejemplo, tienen un menor riesgo a sufrir CO^{63,84,85}.
5. **Antiinflamatorios no esteroideos:** el uso de la aspirina se ha asociado con una reducción en el riesgo a desarrollar CO de hasta un 20%; no obstante, serían necesarios más estudios para confirmar esta relación^{86,87}.
6. **Dieta:** una mayor ingesta de frutas y verduras, así como de alimentos integrales y leche baja en grasa podrían reducir el riesgo a desarrollar CO, según algunos estudios⁶⁹. Otro factor que se ha asociado con el CO es la vitamina D. Esta vitamina se produce mayoritariamente por la piel cuando ésta se expone a la radiación UV-B y la otra parte es generada a partir de la dieta. Se ha mostrado en algunos estudios que la vitamina D inhibe la proliferación de líneas celulares de CO e induce apoptosis de éstas. Sin embargo, su relación con el CO no se ha aclarado, si bien parece que podría prevenir el desarrollo de esta patología⁸⁸.
7. **Hábitos personales:** el hábito personal que más podría reducir el riesgo a sufrir CO parece ser el ejercicio físico. Este podría reducir el riesgo hasta un

20%, ya que la actividad física es capaz de reducir el tejido adiposo (y con ello los niveles de estrógenos) y la inflamación crónica⁸⁹.

2.7. Factores pronósticos del cáncer de ovario

Los principales factores pronósticos en el cáncer de ovario se pueden clasificar en clínico-patológicos, inmunológicos y moleculares que se detallan a continuación.

2.7.1. Factores clínico-patológicos

Entre los factores pronóstico clínico-patológicos se incluyen el estadio del tumor y el volumen de ascitis, el grado del tumor, el subtipo histológico, el volumen de tumor residual tras la cirugía, y la edad y el estado general de la paciente⁹⁰:

- **Estadio del tumor y ascitis:** un menor estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico se asocia con una mejor respuesta y supervivencia a la enfermedad (Estadio I: 90%, II: 65-70%, III y IV: 20-30%). Desde un punto de vista clínico, un mayor estadio se relaciona con una enfermedad más extendida y una menor posibilidad de una cirugía citorreductora adecuada. La presencia de una efusión pleural maligna también se asocia con un peor pronóstico en estadios avanzados la enfermedad, así como la presencia de líquido ascítico en estadios tempranos⁹⁰.
- **Grado del tumor:** un mayor grado de diferenciación celular, en el que se tiene en cuenta la arquitectura celular, ploidia celular y la actividad mitótica, se asocia con una mejor supervivencia a esta enfermedad. Esto se debe a que las células poco diferenciadas presentan un mayor grado de mitosis aberrantes, lo que se asocia con un comportamiento más agresivo⁹⁰.
- **Subtipo histológico:** en el caso de los carcinomas serosos, los de alto grado son los que presentan un peor pronóstico. En estadios avanzados se ha visto que los carcinomas mucinosos y de células claras presentan un mal pronóstico⁹⁰.
- **Volumen residual tras la cirugía:** una mejor reducción quirúrgica del tumor junto con una quimioterapia adyuvante mejora la supervivencia a cinco años. De hecho, se ha observado que en los casos en los que el tamaño del tumor tras la cirugía es inferior a 1cm el pronóstico es más favorable que en aquellos de mayor tamaño. Asimismo, un menor tamaño antes de realizar la cirugía citorreductora también se asocia con una mejor supervivencia⁹⁰.
- **Edad:** generalmente una edad más temprana de diagnóstico se asocia con un mejor pronóstico en estas pacientes. De hecho, las mujeres de menos de 65 años presentan una supervivencia media mayor, de al menos dos años, que las mujeres mayores de esta edad. Los tumores en las pacientes más jóvenes suelen ser menos invasivos y estar más diferenciados⁹⁰.
- **Estado general:** un mejor estado general en la salud de las pacientes confiere una mejor tolerancia a las distintas modalidades terapéuticas (cirugía, quimioterapia) y permite la adopción de tratamientos más agresivos que pueden mejorar el pronóstico⁹⁰.

2.7.2. Factores inmunológicos

El cáncer epitelial de ovario clásicamente se ha considerado un tumor poco inmunogénico. Sin embargo, el sistema inmune ha mostrado en ciertas situaciones tener un papel importante en la carcinogénesis de este tejido (regresiones espontáneas del tumor, mecanismos de evasión del sistema inmune por parte del tumor o respuestas duraderas a inhibidores de los puntos de control inmunitario). Se han descrito distintos factores inmunológicos con un papel en el pronóstico del CO. Por ejemplo, una mayor cantidad de linfocitos T infiltrantes de tumores mejora la supervivencia. Asimismo, los pacientes con tumores ricos en células T presentan un periodo libre de enfermedad más largo y una supervivencia global aumentada, mientras que aquellos que presentan mecanismos de evasión al sistema inmune presentan una peor supervivencia. La expresión de ciertos antígenos HLA, implicados en el reconocimiento de la célula tumoral por el sistema inmune, también se podría relacionar con el pronóstico de pacientes con CO. Por ejemplo, se ha observado que una mayor expresión de HLA-G y una menor expresión de antígenos HLA de clase I podría ayudar a las células del tumorales a evadir el sistema inmune, pudiendo tener un papel en el pronóstico⁹⁰⁻⁹².

2.7.3. Factores moleculares

Los principales factores moleculares que se relacionan con el pronóstico de pacientes con CO son los descritos a continuación:

- **Marcador CA 125 en suero:** este marcador se suele correlacionar con el volumen del tumor. Antes de la cirugía, en pacientes con tumores en estadio I, valores superiores a 65 U/ml se correlacionan con un peor pronóstico. Durante el tratamiento quimioterápico, valores por encima de 70 U/ml tras el segundo ciclo de quimioterapia se asocian con un peor pronóstico y un mayor riesgo de recaída en los meses siguientes al de finalización del tratamiento. Durante el seguimiento de las pacientes, cualquier elevación en los niveles de este marcador indican recurrencia en la enfermedad^{90,93}.
- **Actividad proliferativa:** el análisis de marcadores de proliferación como Ki67 o PCNA permite medir la actividad mitótica de las células tumorales y tienen un valor pronóstico¹⁰⁷.
- **Ploidía celular:** aquellos tumores que presentan una aneuploidía en sus células y un bajo grado de diferenciación suelen presentar un peor pronóstico al asociarse con un mayor grado histológico (grado 3)^{90,93}.
- **Angiogénesis:** las metaloproteinasas son enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular y que tienen un papel fundamental en la expansión tumoral. Se ha observado que la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9 se podrían emplear como marcador predictivo de la recurrencia en pacientes con CO¹⁰⁴.
- **Alteraciones en receptores tirosina quinasa:** la sobreexpresión de ciertos receptores de factores de crecimiento, como EGFR o HER2, se ha asociado con un peor pronóstico. La sobreexpresión de HER2 se ha asociado en algunos estudios con una menor supervivencia¹⁰⁷.
- **Alteraciones en genes de reparación del DNA:** las alteraciones en los genes *BRCA1/2* se asocian con una menor diferenciación de las células tumorales y con ello con un peor pronóstico de las pacientes portadoras. Estas alteraciones aumentan el riesgo al desarrollo de tumores a una edad más temprana, cuyas células presentan un defecto en la reparación por recombinación homóloga.

Sin embargo, este defecto hace que las células sean más sensibles a agentes quimioterápicos junto con inhibidores de PARP por lo que presentan un mejor pronóstico. Por otro lado, se han descrito mutaciones en el gen *TP53* en práctica la totalidad de los carcinomas HGSC. Los tumores sin estas mutaciones suelen presentar una mayor resistencia al tratamiento con agentes quimioterápicos lo que se relaciona con una peor supervivencia⁹⁰.

2.8. Diagnóstico del cáncer de ovario

El cáncer de ovario en estadios tempranos (estadios I y II) se suele presentar como una única masa dominante en el ovario o las trompas de Falopio. Un tercio de los casos de CO se detectan en estadios tempranos y tienen un pronóstico muy favorable. Sin embargo, los dos tercios restantes se detectan cuando la enfermedad se ha diseminado a otros tejidos u órganos (estadios III y IV). El aspecto más característico CO en estadios más avanzados es la diseminación al peritoneo. Una vez que el tumor primario se extiende fuera de la superficie del ovario o de la trompa de Falopio, las células tumorales se diseminan por el fluido intraperitoneal. Este fluido circula continuamente por la cavidad abdominal y transporta estas células cancerosas que se depositarán en el peritoneo, especialmente en la pelvis, el hígado y el intestino. La diseminación a la pleura también es habitual en pacientes con este tumor^{38,94}.

La detección en estadios más avanzados se debe a que generalmente los estadios tempranos de la enfermedad son asintomáticos. Los estadios más avanzados presentan síntomas tanto específicos como inespecíficos de este tipo de tumor⁹⁵:

- **Inespecíficos:** los más frecuentes son el dolor de espalda, el cansancio, el dolor o el aumento del tamaño abdominal, el estreñimiento y algunos problemas urinarios⁹⁵.
- **Específicos:** suelen aparecer con el progreso de la enfermedad. Los más frecuentes son la obstrucción intestinal o uretral o la dificultad en la respiración^{95,96}.

En la clínica, cuando una paciente llega con algún síntoma de los descritos anteriores y si además presenta algún factor de riesgo, se puede sospechar de un carcinoma ovárico y para su diagnóstico se llevan a cabo distintas pruebas:

1. **Examen físico:** las pacientes con síntomas se deben someter a un examen físico completo incluyendo un examen recto-vaginal. Frecuentemente, presentan un aumento del tamaño abdominal y una masa palpable. En la zona pélvica, se puede detectar nodularidad o un incremento en el tamaño del ovario; así como ganglios inguinales o cervicales de mayor tamaño al habitual. A nivel cardiovascular, se puede presentar taquicardia, trombosis venosa y edema, y a nivel pulmonar, una disminución en los sonidos respiratorios en las bases pulmonares^{94,95}.
2. **Ecografía transvaginal:** esta prueba permite ver la arquitectura y vascularización del ovario y diferenciar entre quistes y masas sólidas y detectar ascitis. La sensibilidad para discriminar entre lesiones benignas y malignas de esta prueba es muy alta por lo que tiene una gran utilidad en pacientes con sospecha de CO⁹⁴⁻⁹⁶.
3. **Técnicas de imagen:** la tomografía computarizada o la resonancia magnética nuclear del tórax, el abdomen y la pelvis se emplean para detectar metástasis peritoneales^{94,95}.

- 4. Análisis de marcadores tumorales en sangre periférica:** el antígeno CA 125 es el biomarcador más empleado. Este antígeno aparece elevado en el 80% de los carcinomas epiteliales de ovario, pero solo en el 50% de los que se encuentran en estadios iniciales. No obstante, este antígeno puede aparecer elevado en condiciones benignas como la endometriosis o los fibromas por lo que su utilidad es limitada. Habitualmente, se emplea este biomarcador junto al antígeno CA 19-9 y al antígeno carcinoembrionario CEA. En la actualidad se están estudiando otros biomarcadores séricos como la proteína del epidídimo humano (HE4), una glicoproteína que se expresa en un tercio de los CO negativos para CA 125. Esta proteína se está utilizando para evaluar la progresión y recurrencia de la enfermedad. Para la detección de carcinomas no epiteliales de ovario se suele emplear la inhibina A/B como biomarcador de tumores de células de los cordones sexuales o estromales y la cuantificación de la α -fetoproteína del suero y de la gonadotropina humana coriónica como biomarcador de tumores de células germinales^{94,95}.

2.9. Caracterización molecular del cáncer de ovario

Durante los últimos años, distintos estudios, como el proyecto Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, de sus siglas en inglés *The Cancer Genome Atlas*), han analizado los perfiles moleculares (DNA, RNA mensajero, proteínas y epigenética) de distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de ovario. Estos estudios han permitido avanzar en el conocimiento que se dispone de estas neoplasias^{14,97,98}.

Los estudios genómicos en CO han empleado dos aproximaciones: los estudios de secuenciación del exoma completo (WES) y los estudios de secuenciación del genoma completo (WGS). Los estudios WES se basan en la secuenciación de las regiones codificantes mientras que en los estudios de WGS se secuencian tanto las regiones codificantes como no codificantes del genoma. Mediante estos estudios genómicos se encontró que los carcinomas serosos de alto grado presentan mutaciones en el gen *TP53* en la práctica totalidad de los casos (96%) y mutaciones germinales en el 8% de los casos en *BRCA1* y en el 9% de los casos en *BRCA2*. Asimismo, se identificaron mutaciones recurrentes en el 2-6% de los casos en los genes *RB1*, *NF1*, *FAT3*, *CSMD3*, *GABRA6* y *CDK12*, alteraciones en el número de copias de 113 genes, entre los que se encuentra *CCNE1* y *MYC* y cambios en los patrones de metilación de la región promotora de múltiples genes. El análisis integrativo de estas alteraciones genéticas ha permitido identificar vías de señalización alteradas de manera recurrente, como la vía de PI3K/AKT/mTOR, de MAPK/ERK, de histonas metiltransferasas o de reparación del DNA. En concreto, se ha observado una alteración en la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga (HRR) en el 50% de los casos, así como la amplificación o ganancia del gen *CCNE1* en el 20% de los casos, que se asocia con una interrupción de esta vía de reparación y un peor pronóstico^{14,97,98}.

Por otra parte, los estudios transcriptómicos de CO empleando *microarrays* y la secuenciación del RNA (RNA-seq) han permitido identificar distintos subtipos moleculares de CO, así como biomarcadores para la detección de este tipo de tumor (PAX8, CDH1, FOXA2, IGF1BP4). Además, han aportado gran información sobre los mecanismos de desarrollo de resistencias al tratamiento quimioterápico estándar^{94,95}.

Teniendo en cuenta todos estos estudios, los tumores de ovario presentan alteraciones en múltiples vías de señalización, si bien las alteraciones más recurrentes son aquellas implicadas en vías de reparación del DNA y las rutas MAPK/ERK,

mTOR/PI3K/AKT y Wnt/ β -catenina. Asimismo, las alteraciones genéticas en los receptores ErbB, como HER2, son frecuentes en este tipo de cáncer así como alteraciones epigenéticas^{14,97}.

2.9.1. Alteraciones de las vías de reparación del DNA

El material genético se ve sometido a distintos tipos de estrés ocasionados tanto por factores endógenos propios de la célula como exógenos que pueden ocasionar daños en éste. Los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno resultado de los procesos metabólicos son altamente reactivos y pueden alterar las bases nitrogenadas del DNA. La luz ultravioleta, distintos tipos de radiación, las aminas aromáticas, así como ciertos metales o fármacos, pueden generar directa o indirectamente daños en el DNA. Las alteraciones en el DNA pueden ser de distintos tipos: modificaciones de las bases nitrogenadas, entrecruzamientos, roturas de cadena simple (SSB) o roturas de doble cadena (DSB) (**Figura 5**). Las células presentan múltiples vías de señalización para reparar este daño, ya que una acumulación de daño en el material genético puede generar reordenamientos cromosómicos, mutaciones, la pérdida de material genético y todo ello puede conducir a la muerte de la célula. Todas estas vías están controladas por múltiples proteínas, entre las que se incluye la proteína p53. En los tumores de ovario, se han identificado alteraciones recurrentes en el gen *TP53*, así como en todas las vías de reparación del DNA, que se explican en mayor detalle a continuación⁹⁹⁻¹⁰¹.

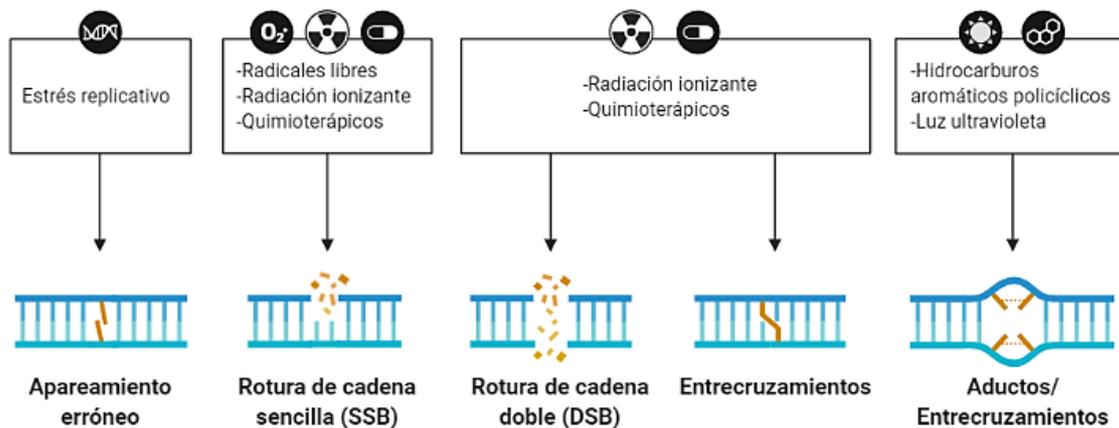


Figura 5. Principales causas del daño en el DNA y daño generado en el mismo. Creado con la herramienta Biorender.

El gen *TP53* es un gen supresor de tumores que codifica la proteína p53. Cuando se genera un daño en el DNA, esta proteína se activa y regula la transcripción de distintos genes claves en el mantenimiento de la integridad genómica. Entre sus funciones está el control del ciclo celular o de los procesos de senescencia celular, autofagia, apoptosis y reparación del DNA. La alteración genética más frecuente en CO es la mutación de *TP53*. De hecho, se han identificado mutaciones patogénicas en el 97% de los casos de HGSC, siendo más frecuentes las mutaciones de cambio de sentido (*missense*) en las regiones que codifican los dominios de unión al DNA de p53. Estas mutaciones aparecen en estadios tempranos de la enfermedad y se consideran mutaciones *driver* en la carcinogénesis del ovario, tras las cuales se darían pérdidas de heterocigosidad de los cromosomas que contienen tanto *TP53*, como *BRCA1* y *BRCA2*. Además, existen polimorfismos en *TP53* que modifican el riesgo a desarrollar CO¹⁰²⁻¹⁰⁴.

La **vía de reparación directa** es la encargada de reparar el DNA tras la exposición a distintos carcinógenos que generan una metilación de las bases nitrogenadas timina y guanina. Una de las principales enzimas encargadas de esta reparación es la O⁶-metilguanina DNA metiltransferasa (MGMT) que elimina los grupos metilo de la guanina. En CO, se ha visto que la metilación del promotor del gen *MGMT* tiene un papel en el inicio de la carcinogénesis y se asocia a ciertos tipos patológicos (carcinomas no serosos)^{101,105}.

La **reparación por escisión de bases (BER)** se encarga de eliminar pequeñas lesiones en las bases y reparar SSBs. La implicación de defectos en la vía de reparación BER que se asocian con el CO no está bien definido, por la dificultad de estudiar esta vía de reparación independientemente a otras. Si bien, se han identificado polimorfismos en componentes de esta vía, como en la glicosidasa OGG1, que incrementan el riesgo a desarrollar este tipo de cáncer. Una alta expresión nuclear de la proteína APE1 también se ha asociado con el desarrollo de HGSC y se correlaciona con una peor supervivencia global y con una mayor resistencia a la terapia con platinos⁹⁹⁻¹⁰¹.

La **reparación por escisión de nucleótidos (NER)** se encarga de reparar lesiones voluminosas, distorsiones en la hélice y grandes aductos de DNA cuando solo una de las dos hebras está afectada. Esta vía es clave en las células tumorales para la reparación del daño generado tras el tratamiento quimioterápico con platinos, por lo que los defectos en NER se suelen asociar con una mejor supervivencia y periodo libre de enfermedad en pacientes con CO. Se estima que el 8% de los tumores HGSC presentan alteraciones en los genes que codifican las proteínas implicadas en esta ruta⁹⁹⁻¹⁰¹.

La **reparación por apareamiento erróneo (MMR)** se encarga de eliminar las bases desapareadas ayudando a mantener la estabilidad genómica. El defecto en la vía de reparación MMR, especialmente en las proteínas MLH1 y MSH6, se asocia con el síndrome de Lynch, un síndrome autosómico dominante que predispone a cáncer de colon, de endometrio y de ovario. Este síndrome, como se describió previamente, confiere entre un 10 y un 15% de riesgo de desarrollar CO de bajo grado o de células claras a edades tempranas. En CO esporádico también se han detectado alteraciones de esta vía, donde las regiones promotoras de los genes que codifican las proteínas de esta vía aparecen metiladas, lo que conduce al silenciamiento de estos genes⁹⁹⁻¹⁰¹.

Las DSBs pueden ser reparadas por dos vías: la de recombinación homóloga y la de unión de extremos no homólogos. Dada la relevancia de estas dos rutas a lo largo de este trabajo, a continuación, se describen en detalle ambas rutas y su alteración en CO.

2.9.1.1. Reparación del DNA por recombinación homóloga (HRR)

La recombinación homóloga es un mecanismo de reparación de DSBs muy conservado que tiene lugar durante las fases S y G2 del ciclo celular, ya que utiliza la cromátida hermana como molde para reparar la lesión. Cuando se detecta una rotura a, el complejo MRN constituido por Mre11, Rad50 y Nbs1 se une a ambos lados de la DSB y activa las quinasas que controlan los puntos de control del ciclo celular, deteniéndolo, y reclutando un mayor número de proteínas de reparación del DNA, entre las que se encuentra BRCA1. Este complejo además genera DNA de cadena sencilla junto a la rotura, gracias a la actividad exonucleasa de Mre11, que se requiere para el inicio de la recombinación. El DNA de cadena sencilla se extiende más allá del punto de rotura original. La proteína RPA junto con otras proteínas como BRCA2 o γ H2AX se encarga de recubrir y proteger la cadena de DNA sencilla generada y esto permite que Rad51

se una al extremo 3' de este DNA de cadena sencilla. En este momento Rad51 sintetiza en presencia de ATP un filamento nucleoproteico que busca un área de homología de esta cadena de DNA sencilla en la cromátida hermana. Cuando se encuentra un área de homología, este DNA de cadena sencilla invade la cromátida hermana por la región de homología (sinapsis) gracias a la actividad de Rad51. Se genera así un dúplex entre el DNA de cadena sencilla y el DNA homólogo de la cromátida hermana. Este dúplex se irá extendiendo a medida que se va leyendo y una DNA polimerasa va sintetizando el DNA tomando como molde la información de la cromátida hermana. Finalmente, se forma una estructura de cadenas entrecruzadas (uniones Holliday) que son resueltas por resolvasas (enzimas con actividad endonucleasa), reparándose el daño en el DNA (Figura 6)^{99-101,106,107}.

En el proceso global de HRR participan al menos 40 proteínas. Se estima que el 50% de los CO presentan mutaciones somáticas, en línea germinal o modificaciones epigenéticas en genes que alteran la expresión y la función de las proteínas implicadas en esta vía de reparación, produciéndose una deficiencia en la misma¹⁰⁸. Un ejemplo son las alteraciones en la proteína ATM, proteína encargada de fosforilar y activar a BRCA1 y a Rad51. En HGSC, se han descrito mutaciones en el gen *ATM* en el 2% de las pacientes que se asocian con resistencias al tratamiento con platinos¹⁰⁰. Asimismo, en casos de CO hereditario se han descrito mutaciones que alteran la función de las proteínas RPA, BRCA1, BRCA2 y del complejo MRN¹⁰⁰. Aproximadamente el 20% de los carcinomas HGSC presentan mutaciones en *BRCA1/2*, tal como se indicó anteriormente¹⁰⁰. Otro ejemplo, es el oncogén *EMSY* que puede silenciar el dominio de activación de BRCA2. Este gen se ha visto sobreexpresado en el 20% de los tumores HGSC¹⁰⁰. Por último, se ha descrito que la región promotora del gen *RAD51* aparece hipermetilada en el 3% de los pacientes con HGSC, lo que conduce a una deficiencia en la HRR ya que la hebra de DNA de cadena sencilla no puede invadir la cromátida hermana¹⁰⁰.

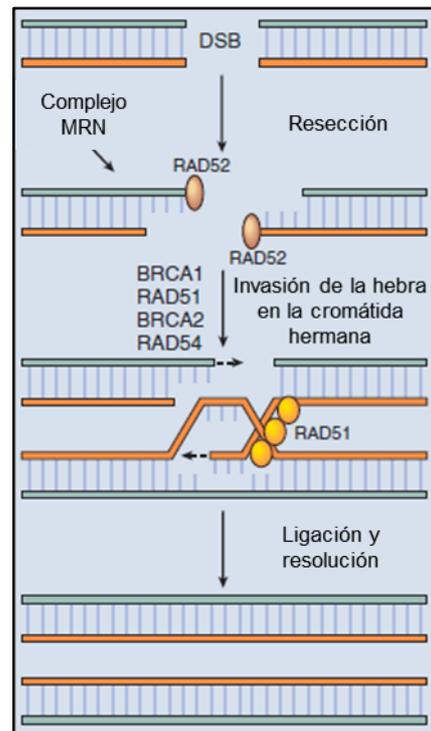


Figura 6. Esquema del proceso de reparación por recombinación homóloga, en el que se resumen las fases de este y las principales proteínas implicadas en el mismo. Adaptado de referencia¹⁰³.

2.9.1.2. Reparación del DNA por la unión de extremos no homólogos (NHEJ)

La reparación del DNA por la unión de extremos no homólogos, la otra vía principal de reparación de DSBs, permite unir cadenas por los extremos de la rotura sin necesidad de una secuencia complementaria. Esta vía es muy eficiente y rápida para la reparación de DSBs; sin embargo, puede darse una pérdida de nucleótidos a ambos lados de la rotura o una alteración de la secuencia de pares de bases en el punto de rotura. En general, esta pérdida o alteración no es crítica para la célula, puesto que el genoma es rico en secuencias repetitivas; sin embargo, tanto defectos como exceso en esta ruta de reparación pueden provocar inestabilidad genómica. La reparación por

NHEJ puede tener lugar en todas las fases del ciclo celular, si bien presenta una baja actividad en las fases S y G²^{99-101,109}.

La **vía clásica** de reparación por NHEJ requiere de la actividad de distintas proteínas: quinasas dependientes de DNA (DNA-PKs), Ku70, Ku80, la nucleasa Artemis, la DNA ligasa IV, la proteína XRCC4 y la proteína XLF. Cuando se detecta la rotura, el heterodímero de Ku70 y Ku80 se une a la rotura con una alta afinidad, protegiendo el DNA de la acción de las exonucleasas, y recluta DNA-PKs asociándose al dominio catalítico de éstas. Este heterodímero además permite el acoplamiento de otras proteínas requeridas para esta vía de reparación. Si los extremos del DNA de la rotura no son compatibles, se deben recortar los fragmentos de DNA de cadena sencilla, esto es llevado a cabo por nucleasas y DNA polimerasas, como Artemis. Una vez que los extremos son compatibles, se lleva a cabo la ligación gracias a un complejo constituido por XRCC4, XLF y la DNA ligasa IV. Este complejo genera un filamento que une los extremos y promueve la ligación eficiente (**Figura 7**)^{99-101,109}.

La **vía alternativa** de reparación por NHEJ está menos caracterizada. Esta ruta se activa cuando los mecanismos de HRR y NHEJ están inhibidos y se puede activar a lo largo de todo el ciclo celular, si bien es más lenta que la vía clásica. La vía alternativa es independiente del heterodímero formado por Ku70 y Ku80 y emplea regiones de microhomologías distantes al punto de rotura, por lo que se asocia con la pérdida de material genético y es altamente mutagénico. Las proteínas claves en esta vía son PARP1, la DNA ligasa III y XRCC1 y se cree que este proceso se ve promovido por la DNA polimerasa Θ . Durante este proceso, PARP1 reconoce la rotura de doble cadena y se une al DNA compitiendo con Ku70/80. XRCC1 y la DNA ligasa III forman un complejo que se encarga de ligar las roturas de doble cadena (**Figura 7**)^{99-101,110}.

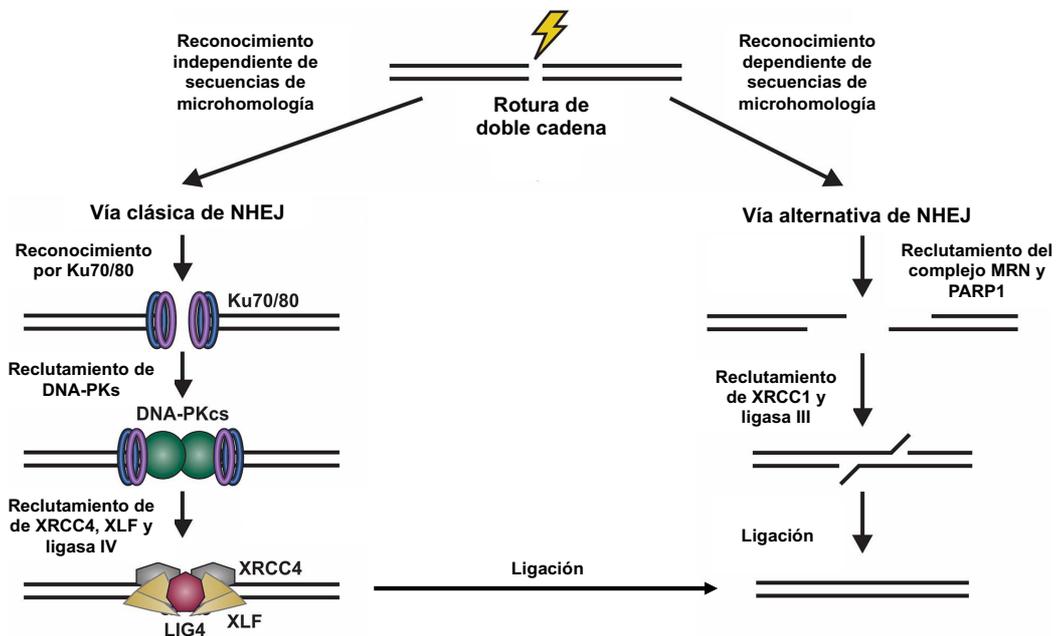


Figura 7. Esquema que resume el proceso de reparación del DNA por NHEJ, y las principales proteínas implicadas en el mismo. Adaptado de referencia¹⁰⁴.

En CO, la vía de reparación NHEJ está alterada en hasta el 50% de los tumores independientemente de la vía de reparación HR y parece conferir resistencia a los inhibidores de PARP. La desregulación de esta ruta se debe a alteraciones moleculares en los genes que codifican las proteínas implicadas en la misma, tanto en línea germinal

como somática¹⁰⁰. Por ejemplo, se ha descrito una alta expresión de DNA-PKs en HGSC que se correlaciona con un estadio avanzado de la enfermedad, así como con un alto grado, una peor supervivencia y una reducida sensibilidad a los platinos¹⁰⁰. Además, existen polimorfismos de nucleótido único en la DNA ligasa IV que se han asociado con un mayor riesgo a desarrollar CO. Estas variantes provocarían una pérdida de la funcionalidad de esta proteína que conduciría a una disfunción de esta vía y a una hipersensibilidad al daño¹⁰⁰. Otro ejemplo lo podemos encontrar en la DNA polimerasa Θ que promueve la reparación por la vía alternativa de NHEJ. Se ha identificado un incremento en la expresión de esta polimerasa en carcinomas serosos de ovario¹⁰⁰. Asimismo, existen polimorfismos en el gen *XRCC1* que se asocian con un peor pronóstico y una mayor resistencia al tratamiento con platinos. De hecho, se ha visto que tumores con una sobreexpresión de este gen muestran mayor resistencia a platinos, un mayor riesgo a la progresión tumoral y una menor supervivencia¹⁰⁰.

2.9.2. Alteraciones de la vía de Wnt/ β -catenina

La vía de Wnt/ β -catenina regula la proliferación celular, la polaridad, la supervivencia y la diferenciación de las células madre en la homeostasis de los tejidos embrionarios y adultos. Esta ruta está altamente regulada y una señalización alterada se ha asociado con el desarrollo de distintas enfermedades, entre las que se incluye el cáncer^{111,112}.

En ausencia de un ligando de Wnt, la proteína β -catenina se degrada por un complejo que contiene distintas proteínas como APC, CK1, GSK3 β , PP2A o AXIN1/2. Este complejo se une y fosforila a la β -catenina en residuos específicos de serina y treonina, marcando a esta proteína para la ubiquitinación y su degradación por el proteosoma. Cuando aparecen ligandos de Wnt, la coactivación de Frizzled y LPR5/6 evita la formación del complejo de destrucción de la β -catenina. Esta proteína se transloca del citoplasma al núcleo e interacciona con ciertos factores de transcripción, modulando la expresión de genes diana de Wnt (**Figura 8**)^{111,112}.

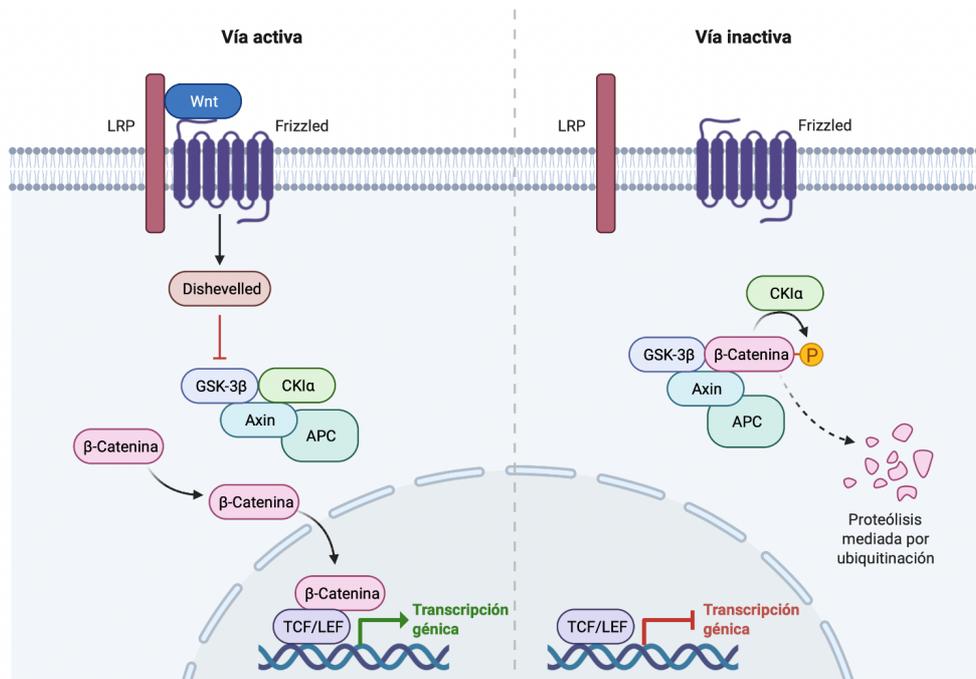


Figura 8. Esquema de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Creado con la herramienta Biorender.

El papel de esta vía de señalización en el mantenimiento de las células madre tumorales, la metástasis y la quimiorresistencia se ha descrito en todos los subtipos de cáncer de ovario epitelial. Además, distintos estudios apuntan a que esta vía está involucrada en la angiogénesis de los tumores ováricos, así como en la evasión del sistema inmune de estos tumores^{111,112}.

La alteración genética más habitual en esta vía se da en el gen *CTNNB1*, que codifica la β -catenina. Estas mutaciones generan una hiperactivación de esta vía y suelen afectar al dominio aminoterminal de la β -catenina, que es el que se fosforila para marcar la proteína para su degradación, por lo que esta proteína se acumula en el núcleo y aumenta la transcripción génica. Estas mutaciones son especialmente frecuentes en los carcinomas endometrioides, apareciendo en el 50% de los casos, y aparecen en algunos casos de carcinoma mucinoso. Asimismo, se han observado mutaciones en los genes que codifican proteínas del complejo de destrucción de la β -catenina, como *APC*, *AXIN* o *GSK3 β* , en carcinomas de ovario. Estas alteraciones reducen la actividad de las proteínas que forman este complejo. En HGSC se ha identificado una mayor actividad de la β -catenina, si bien los mecanismos que conducen a esta hiperactivación no están bien definidos. En general, se atribuye a una expresión anormal o la activación de componentes reguladores de esta vía. De hecho, la sobreexpresión de distintos ligandos de esta vía, como R-Spondin 1, Wnt-1, Wnt-5A y Wnt-7A, se han asociado con un peor pronóstico y supervivencia de los pacientes con CO. Asimismo, se ha descrito una expresión a la baja de algunos inhibidores de esta vía, como DKK1/2, por mecanismos epigenéticos y su menor expresión se correlaciona con el estadio del tumor. Existen además múltiples microRNAs alterados en tumores de ovario que modifican la expresión de proteínas de la vía, como el miR939 cuya expresión está incrementada en algunos pacientes e inhibe la expresión de la proteína APC y con ello activa esta vía^{111,112}.

2.9.3. Alteraciones de la vía de MAPK/ERK

La vía de señalización canónica de MAPK, también denominada Ras-Raf-MEK-ERK, se activa cuando se une una señal extracelular a receptores de membrana, por ejemplo, EGFR. Dicha unión activa la GTPasa Ras que, a su vez, activa una serie de quinasas. Esta vía de señalización está compuesta por distintas quinasas que actúan a distintos niveles (**Figura 9**)¹¹³:

- En el primer nivel se encuentran las quinasas de la familia de Raf: A-RAF, B-RAF y RAF-1/C-RAF¹¹³.
- En el segundo nivel se encuentra la familia de quinasas de MEK: MEK1 y MEK2¹¹³.
- En el último nivel se encuentran la familia de quinasas ERK: ERK1 y ERK2, que son los efectores finales de la ruta de MAPK. La fosforilación de ERK conduce a la activación de múltiples sustratos. La localización celular de ERK determina las dianas que se activarán y con ello el efecto a nivel celular. Cuando se encuentra en el citoplasma, ERK fosforila proteínas del citoesqueleto implicadas en el movimiento y el tráfico celular, así como con el metabolismo, la adhesión y la regulación de otras vías de señalización. Entre los ligandos citoplasmáticos se encuentra la quinasa S6 o la quinasa GSK3. Poco después de la activación de la vía, ERK se transloca al núcleo donde regula la transcripción, fosforilando y activando distintos factores de transcripción que promueven la progresión del ciclo celular¹¹³.

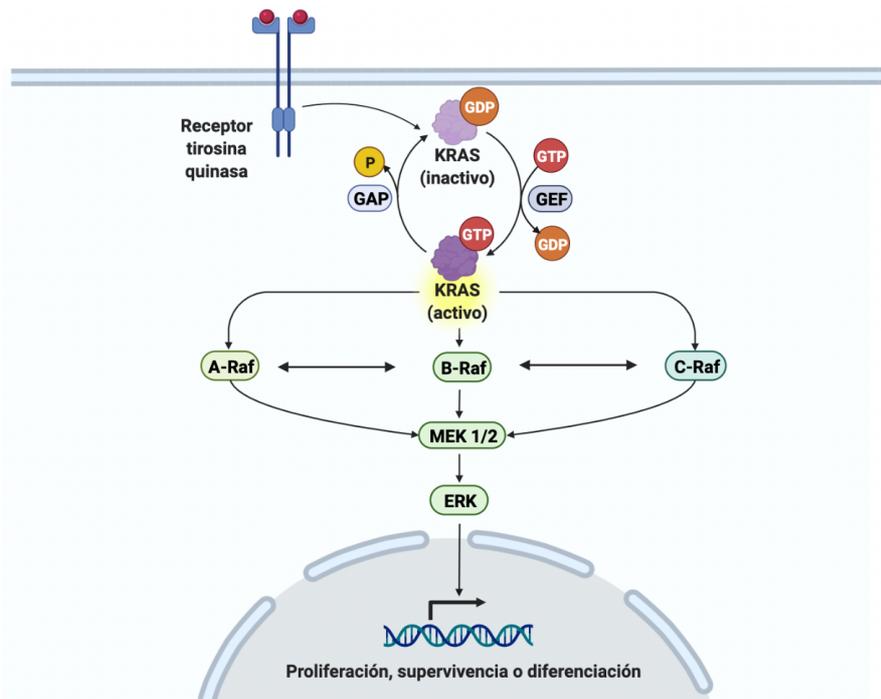


Figura 9. Esquema de la vía de señalización de MAPK. Creado con la herramienta Biorender.

En CO, las alteraciones en los genes *BRAF* y *KRAS* son frecuentes. El gen *KRAS* aparece alterado frecuentemente en cáncer. La mayoría de las mutaciones que se dan en este gen tienen lugar en los codones 12,13 o 61, que conducen a una activación constitutiva de la actividad GTPasa de las proteínas Ras y a una estimulación del crecimiento celular. Las mutaciones en *KRAS* en tumores mucinosos de ovario, en carcinomas serosos de bajo grado y en tumores serosos *borderline* son frecuentes, estando presentes en aproximadamente el 50% de los tumores mucinosos. Estas mutaciones suelen ser puntuales y aparecen en los codones 12 o 13. Se han identificado también mutaciones en un 10% de los casos de carcinomas endometrioides, así como en carcinomas de células claras. El gen *BRAF*, que codifica una proteína perteneciente a la familia Raf, también aparece frecuentemente mutado en cáncer. En CO, se han identificado mutaciones puntuales en este gen en el 6% de los tumores. La mutación más frecuente en este gen se da en el codón 600 que da lugar a un cambio del aminoácido valina por ácido glutámico (p.V600E). Esta mutación genera una sobreactivación de la vía MAPK-ERK. Las mutaciones de *BRAF* son frecuentes en tumores *borderline* serosos (20-70%), así como en carcinomas serosos de bajo grado, y aparecen con mucha menor frecuencia en carcinomas de células claras, mucinosos y endometrioides. Asimismo, se han identificado amplificaciones y sobreexpresión de este gen en torno al 10% de los HGSC^{113,114}.

2.9.4. Alteraciones de la vía de PI3K/AKT/mTOR

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR presenta un papel clave en la regulación de la supervivencia celular, el crecimiento, la proliferación, la angiogénesis, la transcripción y traducción y el metabolismo. Esta vía responde a distintas señales como factores de crecimiento (EGF, TGF u otros), receptores tirosina quinasa (EGFR, HER2), receptores de membrana como Met o a la vía de señalización de MAPK/ERK^{115,116}.

Las proteínas PI3K son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Existen 3 clases de proteínas PI3K (I, II y III), que difieren en

las subunidades que las componen; sin embargo, en los tres tipos tras la unión a residuos de fosfotirosina de los factores de crecimiento o de adaptadores se produce la activación de la subunidad catalítica y la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). El complejo PI3K se recluta así a la membrana plasmática y activa la quinasa PDK1 que fosforila a Akt, activándola. El PIP3 permanecerá en la membrana hasta que se desfosforile por fosfatasas como PTEN. Akt es una treonina serina quinasa que regula distintas dianas que controlan la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular y procesos metabólicos. Una diana de Akt es mTOR, que está compuesto por los complejos mTORC1 y mTORC2. Akt activa mTORC1 directamente fosforilándolo, o indirectamente fosforilando el complejo TSC2 (bloqueando así su actividad inhibitoria sobre este complejo). Cuando mTOR está activo fosforila a sus efectores como la quinasa S6 o el factor de iniciación de la traducción 4E-BP1 que promueven la angiogénesis y el progreso por el ciclo celular^{115,116}.

Existen distintos reguladores endógenos de esta vía, entre los que destaca las proteínas PTEN y INPP4B. PTEN actúa desfosforilando PIP3 a PIP2, mientras que INPP4B desfosforila PIP2 a fosfatidilinositol. Además, la subunidad reguladora de PI3K tiene una función supresora de tumores, ya que se une, estabiliza e inhibe la subunidad catalítica de esta proteína^{115,116}.

En la mayoría de los procesos carcinogénicos se produce una alteración de esta vía de señalización, incluido el ovárico. En este tipo de tumor, está frecuentemente activada (en el 70% de los casos), especialmente en los carcinomas de células claras y endometrioides. La activación se puede dar a través de distintos mecanismos^{115,116}:

- Activación aguas arriba de la ruta.
- Mutaciones o amplificaciones de ganancia de función en la subunidad catalítica de PI3K: este tipo de alteraciones se ha identificado en más del 20% de los casos de CO, especialmente en los carcinomas de células claras y endometrioides. Estas alteraciones se suelen asociar a una menor supervivencia en estos pacientes^{115,116}.
- Mutaciones en la subunidad reguladora PIK3: estas mutaciones son menos frecuentes, si bien se han identificado en un 4% de los casos de CO^{115,116}.
- Mutaciones o amplificaciones en alguno de los genes que codifican las tres isoformas de Akt: las mutaciones en las isoformas de *AKT* se han detectado en el 3-5% de los casos de CO.
- Mutaciones de pérdida de función o pérdida de *INPP4B*: la pérdida del gen *INPP4B* se ha detectado en un alto número de casos de CO (40%) y se ha asociado con una peor supervivencia global^{115,116}.
- Pérdida de *PTEN* por mutaciones de pérdida de función, deleciones homocigotas o hipermetilación de la región promotora del gen: la pérdida del gen supresor de tumores *PTEN* es muy frecuente en tumores endometrioides y también se da en un porcentaje de carcinomas serosos. Se ha demostrado que esta alteración se suele dar en estadios tempranos de la carcinogénesis. Además, se han identificados microRNAs, como el miR214, que suprimen la actividad de PTEN^{115,116}.

2.9.5. Alteraciones de los receptores de la familia ErbB

La familia de receptores tirosina quinasa ErbB está constituida por cuatro miembros: el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), HER2, HER3 y HER4. Estos receptores se encuentran en la membrana plasmática como monómeros siempre y cuando estén inactivos. A excepción de HER2, los ligandos se unen a estos receptores y éstos forman homo- o heterodímeros con otros receptores de la familia, especialmente con HER2 ya que este receptor tiene una gran actividad quinasa y se encuentra en una forma activada. Los ligandos de estos receptores se pueden dividir atendiendo a la especificidad por los distintos receptores: los que se unen específicamente a EGFR (como EGF y TGF), los que tienen especificidad por EGFR y HER4 y los que presentan especificidad por HER3 y HER4. Una vez que se ha producido la dimerización, estos receptores son capaces de activar múltiples vías de señalización aguas abajo, como la vía MAPK/ERK o la vía mTOR/PI3K/AKT, descritas anteriormente, que regulan la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis, la supervivencia y el metabolismo celular¹¹⁷.

La familia de receptores de la familia de ErbB se ha asociado con la progresión de distintos tipos de cáncer. En CO, la amplificación y/o sobreexpresión de los receptores EGFR, HER2 y HER3 se ha asociado con la progresión y el pronóstico de esta enfermedad¹¹⁷:

- **EGFR:** este receptor generalmente se expresa débilmente en los ovarios; sin embargo, se ha encontrado en múltiples estudios altamente expresado en carcinomas de este tejido. En estudios inmunohistoquímicos, se ha identificado una expresión incrementada de este receptor entre el 30 y el 70% de los tumores. Esta sobreexpresión se asocia con un bajo periodo libre de enfermedad, un grado tumoral avanzado, una mayor masa tumoral residual y una proliferación elevada. Asimismo, se ha sugerido que una expresión elevada en el estroma del tumor se asocia con una enfermedad más agresiva y la sobreexpresión en fibroblastos se correlaciona con una mayor capacidad de crecimiento y de migración de las células tumorales del ovario¹¹⁷.
- **HER2:** este receptor aparece sobreexpresado, principalmente por amplificaciones del gen *HER2/Neu*, en aproximadamente el 6-30% de los pacientes con carcinoma de ovario y se asocia con un mal pronóstico. Esta mayor expresión se da principalmente en los carcinomas mucinosos (19%) y de células claras (14%), siendo mucho menos frecuentes en tumores endometrioides (2%) y serosos (3%)¹¹⁷.
- **HER3:** este receptor carece de actividad tirosina quinasa y ha de ser fosforilada por otros receptores de la familia. HER3 aparece más frecuentemente expresado que EGFR y HER2 en tumores de ovario, si bien su expresión suele darse en lesiones iniciales o tumores *borderline*. Distintos estudios, han asociado una mayor expresión de este receptor con una peor supervivencia en estos pacientes y con resistencias al tratamiento¹¹⁷.
- **HER4:** su papel en CO no está claro, si bien en algunos estudios se ha encontrado una correlación entre la expresión de este receptor y la aparición de resistencias al tratamiento quimioterápico¹¹⁷.

2.9.6. Alteraciones de la autofagia

La autofagia es una vía intracelular clave para la degradación y reciclaje de macromoléculas (proteínas, lípidos o nucleótidos), orgánulos dañados o patógenos intracelulares. Este proceso es complejo y está altamente regulado, siendo importante para el desarrollo y la diferenciación celular. Su desregulación se ha asociado con distintas patologías como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas o desórdenes metabólicos. Este proceso está altamente relacionado con distintas vías de señalización como la de PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK¹¹⁸⁻¹²¹.

Hasta el momento se han descrito tres tipos de autofagia en eucariotas que se distinguen en la forma en que se libera el material citoplasmático a degradar a los lisosomas¹¹⁸⁻¹²⁰:

- **Macroautofagia:** la membrana del autofagosoma se genera a partir del retículo endoplasmático y rodea el material a degradar, tras lo cual se fusiona con un lisosoma para la digestión de su contenido. En este trabajo, se empleará el término autofagia para referirnos a este tipo de autofagia puesto que es el más frecuente¹¹⁸⁻¹²⁰.
- **Microautofagia:** en este caso, se produce una fagocitosis directa por parte del lisosoma de las proteínas a degradar¹¹⁸⁻¹²⁰.
- **Autofagia mediada por chaperonas:** en este tipo de autofagia, las proteínas a degradar se unen a las chaperonas celulares tras lo cual se liberan al lisosoma para su degradación¹¹⁸⁻¹²⁰.

La autofagia consiste en la generación de una vesícula de doble membrana (autofagosoma) que rodea porciones del citoplasma. Posteriormente, el autofagosoma se fusionará con el lisosoma, generándose el autofagolisosoma, cuyo interior será degradado por hidrolasas lisosomales. El proceso se puede dividir en tres etapas (**Figura 10**)^{118,120,121}:

1. **Inducción del fagoporo:** el inicio de la formación del autofagosoma depende principalmente del complejo ULK1. La actividad de este complejo está regulada negativamente por mTORC1 y se ve activada por AMPK. Cuando este complejo se activa, se transloca al retículo endoplasmático y se asocia con Beclin-1 y VMP1. Esto favorece la actividad de un complejo con actividad PI3K compuesto por ATG14L, AMBRA1, VPS15, Beclin-1 y VPS34 (PI3K de clase III) que forma la membrana del fagoporo, generándose PIP3¹¹⁸⁻¹²⁴.
2. **Elongación del fagoporo:** para la elongación del fagoporo se requieren dos pasos de conjugación de tipo ubiquitina. El primero de ellos genera la conjugación de ATG12 a ATG5, catalizada por ATG7 y ATG10. El conjugado ATG5-ATG12 forma entonces un complejo multiproteico con ATG16L1. El segundo de ellos está mediado por ATG3 y ATG7 que, junto con el complejo ATG5-ATG12-ATG16L1, son responsables de la modificación de LC3B con fosfatidiletanolamina (PE). LC3B es liberado previamente gracias a la actividad de ATG4. LC3B conjugado con PE (LC3-II) se incorpora a la membrana interna del autofagosoma. El complejo ATG9 también participa en la extensión de la membrana del fagoporo¹¹⁸⁻¹²⁴.

3. **Maduración del autofagosoma y degradación del material celular:** los autofagosomas se fusionan con lisosomas o con endosomas tardíos que luego se fusionarán con el lisosoma. La membrana del autofagosoma, durante la maduración, incorpora proteínas de la membrana lisosomal como LAMP1, LAMP2 y V-ATPasa que acidifican el lumen de este. La fusión también proporcionará enzimas hidrolíticas al autofagosoma. Tras esta fusión, se producirá la digestión de la carga autofágica por las distintas hidrolasas lisosomales¹¹⁸⁻¹²⁴.

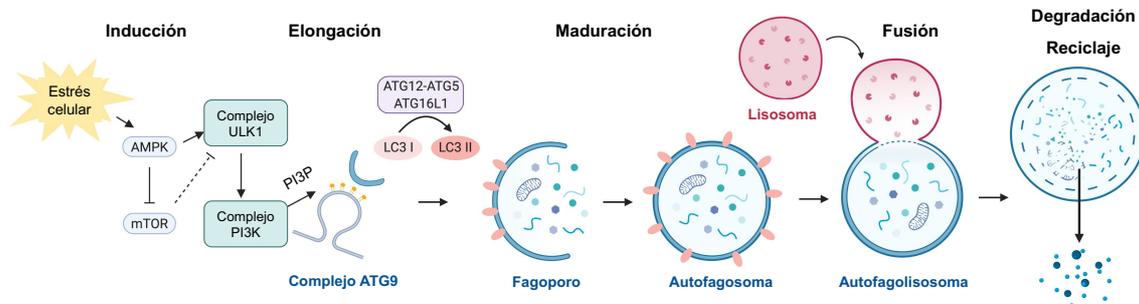


Figura 10. Esquema del proceso de autofagia. Adaptado de referencia¹²⁴.

La autofagia presenta un papel dual en procesos carcinogénicos, puesto que puede actuar con una función citotóxica o citoprotectora. En general, niveles bajos de autofagia contribuyen a la proliferación celular y se suelen detectar en estadios tempranos de la enfermedad mientras que niveles elevados favorecen la supervivencia celular en situaciones de estrés metabólico y suelen aparecer en estadios más avanzados de la enfermedad. En el caso de la carcinogénesis ovárica, se han detectado alteraciones en este proceso que podrían relacionarse con la patogénesis así como con la resistencia a los tratamientos quimioterápicos y las recidivas^{119,121,125,126}.

- Generalmente los tumores ováricos agresivos, poco diferenciados y en estadios III y IV presentan niveles bajos de la proteína LC3, lo que es indicativo de que los autofagosomas no se acumulan en estos tumores y que el proceso autofágico está activo^{119,126}.
- Se ha encontrado la delección del gen que codifica la proteína Beclin-1 en el 40-75% de los casos de CO esporádico. Además, se ha descrito expresión regulada a la baja de este gen en tumores ováricos comparado con su expresión en lesiones benignas, indicativo de una activación de la autofagia en procesos carcinogénicos. Asimismo, las pacientes con una mayor expresión de Beclin-1 presentan una mayor supervivencia^{119,126}.
- Se ha observado que una alta expresión de la proteína LC3 y de Beclin-1 se relaciona con una buena respuesta quimioterápica en las pacientes¹²⁶.
- Durante el proceso de autofagia la proteína p62 se une a LC3 para la degradación de agregados proteicos ubiquitinados por el autofagosoma. Por lo que un descenso en los niveles de esta proteína se asocia con una inducción proceso autofágico. En tejido tumoral se ha observado una elevada expresión de p62 y se asocia con estadios avanzados, la presencia de tumor residual y un bajo ratio de supervivencia¹¹⁹.
- Se ha descrito que un gen regulador de la autofagia, DRAM, se asocia con la progresión de los tumores de ovario. De hecho, se ha visto que el homólogo DRAM2 se expresa en niveles muy bajos en tumores agresivos de ovario¹²⁶.

2.9.7. Alteraciones epigenéticas

Clásicamente, se ha considerado que el cáncer se origina por alteraciones genéticas; sin embargo, el papel de los cambios epigenéticos (alteraciones de la expresión génica sin que se den modificaciones en la secuencia de DNA) en la generación de los tumores está cada vez mejor definido. Existen evidencias de que cambios en el epigenoma tienen un papel importante en la carcinogénesis del ovario y en la progresión de los tumores malignos del ovario. La epigenética incluye las siguientes modificaciones del DNA: la metilación del DNA, el reposicionamiento de los nucleosomas, la modificación de las histonas y la regulación génica a través de microRNAs, aunque la inclusión de este último grupo como modificación epigenética resulta más controvertida. Las dos rutas más alteradas durante el desarrollo tumoral son la de la metilación del DNA y la de la modificación de las histonas¹²⁷⁻¹²⁹.

2.9.7.1. Metilación del DNA

La metilación del DNA se produce en el carbono 5 de los residuos de citosina, generalmente en secuencias de dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpG) y provoca una inhibición de la transcripción génica. En el genoma existen islas CpG, secuencias ricas en CpG, en los promotores de genes ampliamente expresados que generalmente están protegidas de la metilación. Esta metilación está regulada por una familia de enzimas, las DNA metiltransferasas^{127,128}.

En el genoma de distintos tumores, se ha confirmado que en un 5-10% de las islas CpG aparece una metilación que en condiciones normales no se encuentra. Esta metilación aberrante provoca el silenciamiento de distintos genes supresores de tumores, así como de reguladores del crecimiento celular, de la angiogénesis y de la reparación del DNA. En CO, a nivel global se observa una hipometilación en las secuencias de DNA correspondiente a los microsatélites (secuencias cortas de DNA altamente repetitivas), lo que se asocia con una inestabilidad genómica y se correlaciona con una enfermedad avanzada y un pronóstico menos favorable. Sin embargo, existe una hipermetilación de ciertas islas CpG, que se asocia con la progresión de la enfermedad y con una menor supervivencia. Entre el 15 y el 35% de pacientes con CO esporádico presentan una hipermetilación de la región promotora de *BRCA1*. Además, se ha visto un silenciamiento de otros genes supresores de tumores en pacientes con CO, como *TP53*, *MLH1* o *P16*. Una elevada expresión de DNA metiltransferasas se ha asociado con el desarrollo de resistencias a platinos^{127,128}.

2.9.7.2. Acetilación de las histonas

Las histonas son proteínas encargadas de empaquetar el DNA en los nucleosomas, los cuales constituyen la unidad funcional de la cromatina. La modificación de estas histonas a nivel de sus colas amino-terminales está regulada por distintas enzimas y conduce a una alteración de la estructura de la cromatina y con ello se ve afectada la expresión génica. Se han descrito al menos ocho modificaciones en las histonas: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, sumoilación, ADP ribosilación y carbonilación¹²⁷⁻¹²⁹.

La acetilación de los residuos de lisina de las colas amino-terminal de las histonas conduce a una apertura de la compactación de la cromatina que permite la transcripción génica y está mediado por las histonas acetiltransferasas. La deacetilación de las histonas está regulada por las histonas deacetilasas (HDACs) y su actividad conduce a un incremento de la compactación y a una represión de la transcripción génica. La

familia de HDACs incluye 18 isoenzimas clasificados en cuatro clases (I-IV) en base a su homología con las HDACs de las levaduras y la semejanza en sus secuencias¹²⁷⁻¹²⁹:

- **Clase I:** está constituido por enzimas dependientes de zinc localizadas en el núcleo celular. En este grupo se incluyen la HDAC1, 2, 3 y 8. La HDAC3 es capaz de desplazarse entre el núcleo y el citoplasma¹²⁹.
- **Clase II:** está formado por enzimas dependientes de zinc que se pueden desplazar entre el núcleo y el citoplasma. Esta clase está constituida por la HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10¹²⁹.
- **Clase III:** en este grupo encontramos enzimas dependientes de NAD⁺ y está formado por las sirtuinas 1-7 que tienen distintas proteínas como diana, tanto histonas como otro tipo de proteínas¹²⁹.
- **Clase IV:** en este grupo encontramos la HDAC11, enzima dependiente de zinc, que comparte propiedades con la clase I y II¹²⁹.

En múltiples tumores, incluidos los carcinomas de ovario, se ha detectado altos niveles de expresión HDACs, lo que conduce a bajos niveles de acetilación en las histonas y a una represión de la expresión de ciertos genes. En concreto, en los tumores de ovario se da un incremento en las distintas clases de HDAC¹²⁷⁻¹²⁹:

- **Clase I:** la expresión de HDACs va aumentando gradualmente en la transición desde un tumor benigno hasta un carcinoma. Por lo que estas proteínas presentan un papel importante en la carcinogénesis del ovario y se asocian así con la progresión tumoral (aumento de la proliferación y migración celular, así como con la metástasis) y con un peor pronóstico de estas pacientes, así como con el desarrollo de resistencia a platinos. La expresión de HDACs difiere entre los distintos subtipos histológicos, siendo más elevada en los carcinomas mucinosos, seguido por los serosos de alto grado, los de células claras y los endometrioides. En este tipo de cáncer, la HDAC1 promueve la proliferación celular a través de la ciclina A, la HDAC2 remodela la cromatina en respuesta a terapias basadas en platinos y HDAC3 facilita la migración celular al suprimir la expresión de la E-cadherina¹²⁷⁻¹²⁹.
- **Clase II:** se ha descrito que la sobreexpresión de HDAC7 junto con HDAC1 ayudan al mantenimiento de las células madre tumorales. Asimismo, la acumulación de HDAC4 suprime la expresión de p21, lo que facilita la proliferación, aumenta el potencial de invasión y promueve la migración. En el caso de la HDAC 9 y 10, ambas son necesarias para la recombinación homóloga y estudios recientes sugieren que el uso de inhibidores de HDAC10 aumentarían la respuesta a platinos en CO¹²⁹.
- **Clase III:** la sirtuina 1 se cree que podría contribuir al desarrollo de carcinoma de ovario, observándose un incremento en su expresión en tumores malignos, especialmente en los carcinomas serosos. Esta proteína inactiva p53 por deacetilación permitiendo que las células con DNA dañado continúen dividiéndose y con ello se acumulen mutaciones. Asimismo, esta deacetilasa regula la transición epitelio-mesenchimal y está implicada en la resistencia a los tratamientos con platinos. Por otro lado, la sirtuina 6 presenta una función supresora de tumores, y en carcinoma de ovario se ha visto una regulación a la baja de su expresión, lo que se asocia con un peor pronóstico¹²⁹.

2.9.7.3. ARID1A

La proteína nuclear ARID1A está codificada por el gen del mismo nombre y se caracteriza por presentar un dominio ARID de unión al DNA que permite su unión de manera no específica. Esta proteína regula distintos procesos celulares como la proliferación o la diferenciación celular. Su expresión está regulada a lo largo del ciclo celular, siendo más alta durante la fase G0/G1 que en las fases S o G2/M^{130,131}.

ARID1A forma parte del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF que se encarga de reposicionar, eliminar o cambiar nucleosomas, lo que modula la accesibilidad al DNA y con ello los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA. Este complejo parece presentar un papel como supresor de tumores. Asimismo, ARID1A puede interactuar directamente con otras proteínas como con p53 o receptores hormonales, como el receptor de glucocorticoides^{130,131}.

El complejo SWI/SNF es el regulador de la cromatina más frecuentemente mutado en cáncer. Las mutaciones inactivadoras del gen *ARID1A* o la pérdida de este gen se identifican en distintos tipos de cáncer siendo mucho más habituales en tumores ginecológicos especialmente de endometrio y ovario. En el caso del CO, son frecuentes estas alteraciones en los carcinomas de células claras (46-57% de los casos) y en los endometrioides (30% de los casos). La pérdida de la expresión de esta proteína se ha identificado como una de las primeras alteraciones en la transformación maligna de una endometriosis atípica en un carcinoma endometrioide o de células claras^{130,131}.

2.10. Tratamiento del cáncer de ovario

2.10.1. Tratamiento convencional del carcinoma epitelial de ovario

Como se ha descrito previamente, la mayoría de los carcinomas de ovario se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad. Teniendo en cuenta el estadio del tumor, el tratamiento convencional del CO varía^{94,132}. No obstante, la primera línea de tratamiento quimioterápico en CO incluye el uso combinado de platinos (carboplatino o cisplatino) y taxanos (paclitaxel o docetaxel). Estos compuestos actúan sobre las células tumorales por distintos mecanismos y presentan distintos efectos celulares:

- **Platinos:** su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de DNA de las células tumorales. Cuando estos compuestos entran en las células, se cargan positivamente y migran al núcleo al verse atraídos por la carga negativa del DNA. Una vez en el núcleo, se unen al DNA donde provocan entrecruzamientos en la misma hebra o en la hebra complementaria induciendo un daño en el DNA. Estos agentes también inhiben la replicación del DNA y generan una parada del ciclo celular en la fase G2/M que puede acabar dando lugar a procesos de muerte celular programada¹³³.
- **Taxanos:** el mecanismo de acción de los taxanos se basa en su unión a los microtúbulos. Los taxanos se unen a la tubulina por el sitio de unión del paclitaxel. Cuando se produce esta unión, estabilizan los contactos entre los protofilamentos, promoviendo así el ensamblaje de los microtúbulos. Su efecto celular depende de la dosis empleada. A bajas concentraciones, alteran la dinámica de los microtúbulos, evitando que las células completen el proceso de mitosis, lo que conduce a una acumulación de células en la fase G2/M del

ciclo celular y a la muerte celular por apoptosis. Por otro lado, a altas concentraciones inhiben la despolimerización de los microtúbulos^{134,135}.

A continuación, se detalla el tratamiento convencional del CO en función del estadio del tumor.

2.10.1.1. Tratamiento convencional en estadios I y II

El 30% de los casos de CO se diagnostican en estos estadios. Para estos casos, la cirugía puede ser suficiente para curar esta enfermedad y la supervivencia a 5 años es de aproximadamente el 90%. El uso de quimioterapia adyuvante no se recomienda en pacientes con un tumor grado 1 (bien diferenciado); sin embargo, en pacientes con grado 2 y 3 se recomienda un tratamiento con quimioterapia adyuvante basado en taxanos y platinos de 3-6 ciclos^{94,132}.

2.10.1.2. Tratamiento convencional en estadios III y IV

En estos casos el tratamiento estándar es la resección quirúrgica completa, si es posible, seguida de quimioterapia basada en taxanos y platinos o el uso de quimioterapia neoadyuvante seguida de una cirugía citorreductora de intervalo y una quimioterapia adicional. El grado de enfermedad residual tras la cirugía se ha visto que es un factor determinante de la supervivencia a largo plazo de estas pacientes. La supervivencia a 5 años de estas pacientes se encuentra entre el 10 y el 30%. En la actualidad existen cinco opciones terapéuticas que se consideran estándar para estas pacientes⁹⁴:

1. Cirugía citorreductora seguida de quimioterapia intravenosa basada en platinos o taxanos.
2. Cirugía citorreductora seguida de quimioterapia intraperitoneal o intravenosa.
3. Cirugía citorreductora seguida de quimioterapia intravenosa basada en platinos o taxanos combinada con bevacizumab, con mantenimiento con bevacizumab. El bevacizumab es un anticuerpo frente a VEGF, proteína clave en la angiogénesis del tumor.
4. Quimioterapia neoadyuvante con cirugía citorreductora de intervalo entre los ciclos 3 y 6, seguida de quimioterapia, teniendo en cuenta la posibilidad de una quimioterapia intraabdominal o intraperitoneal en pacientes con una resección completa.
5. Quimioterapia para aquellas pacientes que no pueden someterse a cirugía o que han progresado con la quimioterapia neoadyuvante.

La quimioterapia neoadyuvante consiste en la administración de quimioterapia antes de la cirugía para tratar de conseguir una resección quirúrgica completa en el momento de la cirugía. Como se describió previamente, la primera línea de tratamiento quimioterápico combina el uso de platinos y taxanos. En general, se recomienda el uso de 6 ciclos de carboplatino y paclitaxel cada 21 días, y que este tratamiento comience lo antes posible después de la cirugía (2-4 semanas después de ésta). Los pacientes candidatos a quimioterapia intraperitoneal suelen ser aquellos que presenten una enfermedad residual de menos de 1cm, mientras que aquellos que no hayan tenido una citoreducción óptima deben recibir este tratamiento por vía intravenosa^{38,94}.

2.10.1.3. Tratamiento convencional en enfermedad recurrente

El CO es muy sensible inicialmente al tratamiento con agentes quimioterápicos (taxanos y platinos). En primera línea de tratamiento, la quimioterapia suele tener tasas de respuesta en el 80% de los casos. Sin embargo, la mayor parte de las pacientes presentan una recaída en los dos primeros años incluso aunque hayan tenido una cirugía citorreductora óptima y hayan sido sometidas a los seis ciclos de quimioterapia basada en taxanos y platinos. Esto se debe a que aparecen resistencias al tratamiento. En función del periodo libre de enfermedad (tiempo que transcurre desde el último ciclo de quimioterapia y la recaída), las pacientes se pueden clasificar en^{136,137}:

1. **Platino-sensibles:** presentan un tiempo libre de enfermedad superior a 12 meses tras el último ciclo de quimioterapia¹³⁷.
2. **Parcialmente platino-sensibles:** la recaída se produce de 6 a 12 meses después del último ciclo de tratamiento¹³⁷.
3. **Platino-resistentes:** el periodo libre de enfermedad es inferior a 6 meses desde la última dosis de tratamiento¹³⁷.
4. **Platino-refractarios:** la progresión se produce durante la última quimioterapia basada en platinos o en los 4 meses siguientes a la última dosis¹³⁷.

El periodo libre de enfermedad se asocia con el tiempo de supervivencia de estas pacientes y la respuesta a una segunda línea de tratamiento, a mayor periodo libre de enfermedad mejor respuesta y mayor supervivencia¹³⁷. El tratamiento quimioterápico en segunda línea a seguir depende de esta clasificación. Cuando se trate de un tumor refractario o resistente, se pueden emplear distintos fármacos como la doxorubicina, bevacizumab, paclitaxel, gemcitabina o topotecan. En los casos de tumores platino-sensibles, se recomienda el uso de carboplatino junto a bevacizumab, doxorubicina, paclitaxel o gemcitabina. Por último, en el caso de los tumores parcialmente platino-sensibles, se usa carboplatino combinado con otro agente quimioterápico o trabectedina (Yondelis®) junto a doxorubicina. Asimismo, en pacientes platino-sensibles o con muy bajo volumen tumoral se puede considerar una segunda cirugía citorreductora¹³⁶.

Los mecanismos por los que aparecen resistencias al tratamiento con platinos y taxanos son múltiples, entre los que se incluyen los mecanismos intrínsecos de las propias células tumorales (mutaciones, cambios epigenéticos y alteración de los mecanismos de reparación del DNA) que les permiten adaptarse y sobrevivir al daño provocado por la quimioterapia, así como cambios en el microambiente que rodea al tumor, en la infiltración de las células del sistema inmune o en la angiogénesis y la hipoxia del tumor^{136,137}.

En el caso de los platinos, los mecanismos de resistencia más habituales son aquellos que limitan la formación de aductos entre el DNA y el platino y aquellos que evitan la muerte celular. Las células limitan la generación de aductos incrementando la expulsión de fármaco de las células gracias a los transportadores ATP7A/B o gracias a la internalización del transportador de cobre 1 de la membrana plasmática. Por otro lado, distintas proteínas intervienen en la conversión de cisplatino en formas inactivadas, no tóxicas para las células, como son la glutatión transferasa π o la γ -glutamylcisteína sintetasa. Asimismo, nuevas alteraciones en las vías de reparación del DNA pueden limitar la respuesta a los platinos tras el inicio del tratamiento^{133,138}.

Por su parte, la resistencia a los taxanos se produce principalmente por dos mecanismos: la modulación del proceso de apoptosis y la alteración en la capacidad de expulsar fármaco por parte de las células. En el caso del proceso de apoptosis, las

células cambian la expresión de proteínas que controlan este proceso, incrementando la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, y reduciendo la expresión de proteínas proapoptóticas, como las caspasas. En cuanto a la capacidad de expulsar fármaco, se produce de manera frecuente una sobreexpresión de bombas P-gp, que se van a encargar de eliminar el compuesto del interior celular, limitando la respuesta terapéutica¹³⁸.

2.10.1.4. Tratamiento de mantenimiento

El uso de agentes terapéuticos para mantener una supervivencia libre de progresión de la enfermedad tiene un gran interés. Los taxanos y los platinos no han mostrado eficacia como tratamiento de mantenimiento. Existen distintos ensayos clínicos en los que se están probando antiangiogénicos, como el bevacizumab, para este mantenimiento, en los que se ha visto un aumento de la supervivencia libre de enfermedad cuando se combina con carboplatino y paclitaxel seguido de 10 meses de tratamiento de mantenimiento. Asimismo, distintos estudios han demostrado la eficacia del uso de inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) como terapia de mantenimiento tras el tratamiento quimioterápico en pacientes con respuesta a platinos^{38,94,136}.

2.10.2. Nuevas estrategias terapéuticas en carcinoma epitelial de ovario

La aparición tan frecuente de resistencias en pacientes con CO hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Gracias a un mayor conocimiento de la biología de este tipo de tumor, se han podido identificar nuevas dianas terapéuticas, como receptores de factores de crecimiento, vías de señalización, reguladores del ciclo celular y mecanismos angiogénicos, que podrían ayudar al tratamiento de este tipo de cáncer^{132,139}. Las terapias antiangiogénicas y los inhibidores de PARP se están empleando en la actualidad para el tratamiento de este tipo de tumor, y han mostrado una mejora de la supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, también se están estudiando otras posibles estrategias para el tratamiento de este tipo de cáncer. A continuación, se explican las distintas aproximaciones.

2.10.2.1. Terapias antiangiogénicas

La angiogénesis es un proceso fisiológico altamente regulado por el que se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso está regulado por numerosos factores de crecimiento, metaloproteasas de la matriz extracelular, citoquinas e integrinas. La angiogénesis se produce principalmente durante el desarrollo embrionario, la curación de heridas y en respuesta a la ovulación. Sin embargo, en ciertas patologías como el cáncer, la angiogénesis puede ser activada de manera aberrante. En cáncer, la generación de nuevos vasos en el interior del tumor permite el aporte de oxígeno y nutrientes a las células tumorales¹⁴⁰.

Un regulador clave en la generación de vasos sanguíneos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su vía de señalización. En CO epitelial, un aumento de la expresión de VEGF y sus receptores se asocia con un peor pronóstico y una menor supervivencia. Teniendo en cuenta esto, la inhibición de la angiogénesis podría suponer una estrategia terapéutica en CO. Se han seguido dos estrategias para inhibir la ruta activada por VEGF^{132,140}:

1. **Inhibición de VEGF:** para esta inhibición se han empleado anticuerpos monoclonales o receptores solubles¹³².
2. **Inhibición del receptor de VEGF:** en este caso, se han usado inhibidores tirosina quinasa o anticuerpos frente a este receptor¹³².

La terapia dirigida frente a la angiogénesis más estudiada es la que emplea el uso de anticuerpos monoclonales para bloquear la unión de VEGF a su receptor. El bevacizumab fue el primer anticuerpo monoclonal recombinante humanizado frente a VEGF aprobado para su uso en clínica. Este compuesto ha mostrado que ayuda a normalizar la vasculatura tumoral. Como se ha descrito previamente, el bevacizumab se emplea para el tratamiento de CO cuando se da una recaída o en combinación con platinos y taxanos en primera línea de tratamiento y para el mantenimiento posterior de estas pacientes^{132,140}.

Existen además estudios con inhibidores tirosina quinasa del receptor de VEGF:

- **Cedinarib:** este inhibidor ha mostrado ser eficaz, alargando el periodo libre de enfermedad, en combinación con platinos como segunda línea de tratamiento en pacientes platino sensibles y para el mantenimiento de éstas^{140,141}.
- **Pazonabib** inhibe el receptor de VEGF, así como del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y de c-Kit, y alarga el periodo libre de enfermedad en pacientes platino-resistentes o platino-refractarios y como mantenimiento en platino-sensibles^{140,141}.
- **Nintedanib:** inhibe tanto el receptor de VEGF como el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y en menor medida RET, Flt-3 y Src. Este inhibidor en combinación con taxanos y platinos ha mostrado ser eficaz en primera línea de tratamiento mejorando significativamente el periodo libre de enfermedad¹³⁹⁻¹⁴¹.

En los últimos años se están estudiando otras vías de señalización relacionadas con la angiogénesis, distintas a la ruta de VEGF. Por ejemplo, las angiopoyetinas 1 y 2 se unen al receptor Tie-2 y estimulan la proliferación, supervivencia y motilidad de las células endoteliales. El trebanabib se une a estas angiopoyetinas y bloquea esta vía de señalización y parece alargar el periodo libre de enfermedad en pacientes platino-resistentes o parcialmente platino-sensibles en combinación con paclitaxel^{140,141}.

2.10.2.2. Inhibidores de PARP

El CO presenta una gran inestabilidad genómica. Se ha descrito que prácticamente la mitad de los tumores de ovario presentan defectos en una o más de las vías de reparación del DNA. En las células tumorales que presenten una deficiencia en alguna de estas vías, la inhibición de una segunda ruta de reparación del DNA puede provocar una letalidad sintética, lo que conduce a la muerte celular¹⁴².

Las polimerasas PARP son una familia de 18 proteínas implicadas en una gran variedad de funciones celulares, entre las que se encuentra la reparación del DNA y en el mantenimiento de la integridad genómica. PARP1 es la proteína más estudiada de este grupo de polimerasas y su principal función se encuentra en las vías de reparación del DNA. Las polimerasas PARP son esenciales para la reparación de SSBs, la reparación por BER, la reparación por HR y la reparación alternativa por NHEJ. Cuando se detecta un lugar de SSB, PARP se activa, uniéndose al sitio donde se ha producido la rotura y añade una cadena de poli-ADP-ribosas que recluta otras enzimas de

reparación del DNA. Las polimerasas PARP regula también la expresión de ciertos genes implicados en la reparación por HR, como *BRCA1* y *RAD51*^{142,143}.

Los inhibidores de PARP (iPARP) pueden actuar por dos mecanismos de acción principales, el primero es la unión al sitio activo de PARP, inhibiendo su actividad enzimática, y el segundo unirse al complejo que forma PARP con la cromatina, atrapando a esta polimerasa en una conformación no activa en la cromatina. Existen tres inhibidores de PARP aprobados para su uso en CO^{142,143}.

1. **Olaparib:** fue el iPARP aprobado para su uso en clínica. En la actualidad, tiene dos indicaciones en pacientes con CO avanzado. La primera es para el tratamiento en pacientes con mutación o sospecha de mutación germinal en *BRCA1/2* después de tres o más líneas previas de tratamiento quimioterápico. La segunda es para el tratamiento de mantenimiento en pacientes con CO recurrente que se encuentren en respuesta parcial o completa a la quimioterapia basada en platinos^{142,143}.
2. **Rucaparib:** este inhibidor presenta dos indicaciones en CO. La primera es el tratamiento de mantenimiento en pacientes con CO recurrente que estén en respuesta completa o parcial a quimioterapia con platinos. La segunda es el tratamiento de pacientes con mutación patogénica en *BRCA* (germinal o somática) asociada a este tumor, que hayan sido sometidas a dos o más líneas de tratamiento quimioterápico^{142,143}.
3. **Niraparib:** este iPARP está indicado para el tratamiento de mantenimiento de pacientes con CO recurrente que estén en respuesta parcial o completa a quimioterapia con platinos^{142,143}.

2.10.2.3. Inhibidores de las vías de reparación del DNA

Las vías de reparación del DNA están muy alteradas en CO. En células tumorales con defecto en alguna de estas vías, el empleo de agentes que alteren o generen un defecto en otra vía de reparación del DNA generaría una letalidad sintética, al igual que ocurre con los iPARP, y supondría una estrategia terapéutica para este tipo de tumores^{139,144,145}.

Las primeras proteínas implicadas en la reparación por HR son ATM y ATR y en el caso de la reparación por NHEJ las DNA-PKs. Por lo que el uso de inhibidores frente a estas proteínas podría ser una opción para el tratamiento de estos tumores. Estos inhibidores podrían aumentar la sensibilidad a agentes quimioterápicos tradicionales como los platinos. En la actualidad existen múltiples ensayos clínicos con estos inhibidores que han mostrado un efecto sinérgico en combinación con otros agentes quimioterápicos en tumores que presentan alteraciones en la reparación del DNA. Un ejemplo es el ensayo con un inhibidor de ATR (M6620) junto con velaparib para comprobar si este inhibidor mejoraría la sensibilidad a los platinos^{139,144,145}.

Otras proteínas claves para detener el ciclo celular en presencia de daño en el DNA son WEE1, Chk1 y Chk2. Esta parada evita la replicación del DNA en presencia de daño y permite su reparación. La inhibición de estas proteínas provoca una mitosis temprana sin reparación del daño por lo que se da una acumulación de éste, lo que conduce a la muerte celular. Además, se ha observado que Chk1 aparece sobreexpresado en casi todos los pacientes con HGSC. Por lo que el uso de inhibidores de Chk1/2 o WEE1 podría ser útil en HGSC, los cuales presentan en casi su totalidad mutaciones en *TP53* y especialmente en aquellos que también porten mutaciones en

BRCA1/2. De hecho, existen múltiples ensayos clínicos en los que se está probando la eficacia de estos inhibidores en combinación con quimioterapia e iPARP para mejorar la respuesta citotóxica. Un ejemplo es el adavosertib, inhibidor de WEE1, que ha demostrado su actividad antitumoral en CO con mutación en *BRCA1/2*. Se está evaluando su actividad junto con el carboplatino en pacientes con mutación en *TP53* y también su uso en pacientes previo al tratamiento con iPARP^{139,144,145}.

2.10.2.4. Inhibidores de tirosina quinasas de la familia de ErbB

Como se describió previamente, la familia ErbB está compuesta por cuatro receptores tirosina quinasa: EGFR, HER2, HER3 y HER4. Estos receptores pueden formar homodímeros o heterodímeros, activando distintas rutas de señalización como la de PI3K/AKT/mTOR y la de MAPK/ERK. En CO, la amplificación y/o sobreexpresión de los receptores EGFR, HER2 y HER3 se han asociado con la progresión tumoral y un peor pronóstico; por lo que estos receptores podrían ser dianas terapéuticas frente a este tipo de cáncer. Sin embargo, los inhibidores de EGFR y HER2/Neu, tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes, no han mostrado beneficio frente al tratamiento convencional en ensayos clínicos^{117,140,146}.

2.10.2.5. Inhibidores del receptor de folato

El folato tiene una función importante en la biosíntesis de las bases nitrogenadas y se requiere para la síntesis de DNA y RNA, así como para la metilación del DNA y la reparación de éste. La mayor parte del transporte del folato se produce por transportadores solubles de baja afinidad y por la familia de los receptores de folato que presentan alta afinidad por este compuesto. El receptor del folato α es una proteína anclada a la membrana plasmática celular. En condiciones fisiológicas, solo se presenta en la cara apical/luminal de la superficie celular. Sin embargo, en algunos tumores de origen epitelial aparece sobre-expresado localizando en toda la superficie celular. El CO es el tumor que más frecuentemente presenta una sobreexpresión de este receptor (80% de los tumores) y esta alta expresión se asocia con un mayor estadio y grado del tumor, así como con una escasa respuesta al tratamiento quimioterápico y una peor supervivencia. Así pues, este receptor supone una diana terapéutica en CO. Existen distintas estrategias para bloquear este receptor, entre las que se incluyen el empleo de derivados del ácido fólico, de fármacos conjugados con folato, de anticuerpos monoclonales y el desarrollo de estrategias basadas en la inmunidad^{140,147}.

El **vintafolide** es un fármaco conjugado a un agente desestabilizante de microtúbulos (desacetil-vinblastine-mono-hidrazida), que inhibe la formación del huso mitótico y con ello conduce a la parada de ciclo celular y a la muerte celular. Este fármaco se une al receptor de folato α y entra en las células por endocitosis. Este fármaco parece ser eficaz en combinación con doxorubicina en pacientes platino-resistentes, mejorando el periodo libre de enfermedad, si bien se necesitan más ensayos clínicos para confirmar esta eficacia^{140,147}.

El **farletuzumab** es un anticuerpo monoclonal frente al receptor de folato α . Este anticuerpo ejerce una actividad antitumoral por distintos mecanismos: inducción de la lisis de la célula tumoral, citotoxicidad dependiente del sistema del complemento, inducción continuada de la autofagia o inhibición de la interacción de este receptor la quinasa lyn (tirosina quinasa de la familia Src). Este compuesto mejora el periodo libre de enfermedad cuando se administra en combinación con carboplatino y paclitaxel en pacientes con este receptor^{140,147}.

El **mirvetuximab soravtansine** es un anticuerpo conjugado frente a este receptor y un compuesto derivado de la maitansina, agente que desorganiza los microtúbulos, Este fármaco está siendo estudiado en múltiples ensayos clínicos con otros agentes quimioterápicos o iPARP y de VEGF para comprobar su eficacia y seguridad, donde ha mostrado mejorar la respuesta respecto al uso de quimioterapia en monoterapia¹³⁹.

2.10.2.5. Inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR

Como se ha mencionado anteriormente, la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR está frecuentemente activada en pacientes con CO (en el 70% de los casos). La activación de esta vía se relaciona con la transformación carcinogénica, el crecimiento y la proliferación celular, así como con la metástasis. Por todo esto, el uso de inhibidores de esta ruta podría ser una diana terapéutica en CO. En la actualidad, el uso de estos inhibidores está restringido a los ensayos clínicos^{116,146}.

1. **Inhibidores de mTOR:** mTOR aparece activado en el 55% de los carcinomas epiteliales de ovario. La rapamicina fue el primer inhibidor desarrollado de la quinasa mTOR, que ejerce su función inactivando el complejo catalítico de mTORC1. Modificando la estructura de la rapamicina se han generado otra serie de inhibidores de mTORC1 que presentan efectos antitumorales en estudios preclínicos, inhibiendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis celular. Además, estos compuestos mejoran la respuesta a otros agentes terapéuticos (platinos o taxoles). Algunos de estos compuestos están aprobados para su uso en clínica, como el temsirolimus y el everolimus; sin embargo, su efecto terapéutico es limitado. Generalmente solo se ve un efecto citostático, por lo que suele asociarse a una estabilización de la enfermedad y del periodo libre de enfermedad, pero no a una reducción de la masa tumoral. Existen distintos ensayos clínicos en CO con inhibidores de mTOR, tanto en monoterapia como en terapia combinada. La actividad de estos inhibidores en monoterapia es muy limitada; sin embargo, combinando con otros agentes quimioterápicos parece proporcionar un beneficio adicional a estas pacientes respecto al tratamiento convencional, si bien el número de pacientes incluidos en estos ensayos es bajo. En la actualidad, se está testando la eficacia del temsirolimus en primera línea junto con carboplatino y paclitaxel para pacientes con CO avanzado de células claras. Además, se han generado otro tipo de inhibidores de la vía de mTOR, como el sapanisertib, que inhiben los dos complejos catalíticos de mTOR, que están probándose en ensayos clínicos para demostrar su posible beneficio en combinación con otros agentes quimioterápicos como el paclitaxel^{116,146,148}.
2. **Inhibidores de AKT:** los inhibidores de AKT inhiben específicamente la acción de AKT, bloqueando la activación de mTORC1, controlando así los efectos aguas abajo en la cascada de señalización de PI3K/AKT/mTOR. Se han desarrollado distintos inhibidores de AKT (MK-2206, perifosina, AZD5363) que han mostrado actividad antitumoral y una mejora en la respuesta a otros agentes quimioterápicos (platinos o taxanos) en ensayos preclínicos. Estos inhibidores están en ensayos clínicos en fase I/II para probar su eficacia y seguridad tanto en monoterapia como combinados con otros agentes en pacientes con CO^{116,148}.
3. **Inhibidores de PI3K:** se han desarrollado distintos inhibidores reversibles o irreversibles de las quinasas PI3K. Estos inhibidores son capaces de inhibir la actividad catalítica de las distintas isoformas de las quinasas PI3K de clase I

(pan-inhibidores) o actuar específicamente sobre alguna de estas isoformas. La eficacia de los inhibidores específicos de alguna de las isoformas es limitada, por lo que los estudios se han centrado en los pan-inhibidores, como LYS294002, wortmanina, buparlisib o PX-866. Estos compuestos han mostrado eficacia en estudios preclínicos tanto en monoterapia como combinados con otros fármacos en el tratamiento de líneas celulares tumorales de ovario y de modelos en ratón de cáncer de ovario. En ensayos clínicos, se está testando su eficacia en pacientes en combinación con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, se ha probado la combinación de buparlisib con olaparib, no obteniéndose una diferencia significativa entre el tratamiento combinado y el tratamiento con el iPARP. El estudio en el que se combinaba buparlisib con un inhibidor de MEK1/2 (trametinib) mostró una tasa de respuesta del 29% y mejoró el periodo libre de enfermedad en pacientes con mutaciones en *KRAS* o *BRAF*¹¹⁶.

2.10.2.6. Inhibidores de la vía de señalización de Src

La familia de tirosina quinasas Src está constituida por tirosinas quinasa no receptoras, entre las que se incluye Src que comparten funciones en múltiples vías de señalización como la adhesión celular, la proliferación celular, la capacidad de invasión o la motilidad celular. Src se puede inducir tras la interacción con distintos factores de crecimiento, entre los que se encuentran los receptores tirosina quinasa de la familia de ErbB o el receptor VEGF¹⁴⁶.

En CO se ha descrito una desregulación de la vía de señalización de Src en el 50% de los tumores y esta desregulación se asocia con un peor pronóstico. Esta alteración es más común en carcinomas serosos de alto grado, donde esta vía aparece sobreactivada. El dasatinib es un inhibidor de esta vía de señalización, así como de otras quinasas de adhesión focal. Este compuesto ha mostrado en estudios preclínicos una inducción de la apoptosis y una inhibición de la capacidad invasiva de líneas celulares tumorales de CO, así como un efecto sinérgico cuando se emplea en combinación con paclitaxel y carboplatino¹⁴⁹. Existe en la actualidad un ensayo clínico en fase II que busca probar su eficacia en pacientes con CO recurrente¹⁴⁶.

2.10.2.7. Moduladores epigenéticos

Como se explicó previamente, las alteraciones epigenéticas provocan cambios en la expresión génica. Estos cambios en el epigenoma parecen tener un papel importante en la carcinogénesis del ovario. Las dos rutas relacionadas con el epigenoma más alteradas durante el desarrollo tumoral son la de la metilación del DNA y la de la modificación de las histonas^{127,128}. Por lo que el uso de inhibidores de las DNA metiltransferasas o de las histonas deacetilasas podrían suponer una estrategia terapéutica en este tipo de tumor:

- **Inhibidores de las DNA metiltransferasas:** estos inhibidores son análogos de las citosinas que se incorporan en el DNA durante la replicación y se unen a estas enzimas inhibiendo su función. Existen dos inhibidores de DNA metiltransferasas aprobadas para su uso en clínica, la 5-azacitidina y la decitabina. Estos inhibidores han mostrado un beneficio adicional al tratamiento convencional en pacientes platino-resistentes o platino-recurrentes cuando se administran en combinación con taxoles y platinos, en ensayos clínicos fase I/II^{127,128}.

- **Inhibidores de histonas deacetilasas (HDACi):** estos inhibidores permiten reactivar la expresión genes silenciados al inhibir las HDACs, como los genes supresores de tumores. Estos inhibidores se pueden dividir por su especificidad (pan-HDACi o inhibidores específicos de las distintas clases de HDAC) o por su estructura molecular (ácidos hidroxámicos, tetrapéptidos cíclicos, benzamidas y ácidos alifáticos de cadena corta). Los principales HDACi son los ácidos hidroxámicos capaces de inhibir todas las HDAC (pan-HDAC) y son los inhibidores que presentan un mayor interés para su uso en clínica. En este grupo se encuentran el Vorinostat, el Panobinostat y el Belinostat, que están aprobados para su uso en clínica. Estos compuestos provocan una parada del crecimiento celular, inducen la diferenciación celular y apoptosis, e inhiben la angiogénesis. Además, las células normales son bastante resistentes a su actividad, lo que supone una ventaja. En ensayos clínicos, el Belinostat ha mostrado ser mejor tolerado que el Vorinostat y un beneficio adicional en pacientes platino-sensibles con CO recurrente en combinación con paclitaxel y carboplatino^{127,128}.

2.10.2.8. Inmunoterapia

El sistema inmune ha mostrado tener un papel importante en los tumores de ciertas pacientes en los que se ha podido observar regresiones espontáneas del mismo, mecanismos de evasión del sistema inmune por parte del tumor y respuestas duraderas en ocasiones a inhibidores de los puntos de control inmunitario. Además, los HGSC con mutaciones en *BRCA1/2* muestran una mayor cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor, así como elevados niveles de PD-1 y su ligando PD-L1 en las células del sistema inmune asociadas al tumor comparado con aquellos tumores que no tienen mutaciones en estos genes. Asimismo, los pacientes con tumores ricos en células T presentan un periodo libre de enfermedad más largo y una supervivencia global aumentada, mientras que aquellos que presentan mecanismos de evasión al sistema inmune presentan una peor supervivencia. Esto sugiere que la inmunoterapia podría ser una estrategia terapéutica para estos pacientes. La inmunoterapia en CO está en una fase temprana de desarrollo empleándose únicamente en ensayos clínicos^{91,92}.

2.10.2.8.1. Bloqueo de puntos de control inmunitarios

En la actualidad se han identificado múltiples moléculas que regulan los puntos de control del sistema inmune, entre las que se encuentran las moléculas inhibitoras PD-1, PD-L1 y CTLA-4^{91,92}.

- **CTLA-4:** es un receptor inhibidor de los linfocitos T que comparte los mismos ligandos que el receptor co-estimulante CD28, pero estos ligandos se unen con mayor afinidad a CTLA-4. Al unirse a CTLA-4 se bloquea la señalización de co-estimulación de CD28^{91,92}.
- **PD-1:** es un receptor inhibidor de los linfocitos T. Se activa por sus ligandos, PD-L1 o PD-L2, fosforilándose y entonces recluta a la fosfatasa SHP-2 que desfosforila a CD28 e inactiva la señalización de co-estimulación. PD-L1 se expresa en células tumorales, del estroma y del sistema inmune^{91,92}.

Estas moléculas inhiben la respuesta inmune, por lo que el uso de anticuerpos frente a éstas podría desbloquear la respuesta inmune, activando la respuesta de los linfocitos T efectoras y con ello conducir a una regresión del tumor. Existen seis inhibidores de puntos de control inmunitarios aprobados para su uso en clínica: dos

frente a PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab), uno frente a CTLA-4 (Ipilimumab) y tres frente a PD-L1 (Avelumab, Atezolizumab, Durvalumab)^{91,92}.

La eficacia de estos anticuerpos como agente único es bastante limitada en pacientes con CO, con una repuesta media entre el 10 y el 15% de las pacientes y un control de la enfermedad en la mitad de las pacientes. Parece que el uso de anticuerpos frente a PD-1 o su ligando podría ser de mayor utilidad que el del ipilimumab^{91,92}.

Una vez vista la limitada acción como agentes únicos, se ha probado la combinación de varios de estos anticuerpos. La combinación del anti-PD1 nivolumab y el anti-CTLA4 ipilimumab ha mejorado la respuesta en pacientes platino-resistentes respecto al tratamiento en monoterapia. Asimismo, se está probando la eficacia del tratamiento combinado con inhibidores de puntos de control del sistema inmune con agentes quimioterápicos, con iPARP y con inhibidores de VEGF^{91,92,150}:

- **Inmunoterapia e iPARP:** como los carcinomas HGSC con mutaciones *BRCA1/2* suelen presentar un mayor porcentaje de linfocitos infiltrantes de tumor, por lo que podrían responder favorablemente a iPARP e inhibidores de los puntos del control del sistema inmune. Un ensayo clínico en fase II que combina olaparib y durvalumab ha mostrado respuestas beneficiosas en pacientes con CO en recaída, platino-sensibles con *BRCA* mutado. También se está probando la combinación de anti-CTLA4 y anti-PDL1 con olaparib en pacientes con *BRCA* mutado^{91,92,150}.
- **Inmunoterapia e inhibidores de VEGF:** algunos estudios muestran que VEGF es un importante mediador de la supresión de la respuesta inmune en el microambiente tumoral por lo que el uso de inhibidores de VEGF junto a anticuerpos frente a puntos de control del sistema inmune podría ser eficaz frente en CO. En ensayos clínicos, se está probando el uso del anti-PDL1 atezolizumab junto con bevacizumab y ácido salicílico, así como el uso del anti-PDL1 durvalumab con olaparib o el inhibidor de VEGFR cediranib^{91,92}.
- **Inmunoterapia y quimioterapia:** algunos agentes quimioterápicos son capaces de inducir una respuesta inmunogénica de muerte celular, una expansión de neoantígenos, un incremento de la presentación angiogénica, un cambio en el microambiente tumoral o un descenso en el número de células inmunosupresoras; por lo que su uso junto con inhibidores de los puntos de control del sistema inmune podría aumentar la respuesta citotóxica. Existen múltiples ensayos clínicos en los que se combinan anti-PDL1 con quimioterapia (doxorrubicina, carboplatino, paclitaxel). Sin embargo, los primeros resultados con avelumab y doxorrubicina muestran que no existe una mejora significativa de la supervivencia libre de enfermedad. No obstante, parece que el empleo de esta combinación en pacientes con PD-L1 y CD8, que no presentan resistencia a platinos, alarga el periodo libre de enfermedad^{91,92,150}.

2.10.2.8.2. Terapia adoptiva de linfocitos T

La terapia adoptiva de linfocitos T consiste en infundir linfocitos T específicos del tumor que se han expandido *ex vivo* que son capaces de reconocer y atacar al tumor. Existen dos estrategias terapéuticas: la primera se basa en aislar y expandir linfocitos infiltrantes de tumor y la segunda en usar linfocitos T modificados genéticamente para que expresen un receptor de células T (TCR) o un receptor antigénico quimérico (CAR), estos linfocitos se infunden posteriormente de nuevo al paciente^{91,92}.

Los ensayos clínicos basados en aislar y expandir linfocitos infiltrantes del tumor han tenido una eficacia limitada. En la actualidad, existen ensayos en los que se está probando la eficacia de estos linfocitos que se estimulan *ex vivo* con células dendríticas autólogas y un anticuerpo frente a CD3, que mejorarían la eficacia de estos linfocitos^{91,92}.

En el caso de los linfocitos T modificados genéticamente, se emplean linfocitos T de la propia paciente, aislados de sangre periférica, que se modifican genéticamente para que expresen un receptor de células T frente a un antígeno específico del tumor dependiente de un complejo mayor de histocompatibilidad, de manera que su función pueda ser regulada por señales inmunosupresoras del microambiente tumoral. Existen ensayos clínicos en los que se está probando la eficacia de células T modificadas para reconocer el antígeno NY-ESO-1, altamente expresado en CO. Además, se están buscando nuevos antígenos específicos de este tumor para desarrollar células T específicas frente a éstos que puedan ser eficaces en la terapia de este tumor^{91,92}.

Por último, se está estudiando el uso de linfocitos T con receptores CAR. Estos receptores presentan un fragmento de cadena sencilla variable con motivos de señalización citoplasmática que reconoce antígenos que presenta el tumor e induce la activación de los linfocitos T. En CO, el primer estudio clínico empleó linfocitos con un receptor CAR específico del receptor del folato α y no mostró un beneficio clínico. Actualmente, se está estudiando el uso de células T CAR frente a otros antígenos como la mesotelina, EGFR o HER2^{91,92}.

2.10.2.8.3. Otras estrategias

El uso de estrategias basadas en el sistema inmune innato también presenta gran interés en el cáncer de ovario. Entre las distintas estrategias está la infusión de células natural killer (NK) o células killer inducidas por citoquinas, que presentan la ventaja de no requerir una presentación antigénica. El desarrollo de estas estrategias está todavía en etapas muy tempranas^{91,92}.

Otra estrategia sería el desarrollo de una vacuna que generara una respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, específica frente al tumor. Existen múltiples estudios clínicos en los que se están probando vacunas, que han mostrado respuestas celulares específicas frente a antígenos y mejorado en distintos grados la supervivencia. En la actualidad hay un gran interés por su potencial en las vacunas frente a neoantígenos. Estos neoantígenos son péptidos unidos a complejos mayores de histocompatibilidad que se generan por mutaciones *missense* del tumor. Estos antígenos son específicos del tumor y muy inmunogénicos, por lo que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del paciente. Esta estrategia se está probando en otro tipo de tumores, y presenta un gran interés para pacientes con CO^{91,92}.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer de ovario es el tipo de cáncer ginecológico con peores ratios de supervivencia debido, principalmente, a un diagnóstico en estadios avanzados de la enfermedad y a la aparición de resistencias y recaídas al tratamiento quimioterápico. Aproximadamente el 70% de las pacientes con este tipo de tumor presentan una recidiva en los dos años posteriores al tratamiento inicial, incluso cuando este tratamiento provocó una remisión del tumor. Por todo esto, existe una clara necesidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas frente a este tipo de tumor¹³⁶.

La combinación de varios agentes terapéuticos es clave para el tratamiento del cáncer, incluido el cáncer de ovario¹⁵¹. De hecho, el tratamiento farmacológico convencional de este tipo de tumores se basa en el uso combinado de dos tipos de agentes quimioterápicos, los platinos y los taxanos. Lo ideal sería encontrar nuevas combinaciones que consigan un efecto aditivo, o, mejor aún sinérgico, es decir, usar fármacos que consigan un efecto antitumoral mucho mayor al que se obtendría con la suma de los efectos esperados de manera individual¹⁵². Además, con este tipo de aproximaciones se reduce la posibilidad de desarrollar resistencias al tratamiento, ya que los fármacos se dirigen a distintas vías de señalización. Asimismo, se reduce la toxicidad que podrían generar estos compuestos tras el tratamiento, ya que se pueden emplear dosis inferiores de cada uno de los agentes. La búsqueda de este tipo de terapias combinadas es especialmente importante en el tratamiento de neoplasias con una baja supervivencia, como es el caso del CO.

Los inhibidores de histona deacetilasa, como el Panobinostat, han demostrado una alta eficacia frente a distintos tipos de tumores y una baja toxicidad para los tejidos normales en estudios preclínicos. No obstante, en ensayos clínicos han mostrado una baja respuesta frente a tumores sólidos y numerosos efectos secundarios. Estos problemas podrían resolverse mediante el uso de estos compuestos en combinación con otros fármacos. De hecho, el estudio de combinaciones de HDACi con otros agentes ha mostrado mejorar la eficacia citotóxica, con efectos sinérgicos o aditivos, y disminuir los efectos secundarios derivados del tratamiento¹⁵³.

Otra aproximación muy útil para la búsqueda de nuevas terapias frente al cáncer es la reutilización de fármacos (*drug repurposing*). En este caso, se estudia el uso de fármacos empleados para otras patologías para el tratamiento del cáncer. Este enfoque es muy atractivo ya que los perfiles de seguridad y farmacocinéticos de estos compuestos ya se conocen, y su estudio presenta un menor coste y una aplicación clínica más rápida. La cloroquina es un ejemplo de este tipo de fármacos; se ha empleado clásicamente para tratar la malaria y también se utiliza para enfermedades autoinmunes o inflamatorias. Sin embargo, existen múltiples ensayos preclínicos y clínicos que muestran como este compuesto presenta una respuesta antineoplásica frente a distintos tipos de cáncer, tanto cuando se usa en monoterapia como combinado con otros quimioterápicos. Estos resultados sugieren que la cloroquina podría ser una buena candidata para su estudio como agente antitumoral¹⁵⁴.

La hipótesis de este trabajo es que el estudio tanto de nuevos fármacos, como de compuestos ya aprobados para otras patologías, así como de tratamientos combinados, podría permitirnos identificar nuevas estrategias terapéuticas más potentes frente al cáncer de ovario.

Teniendo en cuenta esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto citotóxico de la cloroquina en líneas celulares de cáncer de ovario.
2. Analizar la respuesta citotóxica del Panobinostat en líneas celulares de cáncer de ovario.
3. Investigar el potencial antitumoral de nuevos compuestos desestabilizantes de microtúbulos en líneas celulares de cáncer de ovario.
4. Analizar el efecto de la combinación de cloroquina y Panobinostat en líneas celulares de cáncer de ovario
5. Estudiar el efecto de la combinación de agentes desestabilizantes de microtúbulos con Panobinostat.
6. Investigar nuevas combinaciones de fármacos basados en el daño del DNA y la inhibición de las vías de reparación por HR y NHEJ en líneas celulares tumorales de cáncer de ovario.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

Para llevar a cabo este trabajo se seleccionaron cuatro líneas celulares tumorales derivadas de pacientes con cáncer de ovario, cuyas características se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Información de las líneas celulares de cáncer de ovario empleadas en el trabajo.

Línea celular	Fuente	Tumor de origen	Alteraciones moleculares
A2780	ECACC (#93112519)	Adeno-carcinoma endometriode	PIK3CA : Het. c.G1093A; p.E365K PTEN : Hom. c.383_391del9; p.K128_R130 ARID1A : Het. c.4288C>T; p.Q1430* y Het. c.5162del1; p.R1721Hfs ATM : Het. c.1810C>T; p.P604S Baja inestabilidad de microsatélites
IGROV-1	Merck Millipore (#SCC203)	Adeno-carcinoma endometriode	TP53 : Het. c.377A>G; p.Y126C BRCA1 : Het. c.1961del; p.K654fs*47 BRCA2 : Het. c.3323delA; p.K1108Rfs*11 ARID1A : Het. c.5541_5542insG y NS p.G1847fs y c.822delG; p.M274fs PTEN : Het. c.955_958delACTT; p.T319fs*1 y Het. c.464A>G; p.Y155C PIK3CA : Het. c.112C>T; p.R38C SMAD4 : Het. c.692delG; p.G231fs*10 y Het. C.1484T>C; p.L495P MLH1 : Hom. c.1513delA; p.S505fs*3 MSH3 : NS c.1141delA; p.K381fs MSH6 : NS c.3261delC; p.F1088fs*2 Alta inestabilidad de microsatélites
OVCAR-8	ATCC	Adeno-carcinoma seroso de alto grado	TP53 : Hom. c.376-1G>A; p.? y Het. c.376_396del21; p.Y126_K132del HER2/Neu : Het. c.2327G>T; p.G776V KRAS : Het. c.362C>A; p.P121H CTNNB1 : Het. c.77A>G; p.Q26R BRCA1 : región promotora hipermetilada Con estabilidad de microsatélites
SK-OV-3	ATCC (HTB-77)	Cistoadeno-carcinoma seroso, derivado de líquido ascítico	HER2/Neu : amplificado CDKN2A : Hom. c.1_457del457; p.? y NF1 : Het. c.5104G>T; p.G1702C ARID1A : Het. c.1756C>T; p.Q586* APC : Het. c.4666delA; p.T1556fs*9 FBXW7 : Het. c.1274G>T; p.R425L PIK3CA : Het. c.3140A>G; p.H1047R TP53 : Hom. c.267delC p.S90fs*33 Alta inestabilidad de microsatélites

*Hom: mutación homocigota, Het: mutación heterocigota, NS: no especificado

Asimismo, se emplearon la línea celular tumoral JLN-3 derivada de un paciente con mieloma múltiple y la línea celular no tumoral HEK-293T, cuyas características se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 4**).

Tabla 4. Información de las líneas celulares JJN3 y HEK293T empleadas en el trabajo.

Línea celular	Fuente	Tumor de origen	Alteraciones moleculares
JJN-3	DSMZ (#ACC 541)	Mieloma múltiple, derivada de médula ósea	NRAS: Het. c.181C>A; p.Q61K
HEK-293T	ATCC (#CRL-3216)	Embrionaria de riñón	Contiene el antígeno T SV40

*Hom: mutación homocigota, Het: mutación heterocigota.

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ en un incubador (Cultek S.L.U). Para el cultivo de las líneas celulares HEK-293T, OVCAR-8 y SK-OV-3 se empleó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con L-Glutamina, piruvato y glucosa (4,5g/l) (Gibco, Life Technologies) y para las líneas celulares A2780, IGROV-1 y JJN-3 se empleó el medio RPMI con L-glutamina (Gibco, Life Technologies). Ambos medios fueron suplementados con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Life Technologies) y un 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies). La presencia de micoplasma en estas líneas celulares se testó de manera rutinaria empleando el kit MycoAlert (Lonza) y solo se emplearon para los distintos experimentos aquellas células libres de micoplasma.

2. Fármacos

En este trabajo se emplearon distintos fármacos, cuya preparación se detalla a continuación. La dosis y el efecto celular de los mismos se muestra en la **Tabla 5**.

- **Panobinostat (Farydak®) o LBH589** (Novartis Pharmaceuticals): se preparó un stock 1 mM disolviendo 349 µg de fármaco disuelto en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO).
- **Cloroquina** (#C6628, Sigma-Aldrich): se preparó un stock para los estudios *in vitro* a una concentración de 50 mM disolviendo 257,93 mg de este compuesto en 10 ml de dH₂O con DMSO al 0,5% (peso/volumen). Para los estudios *in vivo* se preparó un stock a 5 mg/ml (9,69 mM) disolviendo 250 mg de cloroquina en 50 ml de PBS.
- **N-Acetil-L-cisteína** (#A9165, Sigma-Aldrich): se preparó un stock a una concentración de 500 mM disolviendo 815,97 mg de este compuesto en 10 ml dH₂O.
- **Paclitaxel** (Teva Genéricos Española S.L): se empleó un stock de 20 µM preparado a partir de una solución comercial que se encontraba a una concentración de 1 mM que se diluyó en suero fisiológico.
- **Cisplatino** (Pfizer, Inc.): se empleó una solución comercial a una concentración de 1 mg/ml en suero fisiológico.
- **Bafilomicina A1** (#HY-100558, MedChemExpress): se preparó un stock a 50 mM disolviendo 5mg del compuesto en 160,56 µl de DMSO.
- **Mirin** (#HY-19959, MedChemExpress): se preparó un stock a 50 mM disolviendo 5mg del compuesto en 454,03 µl de DMSO.
- **VE-821** (#HY-14731, MedChemExpress): se preparó un stock a 50 mM disolviendo 5mg del compuesto en 271,44 µl de DMSO.

- **KU-55933** (#HY-12016, MedChemExpress): se preparó un stock a 50 mM disolviendo 5mg del compuesto en 252,85 µl de DMSO.
- **KU-57788** (#HY-11006, MedChemExpress): para su uso *in vitro* se preparó un stock a 30 mM disolviendo 5mg del compuesto en 403,07 µl de DMSO. Para su uso *in vivo* se preparó un stock a 0,8 mg/ml (0,97 mM) disolviendo 50 mg en 62,65 ml de una mezcla de DMSO, PEG400 y PBS (10% de DMSO, 40% de PEG400 y 50% de PBS, añadiendo uno a uno los disolventes en este orden).
- **NU-7026** (#HY-15719, MedChemExpress): se trabajó con un stock a 5 mM que se obtuvo disolviendo 5mg del compuesto en 3,55 ml de DMSO.
- **SCR7 pirazina** (#HY-107845, MedChemExpress): forma estable del inhibidor SCR7. se preparó un stock a 50 mM disolviendo 10mg del compuesto en 601,72 µl de DMSO.
- **Análogos de sulfonamidas**: se emplearon los compuestos **38**, **42** y **45** generados en el departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. Se empleó un stock de estos compuestos a 2 mM disueltos en DMSO¹⁵⁵.
- **Isocombretastatinas**: se empleó el compuesto **PILA9 (P9)** generado en el departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. Se trabajó con un stock de este compuesto disuelto en DMSO a 2 mM.

Tabla 5. Fármacos empleados, mecanismo de acción y efecto de éstos a nivel celular.

Fármaco	Mecanismo de acción	Efecto celular
Cloroquina (CQ)	Bloqueo de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas.	Inhibición de la autofagia
Bafilomicina A1 (Baf)	Inhibidor de la H ⁺ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa)	
N-Acetil-L-cisteína (NAC)	Antioxidante	
Panobinostat (LBH)	Inhibidor de histonas deacetilasas	Pleiotrópico
Cisplatino	Entrecruzamientos en el DNA	Generación de daño en el DNA
Mirin	Inhibidor del complejo MRN	Inhibición de HRR
VE-821	Inhibidor de ATR	Inhibición de la respuesta al daño del DNA
KU-59933	Inhibidor de ATM	
KU-57788 (KU)	Inhibidor de DNA-PK	Inhibición de la reparación por NHEJ
NU-7026 (NU)		
SCR7 pirazina (SCR7)	Inhibidor de DNA ligasa IV	
Paclitaxel	Estabilización de la polimerización de los microtúbulos	Antimitótico
38, 42 y 45	Inhibición de la polimerización de los microtúbulos.	Antimitótico
PILA9 (P9)		

3. Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar el crecimiento celular tras el tratamiento de las líneas celulares de cáncer de ovario con los distintos compuestos se emplearon ensayos de viabilidad celular empleando sales de tetrazolio, en concreto el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Estos ensayos se basan en la detección de células metabólicamente activas gracias a las sales de tetrazolio. El MTT presenta un color amarillento y da lugar, cuando se metaboliza por la enzima succinato deshidrogenasa celular, a un compuesto hidrofóbico de color morado (el formazán). El formazán se disuelve posteriormente en DMSO y su intensidad se mide en un espectrofotómetro. Esto permite determinar el crecimiento celular, ya que a mayor absorbancia ha de existir una mayor cantidad de células metabólicamente activas.

Para realizar estos ensayos se sembraron 4.000 células en cada pocillo de placas de 96 pocillos (100 μ l de medio con las células/pocillo) y se dejó que se fijaran a los mismos 24 horas. Pasado este tiempo, se trataron con diferentes concentraciones de los distintos fármacos (**Tabla 6**), manteniendo células sin tratar (control negativo) y se incubaron 24, 48 y 72 horas. Una vez pasados los tiempos de incubación correspondientes se añadió 10 μ l de MTT disuelto en PBS, a una concentración de 5 mg/ml, a cada uno de los pocillos y se incubaron a 37 °C durante una hora. A continuación, se eliminó el medio y el MTT y se solubilizaron los cristales de formazán con 100 μ l de DMSO. Una vez solubilizados, se midió la absorbancia en el lector de placas UltraEvolution (Tecan) a una longitud de onda de 570 nm. Estos ensayos se realizaron en las cuatro líneas celulares por duplicado y en cada duplicado se incluyeron 3 pocillos por cada condición.

Para todos los tratamientos se calculó la IC50 (concentración que inhibe la proliferación un 50%) a las 72 horas de tratamiento empleando el software GraphPad (versión 9).

Tabla 6. Fármacos y concentración a la que se realizaron los ensayos de viabilidad celular.

Fármaco	Concentración
Cloroquina	10, 25, 50, 75, 100 y 125 μ M
Panobinostat	10, 25, 50, 75, 100 y 150 nM
Paclitaxel	10, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 nM
Cisplatino	0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 y 50 μ M
KU-55933	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 y 20 μ M
VE-821	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 y 20 μ M
KU-57788	1, 2,5, 5, 10, 15, 25 y 50 μ M
NU-7026	2,5, 5, 10, 20, 37,5 y 50 μ M
SCR7 pirazina	25, 50, 75, 100, 150 y 200 μ M
38	20, 60, 100, 300 y 600 nM
42	10, 50, 100, 300 y 600 nM
45	50, 100, 400, 700 y 1000 nM
PILA9	1, 2,5, 5, 10, 25 y 50 nM

4. Ensayos de ciclo celular

El estudio del ciclo celular en las líneas celulares tumorales de ovario se realizó cuantificando el contenido de DNA de las células, tanto tratadas con los distintos fármacos como sin tratamiento, por citometría de flujo. Para llevar a cabo estos ensayos, se sembró el mismo número de células en placas de 12 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. Pasado este tiempo, se trataron con los distintos fármacos durante 24, 48 y 72 horas. Asimismo, se mantuvieron placas sin tratar que sirvieron como controles negativos. Tras los distintos tiempos de incubación, se recogieron las células, tanto las despegadas como las pegadas a la placa (previa tripsinización de las mismas), se fijaron en etanol al 70% (en dH₂O) y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso. Para la cuantificación del DNA, las células se rehidrataron con PBS, se marcaron con 50 µg/ml de yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich) y se trataron con 100 µg/ml RNasa A (Roche) en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los perfiles del ciclo celular se obtuvieron usando el citómetro BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences) y los resultados se analizaron con el software del propio citómetro (BD Accuri™ C6 Software). Se analizaron al menos 10.000 células por condición y los experimentos se realizaron como mínimo por duplicado.

5. Ensayos de apoptosis

Los ensayos de apoptosis se llevaron a cabo para determinar la población de células vivas, apoptóticas y necróticas tras los distintos tratamientos. Para llevar a cabo este estudio se sembraron 30.000 células en placas de 12 pocillos. A las 24 horas de incubación, las células se sometieron a los distintos tratamientos, bien en monoterapia o combinando diferentes fármacos, y se incubaron durante 72 horas. A continuación, se recogieron tanto las células despegadas como las pegadas a los pocillos, previa tripsinización de los mismos, y se marcaron con yoduro de propidio y anexina V del kit FITC Apoptosis Detection Kit CE (Immunostep), según las indicaciones del fabricante. El yoduro de propidio penetra en aquellas células que tengan la membrana celular rota, por lo que marca células apoptóticas tardías o necróticas. La anexina V, por su parte, se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se transloca de la monocapa lipídica interna a la externa de la membrana plasmática por la acción de una escramblasa y de una flipasa durante la muerte celular programada, y se utiliza por tanto como marcador de células apoptóticas. Finalmente, las muestras se analizaron por citometría de flujo.

En el caso de los tratamientos con combinaciones de fármacos, se estudió si el efecto de ellos era aditivo, antagónico o sinérgico. Para ello, se calcularon los índices de combinación de los distintos tratamientos empleando el software Compusyn (ComboSyn, Inc) que se basa en el método de Chou-Talalay¹⁵⁶. Un índice de combinación superior a 1 indica un efecto antagónico, igual a 1 un efecto aditivo e inferior a 1 un efecto sinérgico.

6. Análisis de la expresión de proteínas

6.1. Extracción de proteínas

Las proteínas fueron extraídas de las distintas líneas celulares tras haberlas tratado o no con los distintos fármacos a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas). Para llevar a cabo esta extracción se recogieron las células de las placas depositadas previamente sobre hielo para minimizar la degradación proteica. En primer lugar, se aspiró el medio de las placas, se lavaron con PBS y se añadieron 200-500 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (#11697498001, cOMplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) en función del número de células. Las células se recogieron en este tampón con la ayuda de un *scraper* y se añadieron en un tubo eppendorf donde se incubaron en hielo durante 30 minutos, dando un vórtex cada 10 minutos para favorecer la rotura de las células por lisis mecánica. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C de manera que los restos celulares quedan en el pellet y las proteínas en el sobrenadante. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo eppendorf y se almacenaron a -80 °C.

6.2. Western blot

Los extractos proteicos fueron cuantificados empleando un ensayo colorimétrico basado en el reactivo Bradford, que cambia de color marrón a azul en presencia de proteínas. Este cambio modifica su pico máximo de absorción de 465 nm a 590 nm. Para la cuantificación, se empleó una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) (0-750 µg/ml) a partir de la cual se extrapoló el valor de la concentración de los distintos extractos. Todo esto se llevó a cabo preparando las distintas muestras siguiendo el protocolo del kit Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay (#23200, ThermoFisher Scientific). La absorbancia de las muestras se midió a 570 nm utilizando un lector de placas UltraEvolution (Tecan).

Una vez cuantificados los extractos, se prepararon las muestras para estudiar las distintas proteínas mediante western blot. Para ello, se mezclaron 30 µg de extracto proteico en tampón de carga (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 2% β-mercaptoetanol) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Con la desnaturalización, se consigue que las proteínas pierdan su estructura terciaria y cuaternaria y que se recubran de carga negativa, lo que permite que migren al polo positivo cuando se someten a un campo eléctrico.

Una vez preparadas las distintas muestras, se cargaron junto con un marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, ThermoFisher Scientific) en geles SDS-PAGE. Estos geles están compuestos por dos partes formadas por geles con un distinto porcentaje de acrilamida. El gel separador, en la parte inferior, se preparó a un porcentaje de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas a separar (8-12% acrilamida) en un tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 y SDS al 10%, mientras que el gel separador, en la parte superior, se preparó al 4% de acrilamida en un tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y SDS al 10%. En ambos casos, para la polimerización de estos geles se empleó AMPS y TEMED. Una vez cargadas las muestras, se realizó una electroforesis a 180 V durante unos 75 minutos en un tampón compuesto por Tris 20 mM, glicina 192 mM y SDS al 1%.

Una vez separadas las distintas proteínas, éstas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-PSQ PVDF Membrane, Merck Milipore),

previamente activadas con metanol y dH_2O , empleando el método de transferencia semihúmeda Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad), que aplica un voltaje de 25V (1A) durante 30 minutos en un tampón que contiene 25 mM Tris-HCl pH 8,5, 192 mM glicina y 20% metanol. Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (0,1% de Tween-20 en TBS) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche en una solución que contenía el anticuerpo primario preparado a la dilución adecuada en BSA al 3% en TBS-T. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBS-T (5, 7 y 10 minutos) y la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) o con un fluoróforo (DryLight®). Tras esta incubación, se realizaron otros tres lavados con TBS-T y se procedió al revelado. Para ello, se empleó un sistema de quimioluminiscencia basado en la oxidación de luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher Scientific) y posterior exposición de las membranas a películas fotosensibles de autorradiografía (Fujifilm) para la detección de las proteínas. En otras ocasiones, el revelado se llevó a cabo mediante el empleo de un sistema basado en la detección de fluorescencia infrarroja. En estos casos se utilizó un equipo Odyssey® Infrared Imaging System 9120 (LI-COR Bioscience). Los niveles de expresión de las proteínas en las diferentes muestras se calcularon empleando el software ImageJ (versión 1.53q).

6.3. Detección de α -tubulina acetilada mediante citometría de flujo

Las distintas líneas celulares de cáncer de ovario fueron tratadas o no con Panobinostat, el compuesto 38 o ambos compuestos durante 24 horas. Pasado el tiempo de tratamiento, las células se recogieron previa tripsinización en PBS en un tubo de citómetro. Después, se centrifugaron a 1.800 rpm durante 3 minutos, se aspiraron los restos de PBS y el pellet de células se fijó resuspendiéndolo en 100 μl de formaldehído al 4% precalentado a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 500 μl de PBS *staining* (PBSst, PBS con 0,5% de FBS, 0,5% BSA y 0,01% de azida sódica) con EDTA 2,5 mM para detener el fijado y se volvieron a centrifugar las células. Tras la centrifugación, se eliminaron los restos de formaldehído y se resuspendió el pellet en 100 μl de PBSst con 2,5 mM de EDTA. Estos tubos se almacenaron a 4 °C para su posterior uso.

Para la detección de los niveles de α -tubulina acetilada, se añadieron 500 μl de PBSst con EDTA 2,5 mM a cada tubo y se volvieron a centrifugar las células. El pellet se resuspendió en 100 μl de una solución de Tritón X-100 al 0,02% diluido en buffer PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 2% BSA, 0,05% azida, pH 6,9) para la permeabilización de la membrana de las células. Después de 10 minutos de permeabilización, se añadieron otros 500 μl de TBS y se volvieron a centrifugar las células para eliminar los restos de Tritón. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μl de anticuerpo primario (anti- α -tubulina acetilada, 1:1.000) diluido en buffer PHEM y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente, se eliminaron los restos de anticuerpo primario, añadiendo otros 500 μl de TBS y centrifugando. Tras esta centrifugación, se resuspendió el pellet en 100 μl de anticuerpo secundario (1:1.000) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Después, se eliminaron los restos de anticuerpo secundario subiendo el volumen con TBS y centrifugando. El pellet se resuspendió en 100 μl de PBSst con EDTA 2,5 mM y se almacenó a 4 °C protegido de la luz para evitar que se pierda la fluorescencia. Por último,

las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSAria III y los resultados se analizaron con el software FlowJo (versión 10).

En la **Tabla 7**, se muestran los distintos anticuerpos empleados en este trabajo.

Tabla 7. Anticuerpos empleados en este trabajo para western blot

Anticuerpo	Casa comercial	Tipo	Origen	Dilución	Tamaño (kDa)
p62	Abcam (ab109012)	Primario	Rabbit	1:1.000	62
LC3B	Novus Biologicals (NB600-1384)	Primario	Rabbit	1:1.000	LC3B-I: 19 LC3B-II: 17
Beclin-1	Cell Signaling (3738S)	Primario	Rabbit	1:1.000	60
β-actina	Sigma-Aldrich (A5441)	Primario	Mouse	1:10.000	42
Ku70	Santa Cruz Biotechnology (sc-5309)	Primario	Mouse	1:1.000	70
Ku80	Santa Cruz Biotechnology (sc-56136)	Primario	Mouse	1:2.000	86
α-tubulina acetilada	Sigma-Aldrich (T7451)	Primario	Mouse	1:1.000	50
α-tubulina total	Sigma-Aldrich (T6199)	Primario	Mouse	1:5.000	50
Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab	GE Healthcare (NXA931)	Secundario	Sheep	1:10.000	
Goat anti-Mouse IgG (H+L), DyLight® 680	Invitrogen (35518)	Secundario	Goat	1:10.000	
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam (ab205718)	Secundario	Goat	1:10.000	
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, DyLight® 800 4X PEG	Invitrogen (SA5-35571)	Secundario	Goat	1:10.000	
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Molecular Probes (A21202)	Secundario	Donkey	1:1.000	

7. Ensayos de detección de especies reactivas de oxígeno

Para la detección de especies reactivas de oxígeno se emplearon ensayos basados en el marcaje de éstas con la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). El DCFH-DA es una sonda no fluorescente capaz de atravesar la membrana celular. Una vez en el interior celular, se hidroliza por las esterasas celulares generándose un anión DCFH que se mantiene en el interior de la célula. Cuando este anión se oxida gracias a las ROS genera un producto fluorescente, la diclorofluoresceína. La fluorescencia que emite se puede medir mediante citometría de flujo.

Para tratamientos cortos, las distintas líneas celulares se sembraron en placas de 6 pocillos (250.000 células/pocillo) y se incubaron 24 horas para su adhesión. Posteriormente, se recogieron en un tubo de citómetro, previa tripsinización, en su medio correspondiente sin FBS y se marcaron con 5 μ M de DCFH-DA durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad en una atmósfera con el 5% de CO₂. Pasado este tiempo, las células se trataron con distintas concentraciones de cloroquina, NAC y Panobinostat durante 15 minutos. A continuación, se centrifugaron los tubos a 1.500 rpm durante 5 minutos para eliminar el medio, que contenía el fármaco y la sonda, y se lavaron las células con PBS dos veces. Una vez hecho esto, se midió la fluorescencia en el citómetro de flujo Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer.

En el caso de tratamientos largos, se sembraron las distintas líneas celulares en placas de 6 pocillos (250.000 células/pocillo) y se incubaron 24 horas para su adhesión. A continuación, se trataron con las distintas concentraciones de cloroquina y Panobinostat y se dejaron 24 horas con el tratamiento. Pasado este tiempo, las células se recogieron en un tubo de citómetro, previa tripsinización, en su medio correspondiente sin FBS y se marcaron con 5 μ M de DCFH-DA durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad en una atmósfera con el 5% de CO₂. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 1.500 rpm durante 5 minutos para eliminar el medio y se lavaron las células con PBS dos veces. Una vez hecho esto, se midió la fluorescencia en el citómetro.

Como control positivo de estos experimentos se trataron células con H₂O₂ 1 mM durante 15 minutos, tras lo cual se marcaron con la sonda DCFH-DA y se procesaron del mismo modo que las muestras a testar. Cada experimento se llevó a cabo al menos por triplicado para confirmar los resultados.

8. Ensayos funcionales de reparación por recombinación homóloga

Para llevar a cabo ensayos funcionales de recombinación homóloga se generó una línea celular de cáncer de ovario (SK-OV-3-HR) que porta un *cassette* reportero integrado en su genoma¹⁵⁷. Este *cassette* presenta un sitio de corte para una endonucleasa (*I-SceI*) que es capaz de generar una rotura de doble cadena. Cuando se produce la rotura en esta región, aquellas células capaces de repararla mediante recombinación homóloga expresarán GFP emitiendo fluorescencia verde.

Para la generación de esta línea celular, la línea celular SK-OV-3 fue transfectada con 1 μ g del plásmido pHR linealizado previamente mediante digestión con la enzima *NheI* (**Figura 11**)¹⁵⁷ y purificado por columna con GeneJET PCR Purification Kit (K0701, ThermoFisher Scientific). Pasados tres días, se añadió geneticina (G418) a una

concentración de 500 µg/ml para seleccionar aquellas células que hubieran integrado la construcción. La selección se refrescó cada 48 horas y tras tres semanas se obtuvieron *pools* estables de células resistentes a G418.

Para medir la eficiencia de reparación por recombinación homóloga, se empleó tanto la línea celular SK-OV-3-HR como una línea celular de mieloma múltiple (JJN3-HR), generada previamente en el laboratorio, que había mostrado ser un buen modelo para medir esta eficiencia^{158,159}. Ambas líneas se pretrataron 24 horas con distintas concentraciones de Panobinostat (5, 7 o 10 nM). A continuación, se cotransfectaron 10⁶ células con 5 µg de un plásmido que expresa la endonucleasa *I-SceI* y 0,5 µg del plásmido pDsRed-N1, que expresa la proteína roja fluorescente y permite corregir las diferencias en las eficiencias de transfección. Tras la transfección, las células se incubaron otras 72 horas más con las mismas concentraciones de Panobinostat o un inhibidor de HRR (Mirin 50 µM). La fluorescencia verde (GFP) y roja (dsRed) que emiten las células se midió por citometría de flujo empleando el citómetro Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer y la eficiencia de recombinación homóloga se calculó como el ratio de células GFP+ y DsRed+.

Todas las transfecciones se llevaron a cabo utilizando el equipo Amaxa Nucleofector (Lonza) y el buffer 1SM¹⁶⁰. Los programas usados fueron los siguientes: V-005 para la línea SK-OV-3 y T-016 para la línea JJN3.

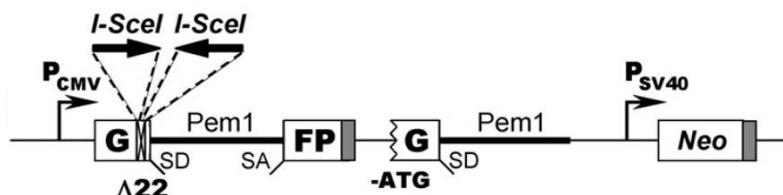


Figura 11. *Cassette* reportera de HRR integrado en las distintas líneas celulares tumorales. Adaptado de referencia¹⁵³.

9. Ensayos funcionales de reparación mediante unión de extremos no homólogos

Para el estudio de la reparación mediante NHEJ tras el tratamiento con Panobinostat se emplearon dos estrategias en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario. La primera estrategia consiste en un ensayo extracromosómico basado en la capacidad de las células de recircularizar el plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 previamente digerido con distintas enzimas de restricción. La segunda aproximación consistió en la generación de líneas celulares reporteras de NHEJ gracias a la integración en el genoma de un *cassette* que permite la detección de este tipo de reparación (**Figura 12**)^{157,161}. Este *cassette* presenta un sitio de corte para una endonucleasa (*I-SceI*) la cual es capaz de generar una rotura de doble cadena. Cuando se produce la rotura en esta región, aquellas células capaces de repararla mediante NHEJ expresan GFP emitiendo fluorescencia verde.

Para el ensayo extracromosómico, el plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 fue digerido con dos enzimas de restricción distintas: *HindIII* o *I-SceI*. La digestión con estas enzimas elimina la secuencia Ad2 del interior del intrón Pem1, generando extremos compatibles (*HindIII*) o incompatibles (*I-SceI*). Cuando este plásmido es tranfectado en células con capacidad de reparar por NHEJ, se recirculariza y se recupera la expresión de EGFP. Para evaluar la eficiencia de NHEJ, las líneas celulares IGROV-1 y SK-OV-3 se

pretrataron 24 horas con distintas concentraciones de Panobinostat (20 y 30 nM) o un inhibidor de NHEJ, el NU-7026 (30 μ M), como control positivo del experimento. A continuación, se cotransfectaron 10^6 células con 0,5 μ g del plásmido linealizado con las distintas enzimas o circularizado sin el intrón Ad2 (pEGFP-Pem1, resultado de la religación del plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 digerido con *HindIII*) y 0,5 μ g del plásmido pDsRed-N1 que nos permite corregir las diferencias en las eficiencias de transfección. Tras la transfección, las células se volvieron a tratar 72 horas con las mismas concentraciones de Panobinostat o NU-7026. Pasado este tiempo, la fluorescencia verde (GFP) y roja (dsRed) emitida por las células se midió por citometría de flujo. A continuación, se calculó el ratio de células GFP+/DsRed+ para corregir las diferencias en las eficiencias de transfección y una vez obtenidos se calculó la eficiencia de reparación por NHEJ dividiendo el ratio de las células GFP+/DsRed+ obtenido de las transfecciones con el plásmido lineal entre el obtenido cuando se empleó el plásmido pEGFP-Pem1.

Para la generación de las líneas celulares reporteras de NHEJ, las líneas celulares IGROV-1 y SK-OV-3 fueron transfectadas con 0,5 μ g de plásmido pNHEJ linealizado gracias a la digestión con la enzima *NheI* (**Figura 12**)¹⁵⁷ y purificado por columna. Pasadas 72 horas, se añadió geneticina (G418) a una concentración de 500 μ g/ml para seleccionar aquellas células que hubieran integrado la construcción. La selección se refrescó cada 48 horas y tras tres semanas se obtuvieron *pools* estables de células.

Para medir la eficiencia de NHEJ, las líneas celulares SK-OV-3-NHEJ e IGROV-1-NHEJ se pretrataron 24 horas con distintas concentraciones de Panobinostat (20 y 30 nM) o NU-7026 (30 μ M). Tras este tiempo, se cotransfectaron 10^6 células con 5 μ g de un plásmido que expresa la endonucleasa *I-SceI* y 0,5 μ g del plásmido pDsRed-N1 que nos permite corregir las diferencias en las eficiencias de transfección. Tras la transfección, las células se incubaron otras 72 horas más con las mismas concentraciones de Panobinostat o NU-7026. Acabado el tratamiento, se midió la fluorescencia verde y roja emitida por las células por citometría de y la eficiencia de reparación mediante NHEJ se calculó como el ratio de células GFP+/ DsRed+.

Todas las transfecciones se llevaron a cabo en el equipo Amaxa Nucleofector (Lonza), empleando el buffer 1SM¹⁶⁰. Los programas usados fueron los siguientes: V-005 para la línea SK-OV-3 y X-001 para la línea IGROV-1.

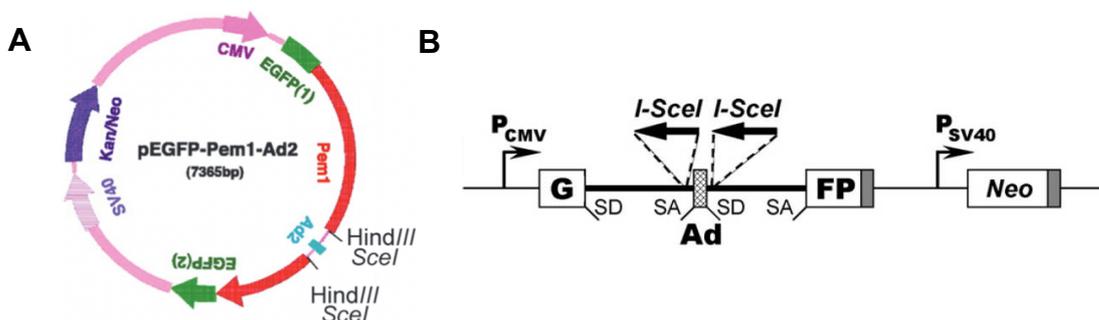


Figura 12. (A) Mapa del plásmido pEGFP-Pem-Ad2. (B) *Cassette* reportero de NHEJ integrado en las distintas líneas celulares tumorales. Adaptada de referencia^{153,157}.

10. Ensayos de inmunofluorescencia

Para observar la distribución celular y la expresión de las proteínas de interés en las líneas celulares con los distintos tratamientos se emplearon ensayos de inmunofluorescencia. Se llevaron a cabo dos procedimientos distintos para la preparación de las muestras, en función de las proteínas a marcar, y la obtención de las imágenes se llevó a cabo en un microscopio de inmunofluorescencia confocal o bien en un microscopio de inmunofluorescencia de campo amplio. Los dos protocolos se detallan a continuación:

10.1. Protocolo de inmunofluorescencia seguido de microscopia confocal

Para observar la distribución celular y la expresión de las proteínas α -tubulina, LC3B, γ H2AX y Rad51 en las distintas líneas celulares con los distintos tratamientos, se sembraron 150.000 células por pocillo sobre cubreobjetos redondos de cristal de 12 mm de diámetro en placas de 6 pocillos y se dejaron 24 horas para que las células se fijaran a los cristales. Tras este tiempo, se añadieron los tratamientos correspondientes, manteniendo en todos los casos células sin tratar, y se incubaron el tiempo de tratamiento requerido. Pasados los distintos tiempos de incubación, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos (2 ml/pocillo) en hielo. A continuación, los cubreobjetos se colocaron en cámaras húmedas y se permeabilizaron las células con una solución de Tritón-X 100 (Boehringer Mannheim) al 0,5% diluido en PBS durante 10 minutos (100 μ l/cubre) en hielo. Posteriormente, se bloquearon durante 30 minutos con una solución de BSA (Sigma-Aldrich) en PBS al 10% (100 μ l/cubre). Una vez finalizado el bloqueo, los cubreobjetos se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos primarios (30 μ l de BSA en PBS al 3% conteniendo la dilución apropiada de los anticuerpos). Finalizada la incubación, se volvieron a incubar durante 60 minutos en oscuridad con 30 μ l de los anticuerpos secundarios correspondientes disueltos en una solución de BSA en PBS al 1%. Posteriormente, los núcleos de las células se tiñeron durante 5 minutos en oscuridad con una dilución que contenía 0,5 μ g/ml de dihidroclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche) (75 μ l/cubre). El DAPI es un agente que se une fuertemente a regiones del DNA enriquecidas en adenina y timina. Tras esta incubación, se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos empleando el agente Mowiol (Calbiochem), que actúa como un pegamento. Los portaobjetos se mantuvieron en oscuridad y 4 °C hasta que se visualizaron en el microscopio confocal. Las células fueron visualizadas y analizadas gracias al microscopio confocal LEICA SP5 DMI-6000V (Leica Microsystems) acoplado a un ordenador con el software LEICA LAS AF con un aumento de 63x.

10.2. Protocolo de inmunofluorescencia seguido de microscopia de campo amplio

Para los análisis de α -tubulina y α -tubulina acetilada, los cubreobjetos se trataron previamente con 2 μ g/ml de fibronectina durante tres horas. La fibronectina facilita la unión y proliferación de las células en los cubreobjetos. Posteriormente, las células se sembraron y se permitió que se fijaran a los cubreobjetos 24 horas, tras lo cual se pusieron los tratamientos correspondientes. Pasado el tiempo de tratamiento, las células se fijaron 10 minutos empleando una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. A continuación, se permeabilizaron con una solución al 0,1% de Tritón-X 100 durante 10 minutos. Tras la permeabilización, los cubreobjetos se bloquearon durante 30 minutos

con 100 μ l de buffer PHEM tras lo que se incubaron con los anticuerpos primarios frente a α -tubulina acetilada o la α -tubulina total diluidos en buffer PHEM durante 120 minutos a temperatura ambiente. El buffer PHEM se emplea en inmunoensayos ya que ayuda a preservar los microtúbulos, y con ello la estructura celular. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario faloidina acoplada a Alexa Fluor 568, que permite el marcaje de la actina, y Hoechst, que tiñe el DNA, diluido en el buffer PHEM durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos empleando el medio de montaje ProLong™ Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) y las células se visualizaron y analizados con el microscopio de inmunofluorescencia Leica THUNDER (Leica Microsystems).

Los anticuerpos empleados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8. Anticuerpos empleados para los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Casa comercial	Tipo	Origen	Dilución
γH2AX	Sigma-Aldrich (05-636)	Primario	Mouse	1:1.000
Rad51	Sigma Aldrich (PC130)	Primario	Rabbit	1:1.000
LC3B	Novus Biologicals (NB600-1384)	Primario	Rabbit	1:200
α-tubulina acetilada	Sigma-Aldrich (T7451)	Primario	Mouse	1:1.000
α-tubulina	Sigma-Aldrich (T6199)	Primario	Mouse	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti- mouse IgG (H+L)	Molecular Probes (A21202)	Secundario	Donkey	1:400/1:1.000
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes (A11037)	Secundario	Goat	1:400
Alexa Fluor™ 568 Phalloidin	Molecular Probes (A12380)	Primario conjugado a Alexa Fluor™ 568		1:1.000

11. Generación de líneas celulares de ovario que expresan la luciferasa

Para la monitorización de los tumores en un modelo *xenograft* en ratón se construyeron tres líneas celulares de cáncer de ovario que expresan la luciferasa (A2780-Luc, OVCAR-8-Luc, SK-OV-3-Luc). Para su construcción se empleó el vector lentiviral pLenti CMV Puro LUC (w168-1) (#17477, addgene) (**Figura 13**). Este es un vector lentiviral de tercera generación que presenta un promotor constitutivo del citomegalovirus (CMV), puromicina como marcador de selección para células de mamífero y ampicilina como marcador de selección para bacterias. Bajo el control de este promotor, se encuentra la información para codificar la proteína luciferasa. La luciferasa es una proteína que reacciona con la luciferina, en presencia de oxígeno, generando oxiluciferina que emite luz. La intensidad de luminiscencia se emplea en modelos *in vivo* para estimar el tamaño del tumor y también para observar su localización.

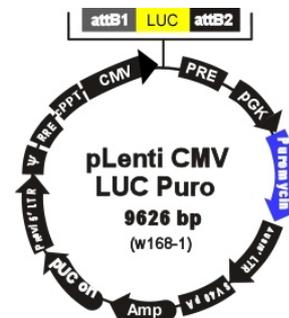


Figura 13. Esquema del vector lentiviral pLenti CMV Puro LUC (w168-1). Fuente: addgene.

Para la producción de los lentivirus se empleó la línea celular no tumoral HEK293T y se realizó mediante el protocolo de cloruro cálcico (CaCl_2). En primer lugar, se realizó un pase de la línea HEK293T y se sembraron en placas nuevas a una densidad de $2 \cdot 10^6$ células/placa. Además, se realizó un pase de las líneas celulares que posteriormente se van a infectar con los lentivirus generados por la línea HEK293T de tal manera que alcancen un 80% de confluencia el día de la infección. Al día siguiente, se preparó una mezcla con los vectores de empaquetamiento y transferencia: 7,5 μg del plásmido psPAX2 (#12260, addgene), 2,5 μg del plásmido pMD2.G (#12259, addgene) y 10 μg del vector pLenti CMV Puro LUC y se completó con dH_2O hasta alcanzar un volumen de 436 μl . Después, se añadieron 64 μl de CaCl_2 2 M llevando el volumen final de la solución a 500 μl . Posteriormente se añadieron 500 μl de HBS 2X (0,28 M NaCl, 0,05 M HEPES, 1,5 M Na_2HPO_4 , pH 7). Este reactivo se añadió gota a gota sobre la solución preparada anteriormente mientras se realizaba un burbujeo de la misma. La mezcla se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió a las células HEK293T gota a gota por toda la placa (el medio presente en las placas de cultivo se había cambiado dos horas antes de poner la mezcla). A continuación, se agitó la placa para distribuir homogéneamente la mezcla y las células se incubaron durante toda la noche. A las 24 horas se cambió el medio y a las 48 horas de transfección se recogió el sobrenadante de la placa de células HEK293T donde se encontraban los lentivirus producidos. A dicha placa de HEK293T se le volvieron a añadir 10 ml de medio fresco, con el fin de nuevos generar lentivirus que se pudieran recoger al día siguiente. El sobrenadante obtenido se filtró con un filtro de 0,45 μm para eliminar cualquier resto celular y se añadió 7,5 μl de polibreno (10 mg/ml). Este sobrenadante se empleó para infectar las líneas celulares de interés (A2780, OVCAR-8 y SK-OV-3). Para ello, se aspiró el medio de las placas, se lavaron con PBS y se añadió el sobrenadante viral con el polibreno. Pasadas 24 horas, se repitió la recogida de sobrenadante, su filtrado y la adición de polibreno para volver a infectar las células y mejorar así la proporción de células infectadas. A las seis horas, se cambió el medio de las líneas celulares de ovario, dejándolas en el medio habitual para su cultivo. Pasadas 72 horas, se refrescó el medio de las líneas celulares de ovario y se añadió puromicina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para seleccionar aquellas células

que hubieran sido infectadas y estuvieran expresando la luciferasa. La selección se refrescó cada 48 horas y tras tres semanas se obtuvieron *pools* estables de células.

Para comprobar que estas líneas celulares (A2780-Luc, OVCAR-8-Luc y SK-OV-3-Luc) expresaban la luciferasa, se recogieron previa tripsinización y centrifugación en 100 μ l PBS y se pasaron a tubos de citómetro. Asimismo, se recogieron las líneas celulares originales y se midió la bioluminiscencia basal en un luminómetro. A continuación, se añadió 1 μ l de luciferina (13,5 mg/ml de PBS) (#LUCK-500, GoldBio), a todos los tubos y se midió la bioluminiscencia que emitían tras la adición de este compuesto.

12. Modelo xenograft de cáncer de ovario

Para los estudios *in vivo* de fármacos se empleó un modelo *xenograft* en ratones inmunodeprimidos a los que se les inyectaron de manera subcutánea líneas celulares de cáncer de ovario. Este estudio se encuadra en el proyecto “Nuevas estrategias de letalidad sintética en cáncer de ovario” y dispone de un informe favorable del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (Nº Registro: 724, 11 de noviembre de 2021) cumpliendo los requisitos del RD 53/13.

En concreto para este estudio, se emplearon hembras de ratones inmunodeprimidos Cd1® *nude/nude* (#086, Charles River) de 5-6 semanas que se mantuvieron en la zona libre de patógenos específicos (SPF) del edificio Departamental de la Universidad de Salamanca. Estos ratones carecen de timo por lo que no son capaces de producir linfocitos T. Los ratones fueron inyectados, vía subcutánea, con $3 \cdot 10^6$ células de la línea celular A2780 que expresa la luciferasa (A2780-Luc). Las células fueron recogidas mediante tripsinización y centrifugación y se resuspendieron a una concentración de $6 \cdot 10^7$ células/ml en medio RPMI con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de penicilina/estreptomicina. A continuación, se añadió el mismo volumen de Matrigel (#356234, ThermoFisher) previamente descongelado en hielo para mantenerlo en forma líquida. Finalmente, se inyectaron 100 μ l de las células en el flanco derecho de cada uno de los ratones, previamente anestesiados con isoflurano inhalado. Para ello se emplearon jeringuillas de 1 ml y agujas de 25 g. Una vez inyectadas las células, se controló la evolución del tamaño del tumor, así como el estado de salud de los animales cada dos días.

Cuando el tumor alcanzó un tamaño medio de 50-100 mm³, se procedió a la randomización de los ratones en 4 grupos de 8. No obstante, se eliminaron del estudio aquellos animales con tumores excesivamente grandes o pequeños, por lo que quedaron 3 grupos de 7 y uno de 8. El primer grupo fue el control al que se administró solamente el solvente de los fármacos. El segundo grupo fue el tratado con cloroquina (25 mg/kg disuelto en PBS, 3 días a la semana), el tercero fue tratado con el inhibidor de NHEJ KU-57788 (4 mg/kg disuelto en 5% de DMSO, 37,5% de PEG400 y 57,5% de PBS, diario) y el cuarto fue el tratado con cloroquina (25 mg/kg, 3 días a la semana) y el inhibidor KU-57788 (4 mg/kg, diario). El tratamiento tuvo una duración de 2 semanas y se realizó por vía intraperitoneal en todos los casos. Durante este tiempo, se controló el peso y el volumen del tumor cada dos días. Para el cálculo del volumen de tumor se empleó la siguiente fórmula: $\text{Volumen} = \pi \times \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2 / 6$. Asimismo, se realizó un control de la bioluminiscencia de las células del tumor al inicio del tratamiento y a los nueve días del comienzo del tratamiento. Para ello se inyectó luciferina (13,5 mg/ml) por vía intraperitoneal (10 μ l luciferina/g ratón) y a los 10 minutos,

estando los ratones bajo anestesia inhalatoria (isoflurano) se leyeron los resultados de bioluminiscencia en el aparato de bioluminiscencia Xenogen IVIS® Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer).

Los ratones fueron sacrificados 24 horas después del final del tratamiento o cuando los ratones perdieron más del 20% de su peso inicial o sufrieron taquipnea, costados hundidos, diarrea crónica, ulceración del tumor o el tumor alcanzó un tamaño superior a 1500 mm³, de acuerdo con el criterio de punto final del estudio.

13. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando el software jamovi (versión 2.2.5.0 Mac)¹⁶². En primer lugar, se empleó el test de Saphiro-Wilk para determinar si los distintos conjuntos de datos seguían una distribución normal y el test de Levene para comprobar la homogeneidad de la varianza. En el caso de muestras con distribución normal, para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos se llevó a cabo un análisis estadístico mediante la distribución de t-Student y para varios grupos se realizó un análisis ANOVA con un análisis post-hoc empleando la prueba de Tukey. Para muestras con distribución no normal, se empleó un test U-Mann Whitney para la comparación de dos grupos, y para varios grupos la prueba de Kruskal-Wallis con un análisis post-hoc utilizando el test Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor obtenido fue inferior a 0,05 (*p-valor<0,05; **p-valor<0,01; ***p-valor<0,001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair

1

María Ovejero-Sánchez^{1,2,3}, Rogelio González-Sarmiento^{1,2,3*} and Ana Belén Herrero^{1,2,3*}

¹Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

²Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (IBMCC), University of Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

Neoplasia. 2021 May;23(5):515-528. doi: [10.1016/j.neo.2021.04.003](https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.04.003)

PMID: 33930758

CAPÍTULO 1: Efecto de la combinación de cloroquina y Panobinostat en líneas celulares de cáncer de ovario

Como se comentó en el apartado de hipótesis y objetivos, los inhibidores de histona deacetilasa (HDACi) suponen una estrategia terapéutica prometedora en el tratamiento de distintos tipos de tumores¹⁶³. El Panobinostat es un HDACi que fue aprobado por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento del mieloma múltiple en 2015. Estos fármacos inhiben las HDACs, reguladores críticos de la expresión génica, lo que promueve la activación de múltiples genes que aparecen silenciados en tumores humanos¹⁶⁴. Estos agentes también ejercen otra serie de efectos celulares como son la expresión de genes pro-apoptóticos, la diferenciación celular, la parada del ciclo celular, la alteración de la reparación del DNA y la inducción del proceso de autofagia^{159,163,165-169}. Este último, en vez de tener un efecto antitumoral, parece ser un mecanismo de resistencia a fármacos, ya que permitiría a las células tumorales reciclar sus proteínas y orgánulos dañados para generar energía y evitar la muerte celular¹⁷⁰. Por esta razón, múltiples autores han analizado el efecto de la combinación de HDACi con fármacos inhibidores del proceso de autofagia, como la cloroquina, y han encontrado un efecto sinérgico en distintas líneas celulares (cáncer de mama, de colon, de neuroblastoma o de leucemia)¹⁷¹⁻¹⁷⁶.

La cloroquina, como se comentó previamente, se ha empleado para el tratamiento de la malaria; sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a usar también para el tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias o autoinmunes¹⁷⁷. A nivel celular, la cloroquina es una base débil que puede aumentar el pH de los compartimentos celulares, por lo que podría bloquear el proceso autofágico al aumentar el pH del lisosoma. No obstante, también se ha descrito que puede inhibir este proceso alterando la fusión del autofagosoma y el lisosoma¹⁷⁸. Existen múltiples ensayos clínicos donde la cloroquina ha mostrado aumentar la eficacia de tratamientos antitumorales, si bien, no está claro que este efecto solo se deba solamente a la alteración de la autofagia^{154,179,180}.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió caracterizar el efecto de la cloroquina y el panobinostat en distintas líneas celulares de cáncer de ovario. En primer lugar, se estudió el efecto individual de los estos dos fármacos para, a continuación, analizar el efecto de la combinación. Los resultados obtenidos fueron publicados recientemente¹⁸¹ (Anexo I) y se describen a continuación.

1.1. La cloroquina inhibe la proliferación celular, induce apoptosis y bloquea la autofagia en líneas celulares de cáncer de ovario

En primer lugar, se decidió estudiar el efecto de la cloroquina (CQ) en la proliferación de cuatro líneas celulares de cáncer de ovario (A2780, IGROV-1, OVCAR-8 y SK-OV-3). Para ello se emplearon diferentes concentraciones de este fármaco y se midió la viabilidad celular, en presencia o ausencia de CQ, a distintos tiempos mediante ensayos MTT. Asimismo, se calculó la IC₅₀ a las 72 horas de tratamiento. El resultado obtenido se resume en la **Figura 14**. Puede observarse cómo la CQ afectó a la proliferación de las cuatro líneas celulares de una manera dependiente de dosis y tiempo. Las líneas celulares estudiadas mostraron distinta sensibilidad al fármaco, siendo la línea A2780 la más sensible (IC₅₀=12,31μM) y la línea IGROV-1 la más resistente (IC₅₀=29,05μM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

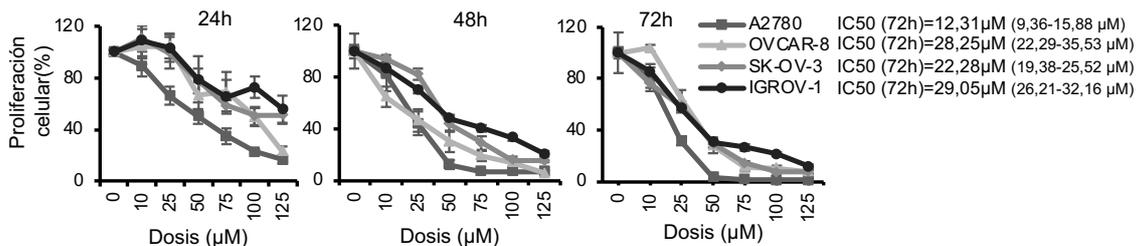


Figura 15. Efecto de la cloroquina en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de CQ indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Una vez caracterizado su efecto en la proliferación celular, se estudió el efecto de este fármaco en el ciclo celular. Encontramos que no existían grandes diferencias entre los perfiles de ciclo celular de las células tratadas y no tratadas con CQ. Únicamente se detectó un aumento en la fase G₀/G₁ a 24 horas de tratamiento en algunas líneas celulares, y un leve aumento en la muerte celular (sub-G₀) en las distintas líneas celulares (**Figura 15**).

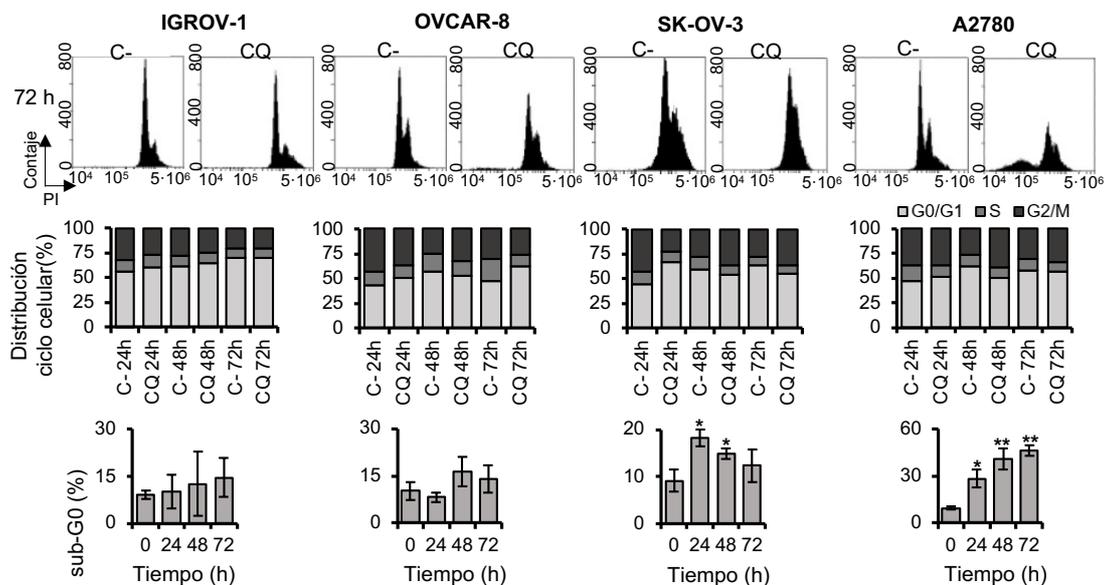


Figura 14. Efecto de la cloroquina en el ciclo celular. Panel superior: ciclo celular tras el tratamiento con CQ (50 µM) durante 72h. Panel medio: distribución de ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas comparando las células tratadas con 50 µM de CQ con las no tratadas excluyendo la población sub-G₀. Panel inferior: porcentaje de células muertas (sub-G₀) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con 50 µM de CQ. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

Para determinar si el efecto citotóxico observado se debía a la inducción de apoptosis, se llevó a cabo un marcaje con anexina V y yoduro de propidio (PI) y la fluorescencia celular se determinó mediante citometría de flujo. Encontramos que el tratamiento con cloroquina indujo apoptosis de una manera dosis dependiente, siendo la línea A2780 la más sensible (**Figura 16**).

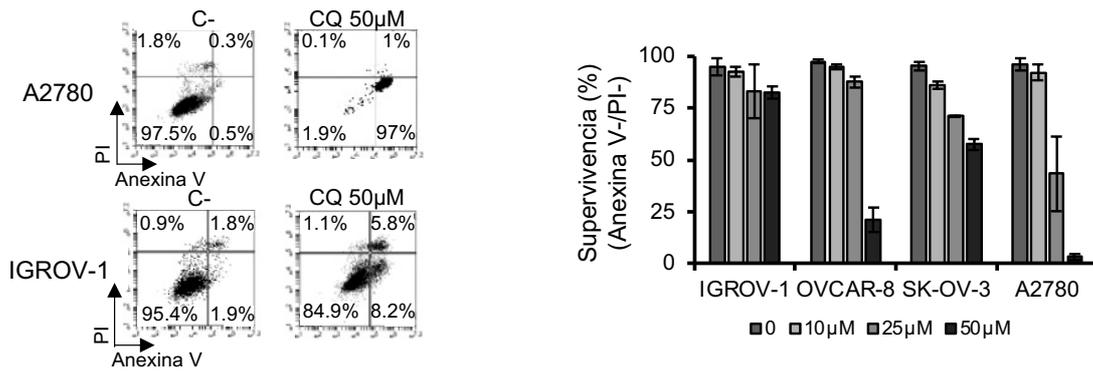


Figura 16. Efecto de la cloroquina en la supervivencia celular. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de CQ indicadas y posteriormente se marcaron con yoduro de propidio y anexina V. Se muestran *dot plots* en los que se observa el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas) y necróticas (PI positivas). La supervivencia celular tras los tratamientos se muestra en el gráfico de la derecha donde los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

La cloroquina es un conocido inhibidor del proceso de autofagia¹⁷⁸, por lo que se estudió este proceso mediante el análisis de la expresión de distintas proteínas implicadas en esta vía (p62, Beclin-1 y LC3B) mediante western blot. El tratamiento con cloroquina aumentó los niveles de LC3B-II, Beclin-1 y p62 (excepto en la línea IGROV-1). Estos resultados sugieren que el proceso de autofagia está bloqueado^{178,179}. Para confirmarlo, se llevó a cabo un estudio de LC3B mediante inmunofluorescencia. De esta manera se observó una clara acumulación de autofagosomas en el citoplasma celular (**Figura 17**) tras el tratamiento con CQ.

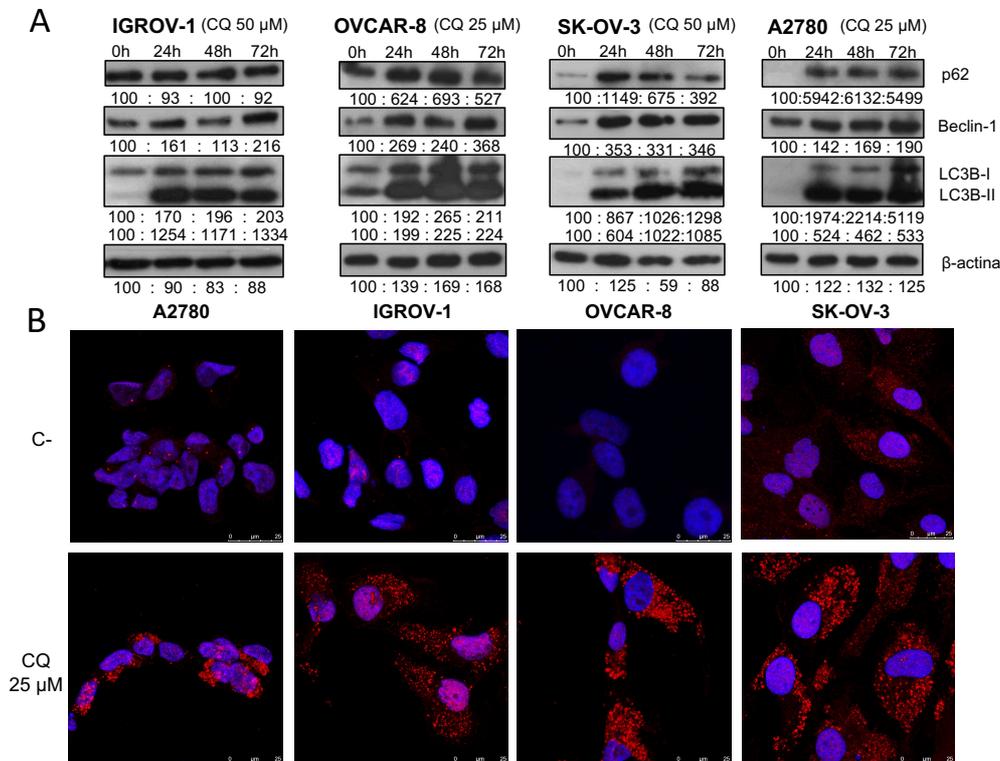


Figura 17. Efecto de la cloroquina en el proceso de autofagia. (A) Niveles de las proteínas de autofagia después del tratamiento con 25 o 50 μM de CQ durante 24, 48 o 72 horas. Los niveles de β-actina se emplearon como control de carga. Los valores se normalizaron con los correspondientes a 0h que se tomaron como 100. (B) Inmunofluorescencia de LC3B después del tratamiento durante 72h con 25 μM de CQ.

1.2. El Panobinostat inhibe la proliferación celular e induce parada en la fase G2/M del ciclo celular, apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer de ovario

Una vez estudiado el efecto de la cloroquina en las líneas celulares de cáncer de ovario, se decidió analizar el efecto del Panobinostat (LBH) en estas líneas. Primero, se estudió su efecto en la proliferación celular, observándose una inhibición de la proliferación de manera dosis y tiempo dependiente (**Figura 18**). La línea celular OVCAR-8 resultó ser la más sensible a este compuesto, con un IC₅₀ de 8,93 nM.

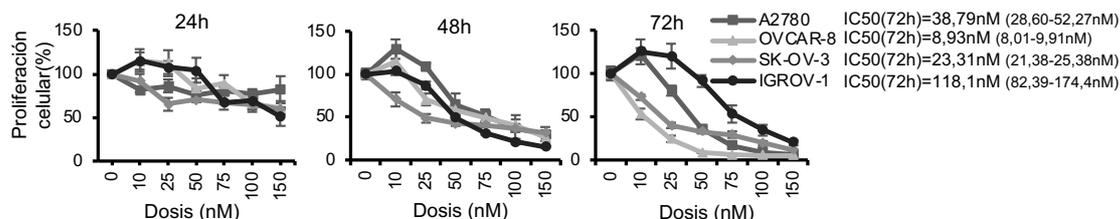


Figura 18. Efecto del Panobinostat en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de LBH indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Después, se estudió el efecto del LBH en el ciclo celular. Dicho estudio reveló que este compuesto generaba un aumento en el porcentaje de células en G2/M en las líneas celulares más sensibles (OVCAR-8, SK-OV-3) y un fuerte incremento en el porcentaje de células muertas en las cuatro líneas celulares tras 72 horas de tratamiento (**Figura 19**).

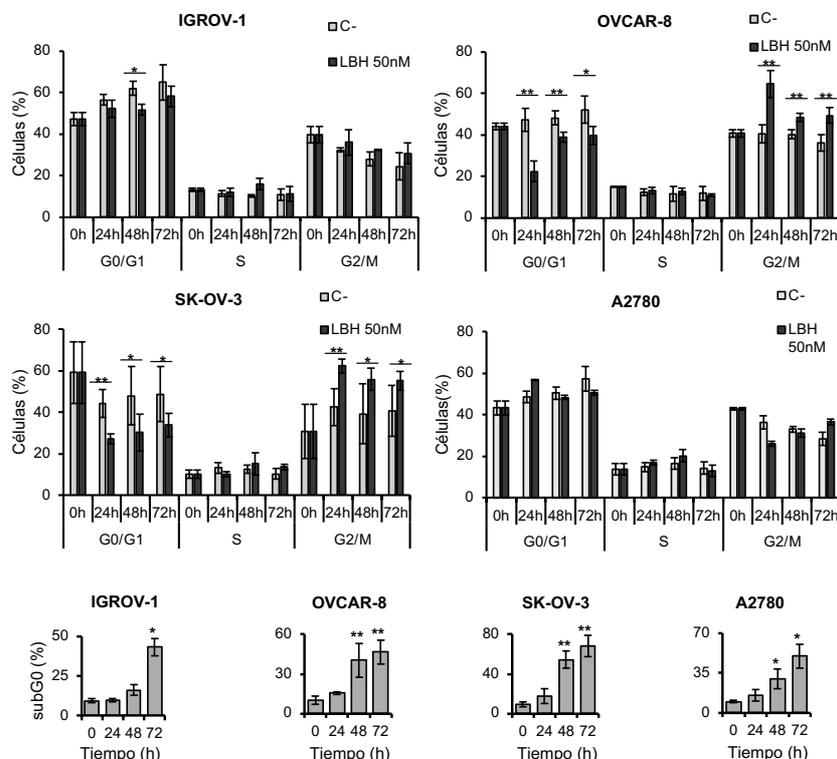


Figura 19. Efecto del LBH en el ciclo celular. Panel superior: porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de LBH. Panel inferior: porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con 50 nM de LBH. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

Para determinar si la muerte celular observada se producía por apoptosis, las células se marcaron con anexina V y yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. Se observó que el tratamiento con LBH inducía apoptosis de una manera dosis dependiente, siendo la línea celular OVCAR-8 la más sensible a este compuesto (**Figura 20**).

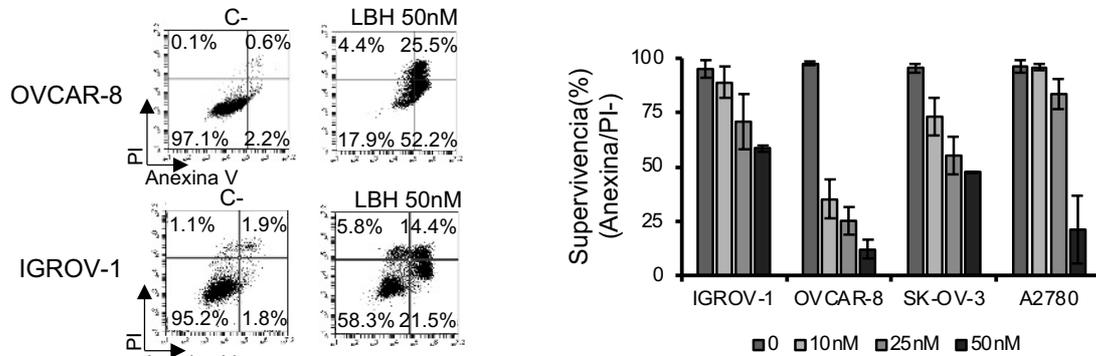


Figura 20. Efecto del Panobinostat en la supervivencia celular. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de LBH indicadas y se marcaron con yoduro de propidio y anexina V. Se muestran *dot plots* en los que se observa el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas) y necróticas (PI positivas). La supervivencia celular tras los tratamientos se muestra en el gráfico de la derecha donde los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Se ha descrito que varios HDACi pueden inducir autofagia por distintos mecanismos¹⁸²⁻¹⁸⁵. Por ello, se estudiaron distintas proteínas relacionadas con esta vía mediante western blot. El tratamiento con LBH generó una disminución de la proteína p62, excepto en la línea A2780, así como un aumento de Beclin-1 y LC3B-I, lo que es indicativo de un aumento en el proceso de autofagia (**Figura 21**).

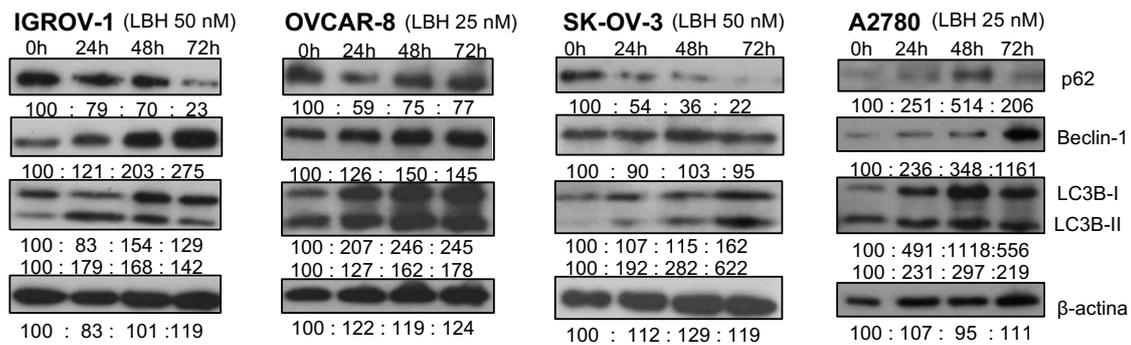


Figura 21. Efecto del Panobinostat en el proceso de autofagia. Se muestran los niveles de expresión de las proteínas de autofagia después del tratamiento con 25 o 50 nM de LBH durante 24, 48 o 72 horas. Los niveles de β-actina se emplearon como control de carga. Los valores se normalizaron con los correspondientes a 0h que se tomaron como 100.

1.3. La combinación de cloroquina y Panobinostat produce un efecto sinérgico sobre la muerte celular en líneas celulares de cáncer de ovario

Tras el estudio del efecto de la cloroquina y el Panobinostat de manera individual, se analizó el efecto de la combinación de estos fármacos comparándolo con el obtenido con los tratamientos individuales en las cuatro líneas celulares de ovario. Cuando las células fueron tratadas con la dosis más alta de CQ (20 μ M) y de LBH (20 nM) mostraron una supervivencia celular muy inferior a la observada tras el tratamiento con cada fármaco de manera individual. Para investigar si este efecto era sinérgico, se emplearon distintas dosis de cada fármaco manteniendo el ratio constante y se calculó el índice de combinación (CI) con el software Compusyn. Los índices de combinación obtenidos fueron inferiores a 1 en todos los casos, lo que indica un efecto sinérgico entre los dos compuestos, obteniéndose el mayor efecto sinérgico en las líneas celulares A2780 y OVCAR-8 (**Figura 22**).

1.4. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tiene un papel crítico en la letalidad generada por el tratamiento combinado con CQ y LBH

Se ha descrito previamente que los HDACi y la CQ ejercen efectos pleiotrópicos en las células. Estos efectos podrían contribuir a su citotoxicidad y al efecto sinérgico observado. Uno de estos efectos es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{184,186-192}, por lo que decidimos estudiar la producción de dichas especies tras el tratamiento con distintas dosis y tiempos de los fármacos en estudio. El tratamiento con CQ produjo una rápida inducción de ROS (15 minutos) en las distintas líneas celulares, de acuerdo con lo encontrado en otros estudios¹⁹³. Esta generación no se produjo cuando las líneas se trataron con CQ y el antioxidante N-Acetil-L-cisteína (NAC). El LBH, por su parte, no generó ROS en este corto tiempo, por lo que se estudió la generación de estas especies a tiempos más largos. Tras 24 horas de tratamiento, se observó una producción de ROS cuando las células eran tratadas con LBH, excepto en el caso de la línea A2780. En el caso de los tratamientos combinados se observó un incremento en la producción de ROS, que fue superior al obtenido en los individuales en el caso de la línea OVCAR-8 (**Figura 23**).

A continuación, se llevó a cabo un estudio de apoptosis para determinar si la producción de ROS era clave en el efecto citotóxico observado con los distintos tratamientos. Para ello se comparó la supervivencia celular con los distintos tratamientos con o sin la adición de NAC. La adición del antioxidante evitó la muerte celular producida por la CQ en la línea más sensible a este fármaco (A2780); sin embargo, esta reducción de la citotoxicidad no se observó cuando las células se trataron con LBH. En el caso del tratamiento combinado, la NAC redujo significativamente la apoptosis generada por el tratamiento con CQ y LBH (**Figura 23**) en todas las líneas celulares estudiadas.

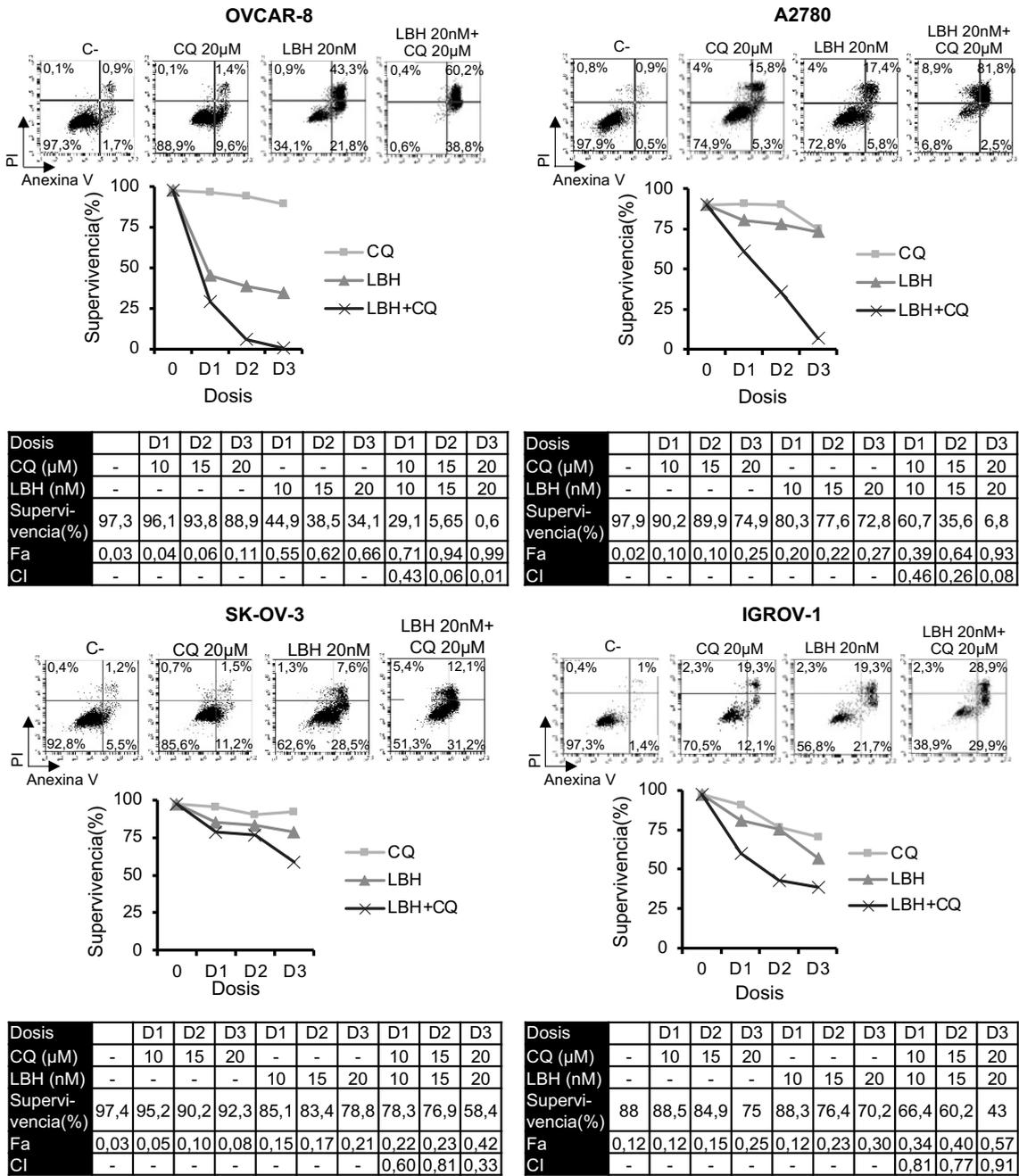


Figura 22. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y Panobinostat. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa, fracción de células muertas) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

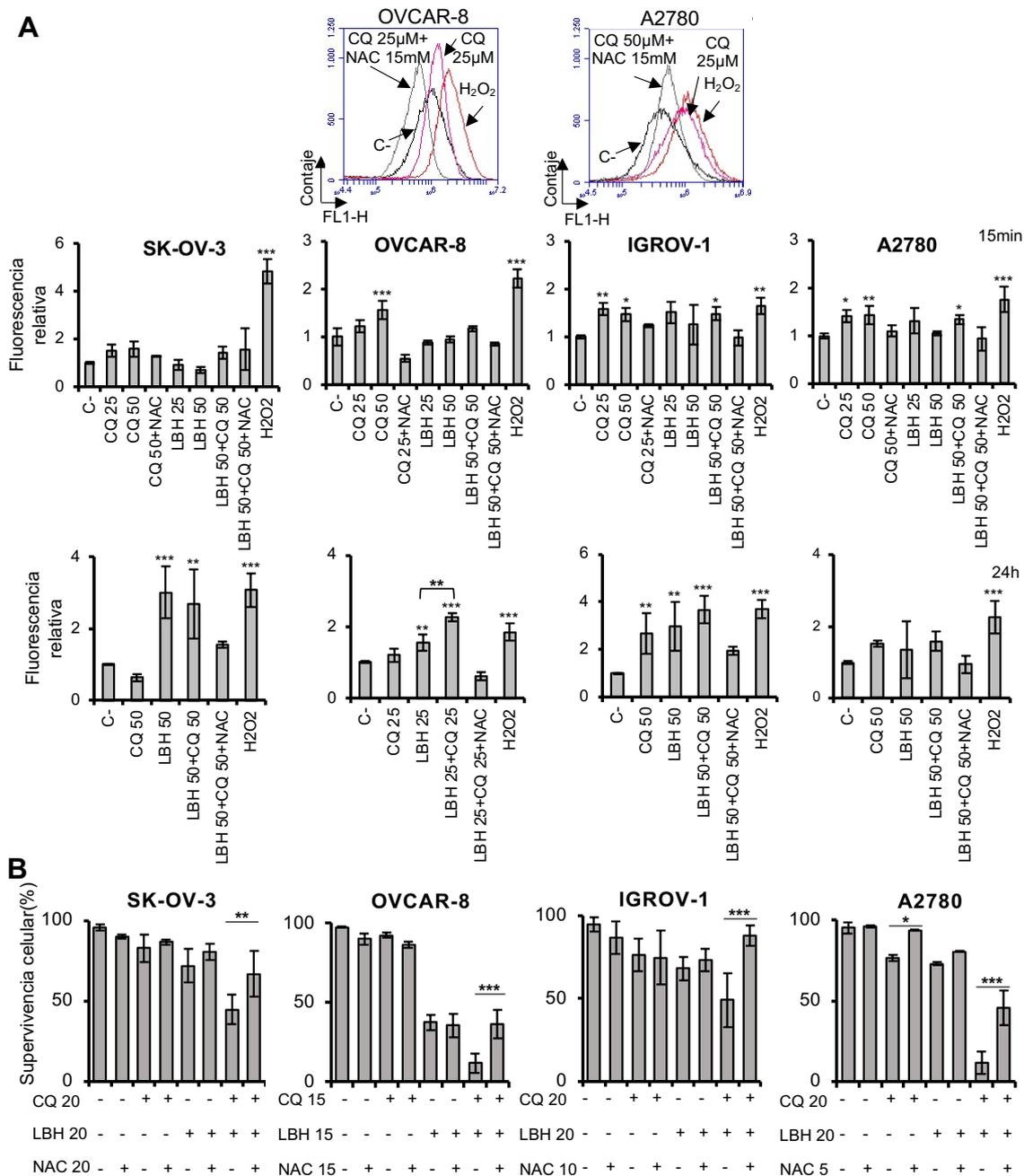


Figura 23. Generación de ROS después del tratamiento con CQ y LBH y efecto en la letalidad generada por el tratamiento combinado. (A) Panel superior: figura representativa de la producción de ROS tras 15 minutos de tratamiento con las dosis indicadas de CQ (μM) y como se evita esta generación con la adición de NAC (mM). Panel medio: generación de ROS con los distintos tratamientos indicados de 15 minutos. Panel inferior: producción de ROS con los distintos tratamientos indicados de 24h. En todos los casos, se empleó como control células tratadas durante 15 minutos con H_2O_2 (1 mM). (B) Supervivencia celular tras 72h de tratamiento con las distintas dosis indicadas. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (** $p < 0,001$; * $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

1.5. La cloroquina induce roturas de doble cadena (DSBs) en el DNA que se evitan con la adición de N-Acetil-L-cisteína

Las especies reactivas de oxígeno generan daño en el DNA, incluyendo DSBs^{194,195}. Para analizar si la cloroquina y el panobinostat producían este tipo de daño, se estudió por inmunofluorescencia la fosforilación de la histona H₂AX (γ H₂AX), un conocido marcador de este tipo de roturas. Como se observa en la **Figura 24**, el tratamiento con CQ generó DSBs en las cuatro líneas celulares. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con CQ y NAC el porcentaje de células con más de 5 focos se redujo, lo que indica claramente que las DSBs producidas por la CQ se debían a la producción de ROS. El tratamiento con LBH, por su parte, incrementó significativamente la cantidad de roturas de doble cadena en las líneas más sensibles a este tratamiento (OVCAR-8 y SK-OV-3); sin embargo, la adición de NAC no redujo la presencia de este daño (**Figura 25**). Además, los focos de γ H₂AX observados tras este tratamiento fueron más grandes que los provocados por la CQ, especialmente en las líneas OVCAR-8 y SK-OV-3. Estos focos podrían reflejar daño en el DNA persistente o irreparable y podrían corresponderse con lesiones especialmente difíciles de reparar¹⁶¹.

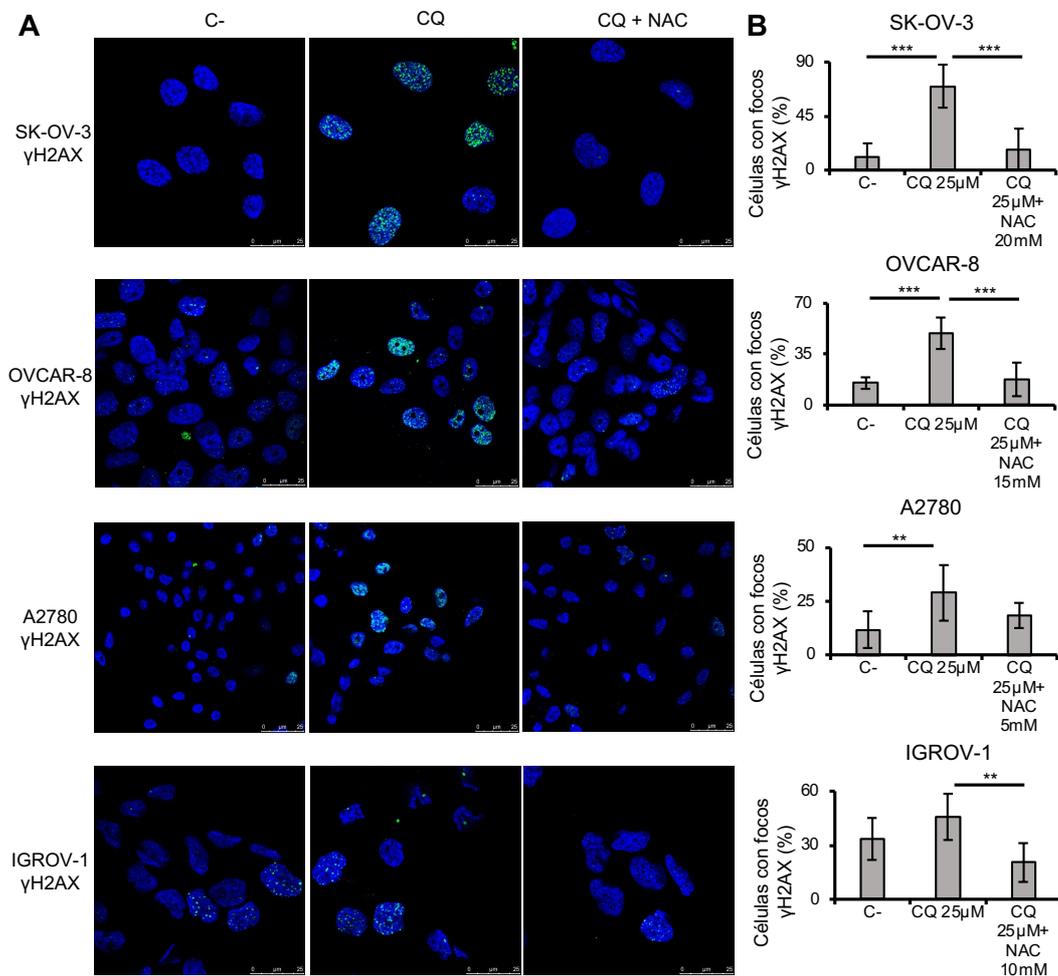


Figura 24. El tratamiento con cloroquina induce roturas de doble cadena que se evitan con la adición de NAC. (A) Los focos de γ H₂AX se visualizaron por microscopía confocal y (B) el porcentaje de células con más de cinco focos de γ H₂AX tras 48h (A2780, OVCAR-8) o 72h (IGROV-1, SK-OV-3) de tratamiento con 25 μ M de CQ o CQ y NAC. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos 50 células por condición y línea celular y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; ***p < 0,001; *p < 0,05).

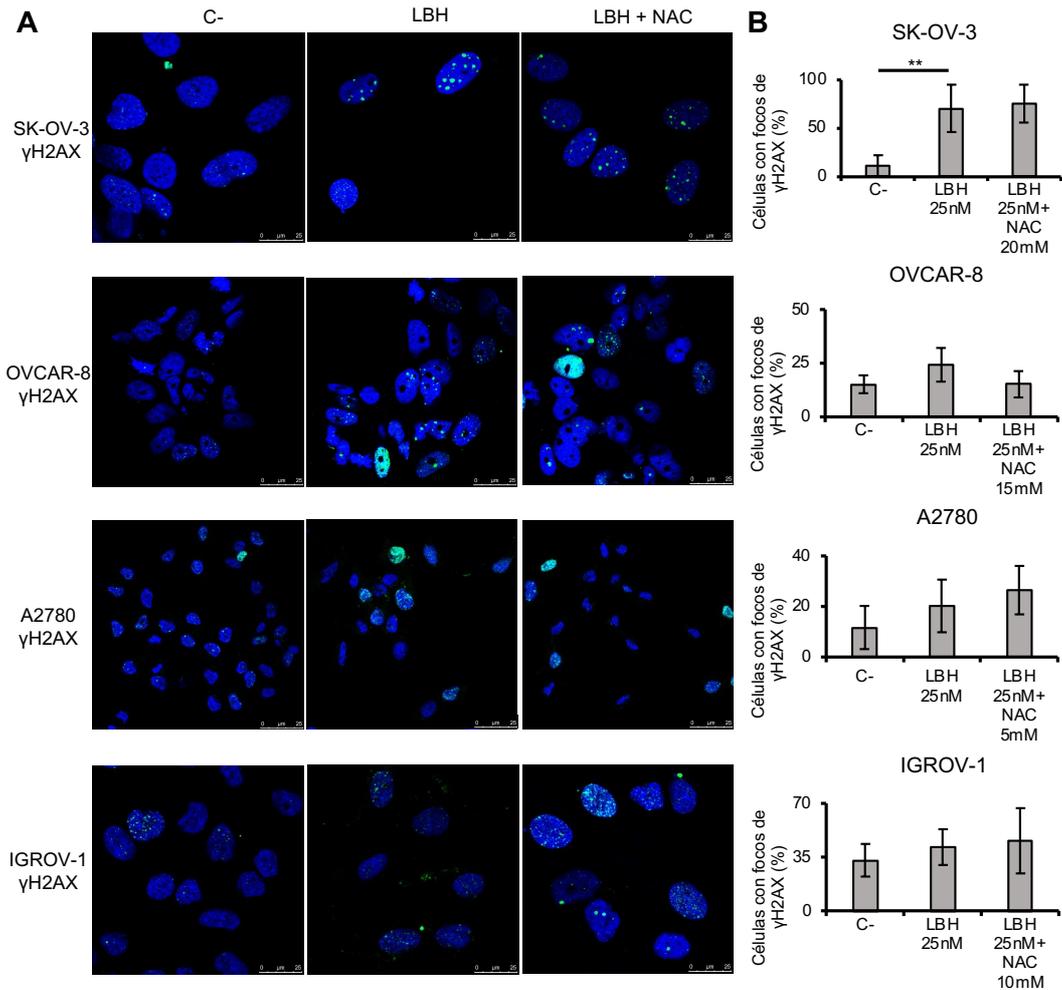


Figura 25. El tratamiento con Panobinostat induce roturas de doble cadena que no se evitan con la adición de NAC. (A) Los focos de γ H2AX se visualizaron por microscopía confocal y (B) el porcentaje de células con más de cinco focos de γ H2AX tras 48h (A2780, OVCAR-8) o 72h (IGROV-1, SK-OV-3) de tratamiento con 25 nM de LBH o LBH y NAC. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos 50 células por condición y línea celular y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

1.6. El Panobinostat inhibe la reparación por recombinación homóloga (HRR)

Estudios anteriores han descrito que algunos HDACi pueden afectar a la reparación de DSBs inhibiendo su reparación mediante recombinación homóloga^{159,167,196}. Teniendo en cuenta esto y la visualización de focos de γ H2AX de mayor tamaño tras el tratamiento con LBH, se decidió estudiar si el LBH podría afectar a la reparación del DNA por recombinación homóloga. Esto podría explicar la sinergia encontrada entre la CQ y el LBH, puesto que la CQ produciría DSBs que no podrían ser reparadas por la acción del LBH sobre los mecanismos de reparación. Para ello, se midió, en primer lugar, la eficiencia de HRR en presencia o ausencia de LBH en una línea celular de mieloma múltiple (JYN3-HR) que tiene integrado en su genoma un *cassette* reportero que permite testar este tipo de reparación. Dicha línea celular había mostrado ser un sistema óptimo para medir HR en estudios publicados anteriormente^{158,159}. Las células JYN3-HR se pretrataron con LBH durante 24h y, posteriormente, se transfectaron con un plásmido que codifica la endonucleasa *I-SceI* y

también con un plásmido que permite la expresión de la proteína roja fluorescente (pDsRed-N1). Este último, permite normalizar las posibles diferencias en la eficiencia de transfección. Una vez transfectadas mediante electroporación las células se volvieron a incubar otras 72h en presencia o ausencia de LBH. Este sistema permite detectar las células capaces de reparar el DSB generado por la enzima *I-SceI* por HR, ya que expresan la GFP. El número de células GFP+ se determinó mediante citometría de flujo. Se empleó también un inhibidor de HRR (mirin) como control positivo de este sistema. Como resultado encontramos que el panobinostat disminuyó claramente el número de células verdes comparado con las que aparecían en las células no tratadas (**Figura 26**). Para validar este hallazgo en cáncer de ovario, se generó una línea celular de cáncer de ovario que portaba el *cassette* reportero, (SK-OV-3-HR) y se encontró el mismo efecto que en la línea celular de mieloma (**Figura 26**).

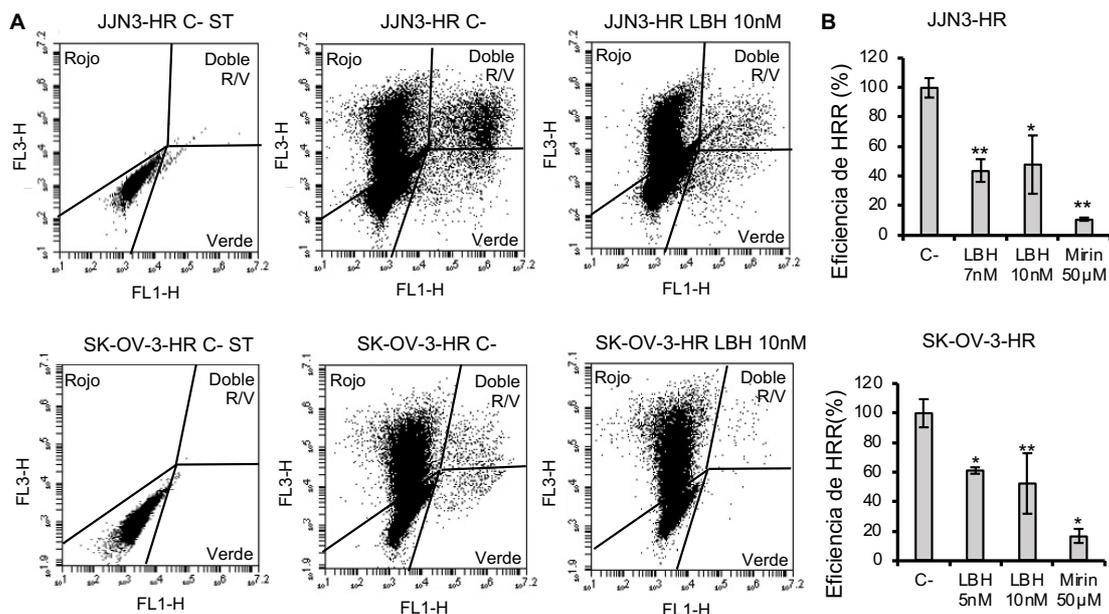


Figura 26. El Panobinostat inhibe la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga. (A) Las líneas celulares reporteras fueron pretratadas o no con LBH 24h y después transfectadas o no (ST) con 5 µg de un plásmido que codifica la endonucleasa *I-SceI* y 0,5 µg de pDsRed2-N1. Las células se incubaron de nuevo con LBH otras 72h. (B) Eficiencia de HRR calculada como el ratio de células verdes entre células rojas. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

1.7. El Panobinostat inhibe el correcto reclutamiento de la proteína Rad51 a las roturas de doble cadena del DNA

Distintos estudios han mostrado que ciertos HDACi pueden disminuir los niveles de Rad51 o afectar al reclutamiento de esta proteína a las DSBs^{159,167,168,197-199}. Por lo tanto, decidimos analizar la localización de la proteína Rad51 tras tratar las células con cloroquina, Panobinostat o ambos mediante inmunofluorescencia. Además, dichas células se marcaron con γ H₂AX para localizar los focos de daño. Encontramos que el tratamiento con CQ generó un aumento en el número de lesiones y se formaron múltiples focos de γ H₂AX que colocalizaban con la proteína Rad51, como cabría esperar. Sin embargo, cuando la línea celular SK-OV-3 se trató con LBH aparecieron focos de γ H₂AX, pero no de Rad51. En el caso de la línea OVCAR-8 cuando era tratada con LBH, se observó que la proteína Rad51 se localizaba en el citoplasma y el nucléolo, pero no formaba focos en los lugares de daño (**Figura 27**).

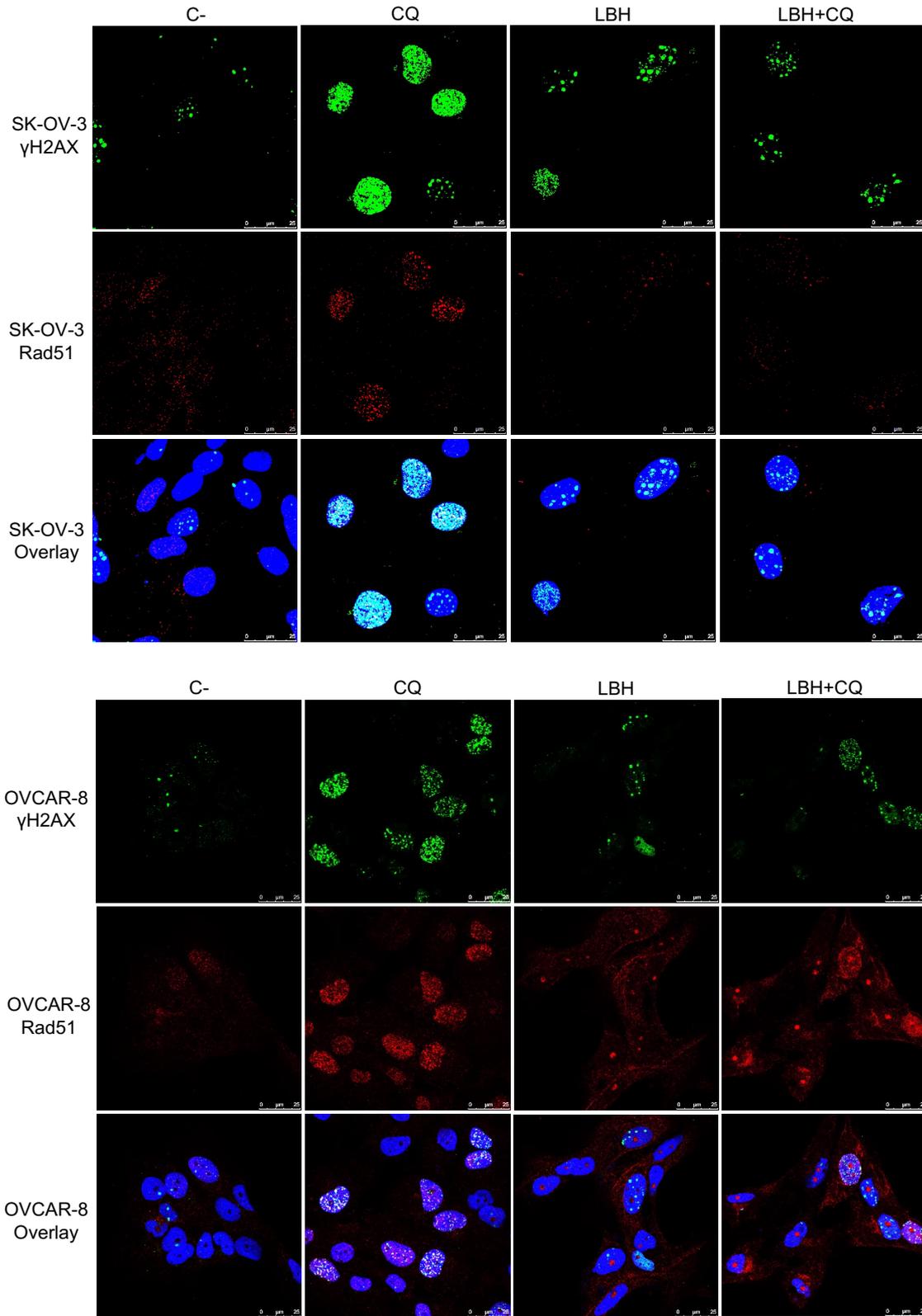


Figura 27. Efecto del Panobinostat en el correcto reclutamiento de la proteína Rad51 a las roturas de doble cadena del DNA. Inmunofluorescencia de las líneas OVCAR-8 y SK-OV-3 tratadas con 25 μ M de CQ, 25 nM de LBH o ambos y las células se marcan con DAPI (núcleos), Rad51 (rojo) y γ H2AX (verde).

1.8. La combinación de mirin y cloroquina tiene un efecto sinérgico sobre la muerte celular en líneas celulares de ovario

Para corroborar que la sinergia entre la cloroquina y el Panobinostat se podría deber a la inducción de DSBs por la CQ y la inhibición de la reparación por HR por el LBH, se estudió el efecto del tratamiento combinando con CQ y mirin, un conocido inhibidor de HRR. Los resultados se muestran en la **Figura 28** donde se observa como el tratamiento combinado de CQ/mirin generó una mayor muerte celular que los tratamientos individuales en las cuatro líneas celulares. Cuando se estudió si el efecto era sinérgico, se observó que en tres de las cuatro líneas celulares (A2780, IGROV-1 y SK-OV-3) se aumentó sinérgicamente la muerte celular cuando se empleaba la cloroquina junto con mirin comparando con los tratamientos en monoterapia ($CI < 1$).

1.9. La combinación de bafilomicina A1 y Panobinostat tiene un efecto sinérgico sobre la muerte celular en líneas celulares de ovario

Se ha descrito en numerosos estudios que los inhibidores de autofagia, como la cloroquina, pueden mejorar la respuesta citotóxica de HDACi que inducen el proceso autofágico. Por lo tanto, el efecto sinérgico observado por el tratamiento combinado con CQ y LBH también se podría deber, al menos en parte, a la acción de los fármacos sobre la autofagia. Para testar esta hipótesis estudiamos si el tratamiento con bafilomicina A1, un conocido inhibidor de la autofagia podría mejorar el efecto citotóxico del panobinostat. En la **Figura 28** se ve como el tratamiento combinado de LBH/Baf generó una mayor muerte celular que los tratamientos individuales en tres de las cuatro líneas celulares (IGROV-1, OVCAR-8 y SK-OV-3). Cuando se estudió si el efecto era sinérgico, se observó que, en estas tres líneas celulares, el efecto era sinérgico, siendo mayor en la línea SK-OV-3 ($CI < 1$).

1.10. Efecto de la combinación de fármacos genotóxicos e inhibidores de la respuesta al daño en DNA en cáncer de ovario

Teniendo en cuenta los resultados observados tras el tratamiento con cloroquina y panobinostat, decidimos estudiar el efecto de nuevas combinaciones de fármacos basándonos en una estrategia similar; es decir, en la generación de daño en el DNA y la inhibición de la respuesta a dicho daño. Para ello, exploramos dos tipos combinaciones. Por un lado, se estudió el efecto de la combinación de la CQ (que provoca DSBs en el DNA) junto con distintos inhibidores de proteínas de señalización/reparación del daño. Por otro lado, se investigó la combinación de LBH (que inhibe la vía de reparación por HR) con un fármaco que provoca daño en el DNA, el cisplatino.

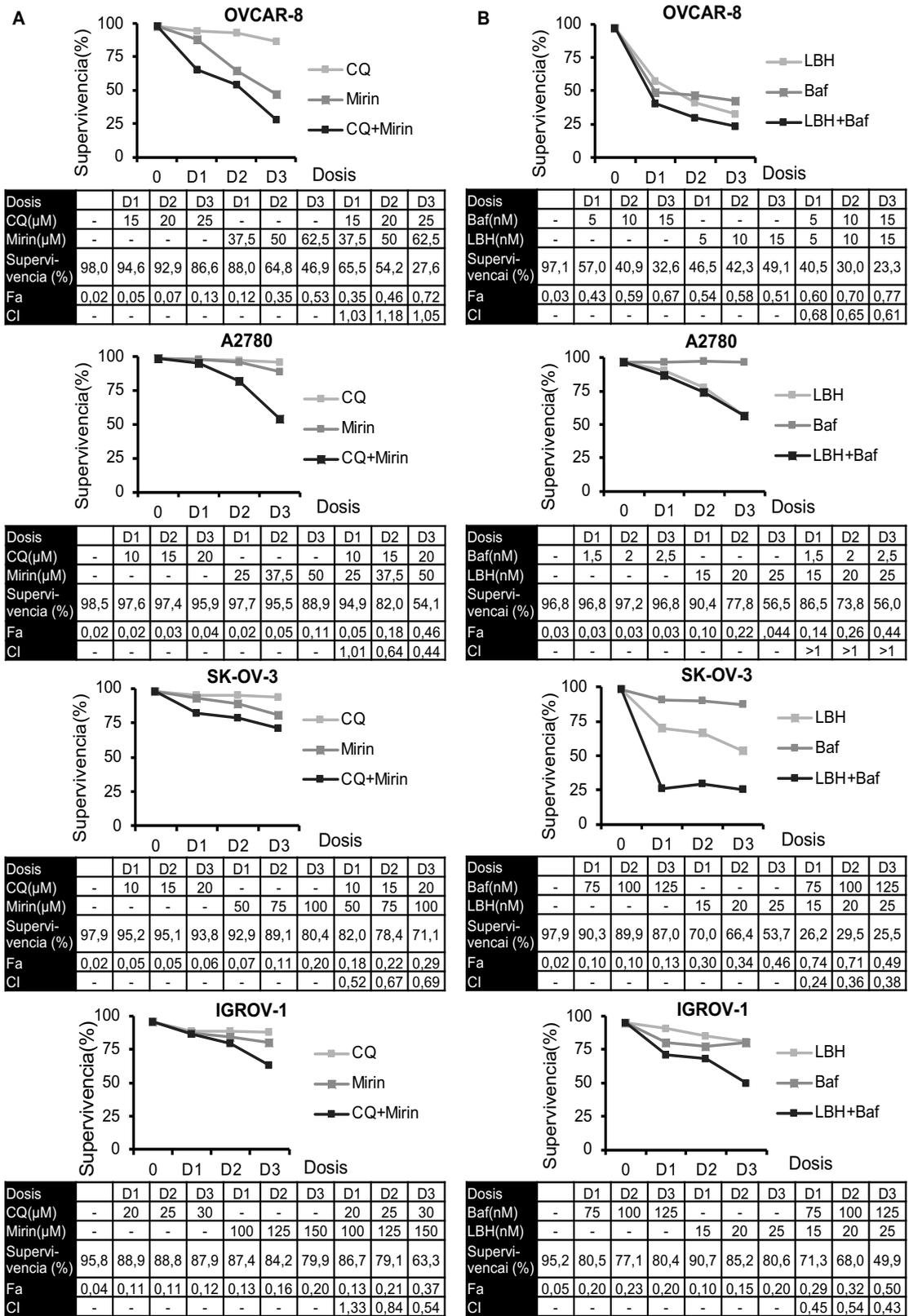


Figura 28. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con mirin/cloroquina y Panobinostat/bafilomicina A1. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

1.10.1. La combinación de cloroquina e inhibidores de ATM o ATR produce un efecto sinérgico en líneas celulares de cáncer de ovario

Las quinasas ATM y ATR son conocidas, principalmente, por su papel en la señalización del daño en el DNA, si bien varios trabajos indican que también ejercen un papel importante en la reparación de dicho daño. Así, ATM presenta un papel crítico para la reparación de DSBs mientras que ATR responde principalmente a SSBs²⁰⁰⁻²⁰². Cuando se produce una DSB, el complejo MRN se localiza en los sitios de daño, reclutando y activando a ATM. Asimismo, ATR también se activa gracias al complejo MRN y a ATM. Una vez activadas ATM y ATR, se induce la fosforilación de la histona H2AX y la activación de BRCA1 y PALB2. Tras lo cual, Rad51 buscará secuencias de homología en la cromátida hermana que se empleará como molde para reparar el daño en el DNA^{100,106}.

Teniendo en cuenta la importancia de las quinasas ATM y ATR en la reparación por HR, escogimos un inhibidor de cada una de estas proteínas para nuestro estudio. Los inhibidores escogidos fueron el VE-821, inhibidor de ATR, y KU-55933, inhibidor de ATM. En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de proliferación y se calculó el IC50 (Figura 29). Los inhibidores VE-821 y KU-55933 inhibieron la proliferación de manera dosis y tiempo dependiente, siendo la línea A2780 la más sensible a ambos compuestos.

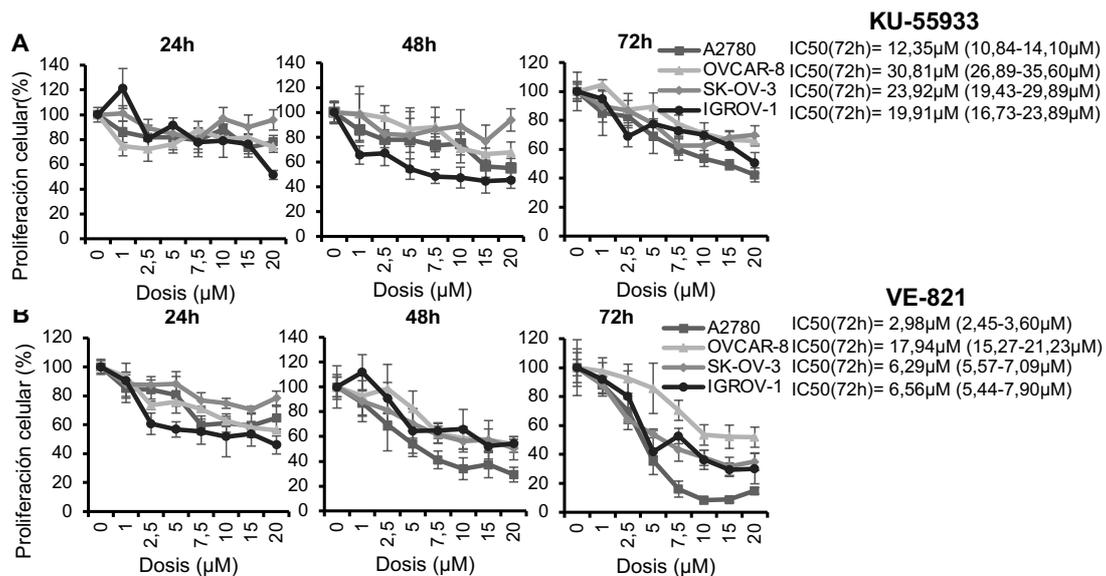


Figura 29. Efecto de los inhibidores respuesta al daño en el DNA en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de (A) KU-55933 o (B) VE-821 indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Posteriormente estudiamos el efecto combinado de los inhibidores de ATM y ATR con CQ. Se llevaron a cabo ensayos de apoptosis empleando distintas dosis de cada uno de los compuestos y manteniendo los ratios constantes para calcular los índices de combinación de cada una de las combinaciones. La combinación de CQ y el inhibidor de ATR, VE-821, consiguió un incremento de la muerte celular sinérgico en tres de las cuatro líneas celulares (A2780, IGROV-1, OVCAR-8) (CI<1) (Figura 30). En el caso del tratamiento con CQ y el inhibidor de ATM, KU-55933, se encontró que la interacción entre los dos fármacos era sinérgica en la línea celular A2780 y SK-OV-3 pero no en el caso de las líneas OVCAR-8 e IGROV-1 (Figura 30). Estos resultados sugieren que el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fondo genético de las distintas líneas celulares puede determinar una mayor o menor respuesta a estos tratamientos combinados.

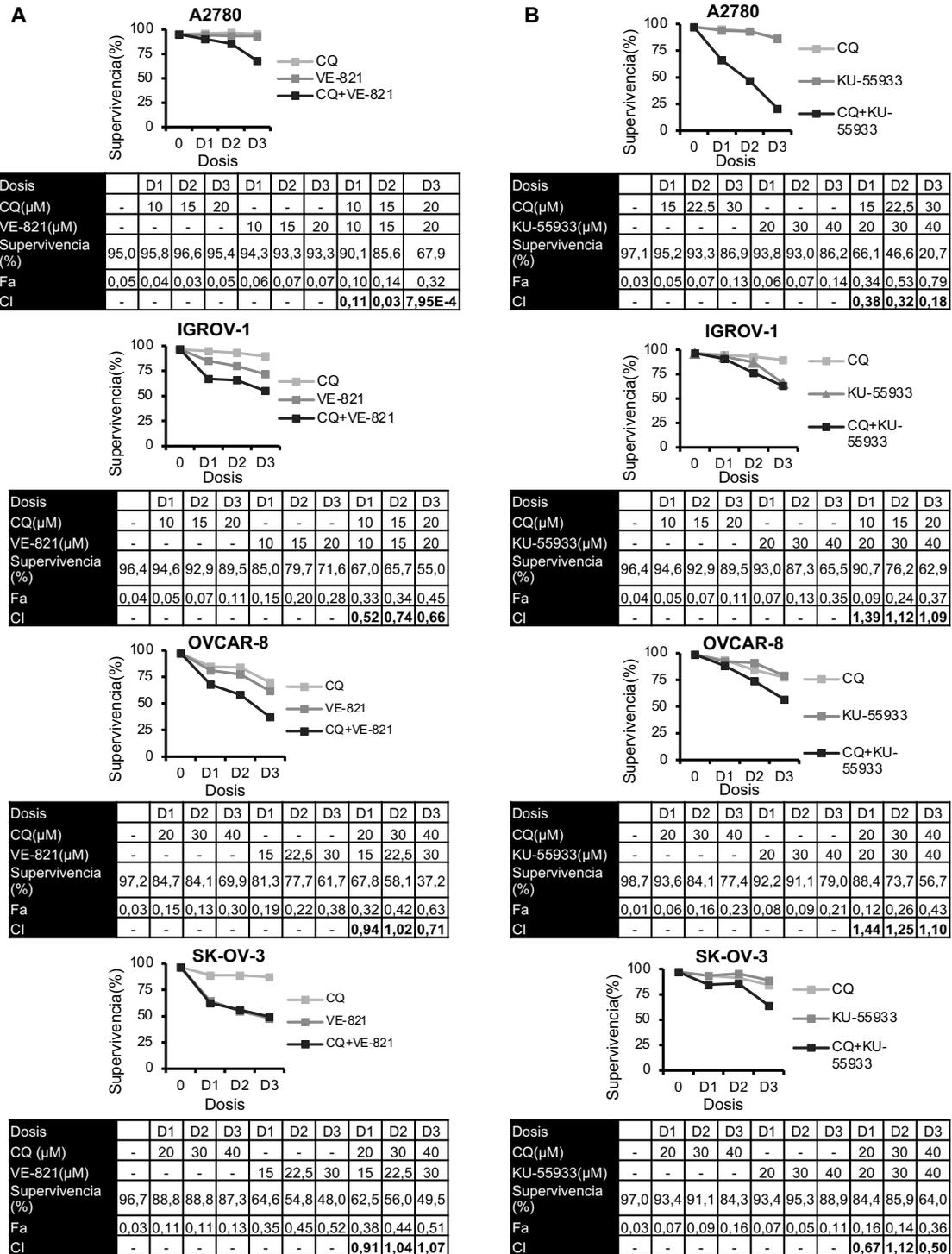


Figura 30. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina/VE-821 y cloroquina/KU-55933. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y VE-821/KU-55933 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

1.10.2. La combinación de Panobinostat y cisplatino produce sinergia en líneas celulares de cáncer de ovario

Posteriormente, se estudió la combinación de un agente causante de daño en el DNA como es el cisplatino, usado en la clínica para el tratamiento del cáncer de ovario, con el LBH, que, como se ha mostrado anteriormente, inhibe la HR en cáncer de ovario¹⁸¹. En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de proliferación para caracterizar el efecto del cisplatino en la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer de ovario. En la **Figura 31**, se muestran los resultados de los ensayos MTT, así como la IC₅₀ a 72 horas para cada una de las líneas celulares. El cisplatino inhibió la proliferación celular de dependiente de dosis y tiempo, siendo las líneas celulares más sensibles la A2780 y la IGROV-1 y las más resistentes la OVCAR-8 y la SK-OV-3 (**Figura 31**).

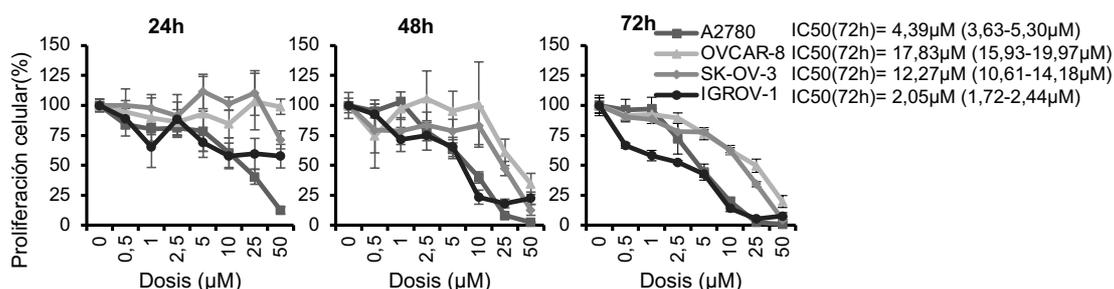


Figura 31. Efecto del cisplatino en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de cisplatino indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

Después se estudió el efecto de la combinación de cisplatino y LBH comparando éste con el obtenido con los tratamientos individuales en las cuatro líneas celulares de ovario. El tratamiento combinado mostró una citotoxicidad muy superior al tratamiento individual. Como se puede observar en la **Figura 32**, cuando las células se trataron con cualquiera de las dosis estudiadas de cisplatino (5 o 20 μM) y de LBH (20 nM) mostraron una supervivencia celular muy inferior a la que observada para cada fármaco individual. Para determinar si este efecto era sinérgico se calculó el índice de combinación (CI) con el software Compusyn. Los índices de combinación obtenidos en todos los casos fueron inferiores a 1, lo que indica un efecto sinérgico entre los dos compuestos. Dicho efecto fue mayor en las líneas celulares A2780 y OVCAR-8 (**Figura 32**).

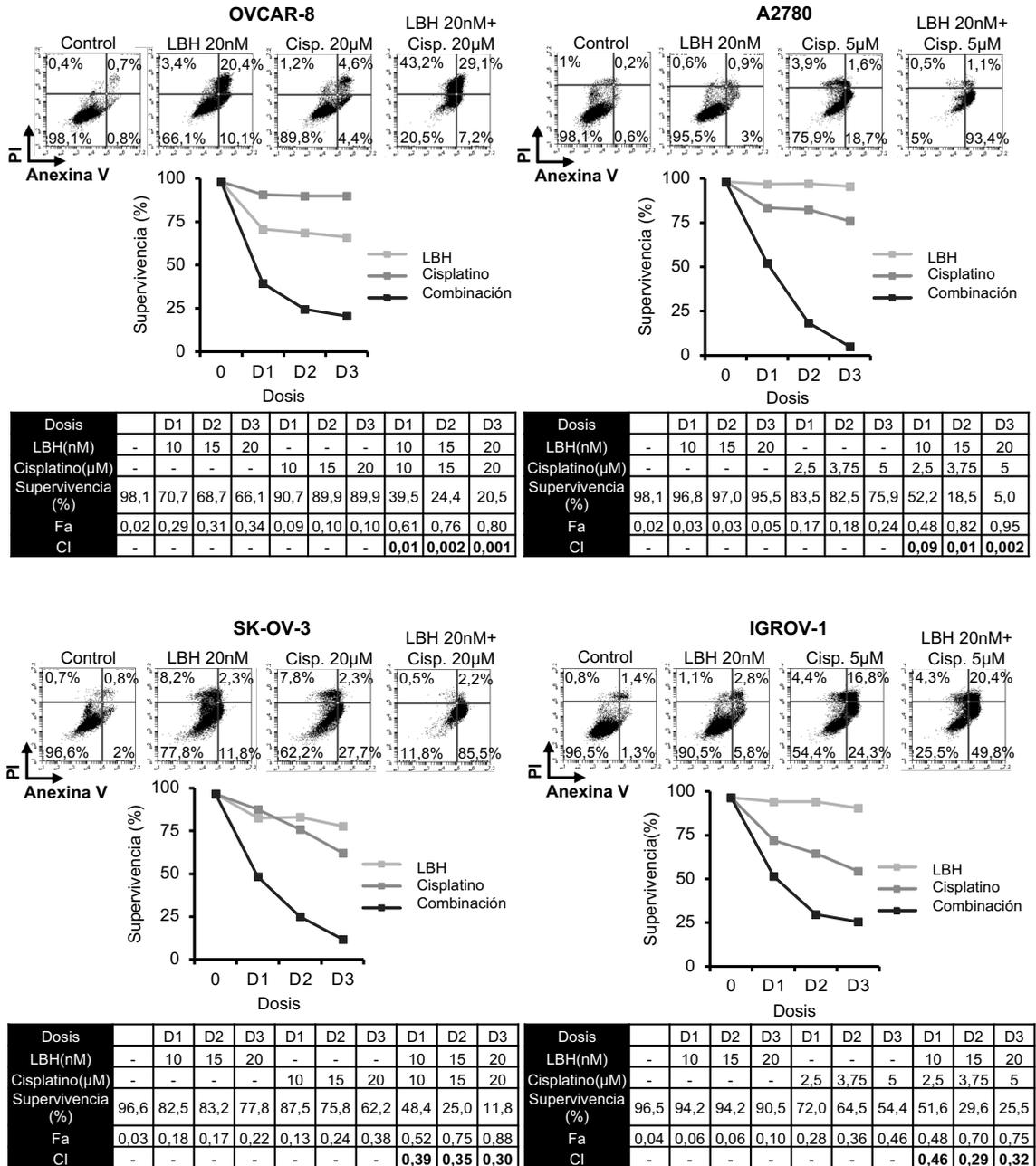


Figura 32. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y cisplatino. Las células se trataron durante 72h con LBH y Panobinostat a las dosis indicadas y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

DISCUSIÓN

La combinación de varios agentes terapéuticos es clave para el tratamiento del cáncer, especialmente en neoplasias con una baja supervivencia como es el cáncer de ovario, como se comentó previamente¹⁵¹. En concreto, tiene un gran interés la búsqueda combinaciones de fármacos que consigan un efecto aditivo o, si es posible, un efecto sinérgico¹⁵². Con esta aproximación se reduce la posibilidad de desarrollar quimiorresistencias y se reduce la toxicidad, al emplearse dosis inferiores de cada uno de los agentes. En nuestro trabajo, se describe por primera vez que el tratamiento con un inhibidor de histonas deacetilasas, el Panobinostat, y la cloroquina ejerce un fuerte efecto sinérgico frente a líneas celulares de cáncer de ovario y se analizan las causas de este efecto. Así pues, observamos que la cloroquina induce la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales provocan roturas de doble cadena en el DNA, mientras que el Panobinostat inhibe la correcta reparación de este daño por recombinación homóloga, lo que explicaría la sinergia observada¹⁸¹.

En un estudio previo se había descrito el efecto sinérgico de estos dos compuestos en líneas celulares de cáncer de mama¹⁷³. En este estudio se observaba como el tratamiento con LBH inducía el proceso de autofagia, generándose un aumento en la expresión de LC3B-II y una reducción de los niveles de p62. Estos resultados son similares a los que encontramos en nuestras líneas celulares de cáncer de ovario tras el tratamiento con este compuesto¹⁸¹. Teniendo en cuenta este dato, los autores proponen que las células tratadas con LBH dependerían del proceso autofágico para sobrevivir, siendo por lo tanto susceptibles al tratamiento con inhibidores de este proceso, como la CQ. El tratamiento con CQ aumentaba los niveles de LC3B-II y p62, indicando un bloqueo de la autofagia¹⁷³. Estos cambios en los niveles de LC3B y p62 también los observamos en nuestras líneas celulares¹⁸¹.

Distintos estudios han descrito que la respuesta citotóxica obtenida con HDACi aumenta en gran medida tras la adición de CQ, tanto *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se ha mostrado que distintas líneas celulares de cáncer de colon tratadas con CQ, o silenciadas en el gen *ATG7*, gen clave para el proceso de autofagia, presentaban una mayor respuesta a Vorinostat¹⁷². Asimismo, en leucemia mieloide crónica, el tratamiento con agentes que interrumpen la vía autofágica generaba una mejora en la respuesta citotóxica del Vorinostat¹⁷¹.

Sin embargo, el papel de la autofagia en la supervivencia celular cuando las células se tratan con HDACi no está claro, ya que otros trabajos han reportado el efecto opuesto. Por ejemplo, en carcinoma hepatocelular o en condrosarcoma se ha visto que la citotoxicidad causada por el Vorinostat se pierde cuando se emplea 3-metiladenina, inhibidor del proceso de autofagia, o se pierde el gen *ATG5*, importante en este proceso, lo cual indica que la autofagia sería necesaria para la muerte celular^{183,203}. Además, se ha descrito que la CQ aumenta la respuesta a agentes quimioterápicos a través de mecanismos independientes a la autofagia. En un estudio de Maycotte y colaboradores se demostró que la CQ aumentaba la sensibilidad de líneas celulares de cáncer de mama a la quimioterapia; sin embargo, cuando se empleaba otro inhibidor del proceso autofágico (bafilomicina A1) o se perdían los genes *ATG12* y *BECN1*, la sensibilidad no variaba¹⁷⁹. Para tratar de determinar el papel de la autofagia en la supervivencia de las células tratadas con HDACi, estudiamos la combinación de LBH con otro inhibidor de este proceso, la bafilomicina A1. Nuestros resultados muestran un efecto sinérgico en tres de las cuatro líneas celulares, lo que sugiere que este proceso puede contribuir a la eficacia de la combinación. De hecho, varios trabajos han mostrado la relevancia de

la inhibición de la autofagia para el tratamiento del carcinoma de ovario, ya que distintos agentes quimioterápicos (cisplatino o paclitaxel) estimulan este proceso, lo que contribuye a la resistencia al tratamiento¹¹⁹. No obstante, en la línea celular A2780 no encontramos un efecto sinérgico cuando tratamos con LBH y bacilomicina A. Este resultado, así como las discrepancias presentes en la literatura, se pueden atribuir a diferencias entre las distintas líneas celulares o bien a los HDACi empleados, pero también muestran que deben existir mecanismos independientes a la autofagia que contribuyan a este efecto sinérgico. En el caso de la línea A2780, la inducción de la autofagia por parte del LBH puede ser inferior que, en el resto de las líneas estudiadas, por lo que la sinergia podría deberse a otro mecanismo. De hecho, en esta línea no observamos una degradación de p62 cuando se trató con LBH.

Teniendo en cuenta que la CQ y los HDACi ejercen múltiples efectos en las células, decidimos estudiar otras vías independientes a la autofagia para explicar la sinergia encontrada entre la CQ y el LBH^{159,163,166,168,169,178-180,204,205}. Para investigar las causas de este efecto empleamos cuatro líneas celulares de cáncer de ovario que representan los subtipos histopatológicos de CO más frecuentes (seroso de alto grado, endometriode y de células claras). Las líneas A2780 e IGROV-1 derivan de un adenocarcinoma endometriode y representan este subtipo; de hecho, la línea IGROV-1 presenta una histología mixta albergando alteraciones típicas de los subtipos endometriode y de células claras. Las líneas OVCAR-8 y SK-OV-3, por su parte, se obtuvieron de un adenocarcinoma seroso de alto grado y de la ascitis de un cistoadenoma seroso, respectivamente.

En primer lugar, analizamos el efecto individual de los dos fármacos. El tratamiento con CQ inhibía la proliferación, lo que coincide con los resultados de estudios previos^{191,206}. Sin embargo, no observamos cambios en el ciclo celular, al igual que ocurre en el estudio de Carew y colaboradores, pero que contrasta con la parada en G0/G1 descrita por otros autores^{171,206}. Además, encontramos que este compuesto generaba ROS, en concordancia con lo observado previamente en distintas líneas celulares, y que estas especies eran las responsables de la aparición de DSBs en el DNA, ya que las roturas no aparecían cuando las células se incubaban en presencia del antioxidante NAC^{171,172,187,188,191,193,206,207}. Observamos que la producción de ROS ocurría de manera rápida, tras 15 minutos de tratamiento; sin embargo, se reducía pasadas 24 horas de tratamiento, con la excepción de la línea IGROV-1, lo que concuerda con estudios previos¹⁹³. Los mecanismos por los que la CQ promueve la producción de ROS no se han estudiado con profundidad, pero se ha descrito que la autofagia podría ayudar y evitar que se acumulen estas especies al eliminar las mitocondrias dañadas, principal fuente de ROS¹⁹². Por otro lado, se ha sugerido que el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, al liberarse las catepsinas del lisosoma tras la permeabilización de este orgánulo por la acción de la CQ, podría ser responsable de la generación de ROS^{171,191}. El pequeño efecto de la CQ en la inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de ovario podría deberse a un sistema de reparación eficiente de DSBs.

En el caso del LBH, no se detectó un rápido aumento en la producción de ROS; sin embargo, tras 24 horas de tratamiento se observó un incremento significativo de los niveles de ROS en tres de las cuatro líneas celulares analizadas. Cuando las células se trataron con ambos compuestos, CQ y LBH, se detectó un aumento en la producción de ROS en las cuatro líneas celulares en comparación con las células sin tratar. Este incremento solamente fue superior al obtenido con LBH en la línea OVCAR-8¹⁸¹. Estos resultados coinciden con otros trabajos en líneas celulares de colon y de tumores

hematológicos, donde muestran que los HDACi inducen ROS^{186,208,209}. La generación de ROS explicaría el aumento en los focos de γ H2AX observado tras el tratamiento con LBH; sin embargo, el porcentaje de células con focos no se redujo significativamente en presencia del antioxidante NAC. Estos resultados sugieren que el LBH podría estar actuando sobre vías de reparación del DNA, como la recombinación homóloga, lo que impediría la correcta reparación de las lesiones en el DNA. De hecho, encontramos que el LBH reduce significativamente la eficiencia de reparación por HRR, y que esto se debe, al menos en parte, a un incorrecto reclutamiento de la recombinasa Rad51 a los sitios de daño, como muestran los ensayos de inmunofluorescencia. Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios donde emplearon otros inhibidores de histona deacetilasa^{159,167,168,197,198}. Otros autores también han descrito fallos en la señalización por ATM tras el tratamiento con estos inhibidores, lo que podría estudiarse también en líneas celulares de cáncer de ovario¹⁶⁹. Para confirmar la hipótesis de que la CQ producía DSBs y que el LBH inhibía su reparación, estudiamos el efecto de la combinación de CQ con un inhibidor de la vía HRR, mirin. Encontramos que este tratamiento combinado también ejercía un efecto sinérgico en tres de las cuatro líneas estudiadas, lo que confirma que la inhibición de la reparación por HR mejora la respuesta citotóxica del inductor de DSBs, la cloroquina. Además, observamos que el antioxidante NAC protegía frente a la muerte celular ocasionada por el tratamiento con CQ y LBH, lo que confirma que el efecto citotóxico de la combinación se debe, al menos en parte, a la generación de DSBs por estrés oxidativo¹⁸¹.

En distintos estudios se ha descrito que las células tumorales son más sensibles al daño en el DNA, al presentar una alta tasa proliferativa. Además, estas células pueden presentar defectos en los *checkpoints* de control de este daño. Estas alteraciones provocan una acumulación excesiva de daño en el DNA cuando se usan agentes quimioterápicos, como los platinos, lo que favorece la apoptosis²¹⁰. No obstante, la aparición de resistencias a este tipo de agentes terapéuticos es bastante frecuente. Generalmente, las células resistentes a platinos muestran unos niveles más elevados de reparación del DNA²¹¹. En base a estas observaciones y al efecto sinérgico observado tras el tratamiento con CQ y LBH/mirin, nos planteamos que el uso de un tratamiento combinado, entre un agente que dañe el DNA y un inhibidor de la respuesta a daño en el DNA, podría suponer una estrategia terapéutica en este tipo de tumor. Para evaluar esta hipótesis, seguimos dos estrategias y estudiamos, por una parte, la combinación de CQ con distintos inhibidores de la respuesta al daño en el DNA y, por otra parte, la combinación de cisplatino con LBH. Con ambas estrategias encontramos que el tratamiento combinado generaba un fuerte efecto sinérgico en líneas celulares de CO, especialmente en la combinación de cisplatino y LBH. Además, hemos descrito por primera vez que la CQ junto con inhibidores de ATM/ATR produce un efecto sinérgico en CO. La capacidad de los inhibidores de ATM y ATR de detener el crecimiento tumoral cuando se combinan con la radiación ionizante u otros agentes farmacológicos, que generan daño en el DNA, se había estudiado en múltiples tipos de tumores. Así, el inhibidor de ATM, KU-55933, ha mostrado reducir la proliferación e inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama o próstata^{212,213} y sensibilizar a células tumorales de distintos tipos de cáncer a agentes genotóxicos, como los platinos, la doxorubicina o la gemcitabina, y a la radiación ionizante²¹⁴⁻²¹⁸. Un efecto similar en inhibición de la proliferación, inducción de apoptosis y mejora de la sensibilidad a fármacos y radiación ionizante se ha descrito para el inhibidor de ATR, VE-821, en distintos tipos de líneas celulares tumorales^{215,216,218-223}. En cáncer de ovario, se estima que aparecen mutaciones en el gen que codifica la proteína ATM en el 2% de los casos, y estas mutaciones se asocian con resistencias al tratamiento con platinos¹⁰⁰.

En el caso de ATR, los tumores con altos niveles de esta quinasa se suelen asociar con un mal pronóstico²²⁴. Todo esto justifica el estudio de inhibidores de esta vía de señalización como estrategia terapéutica en este tipo de cáncer. Existen pocos estudios en CO con los inhibidores KU-55933 y VE-821, si bien, se ha mostrado que mejoran la respuesta citotóxica a platinos y radiación ionizante en líneas celulares, independientemente de la presencia o no de mutaciones en *BRCA1/2*^{218,225,226}. En nuestro estudio, el tratamiento combinado con CQ y los inhibidores de ATM/ATR generaba un efecto sinérgico en varias líneas celulares de ovario. En el caso del inhibidor de ATR, VE-821, observamos un fuerte efecto sinérgico en tres de las 4 líneas celulares y en el del inhibidor de ATM, KU-55933, el efecto sinérgico se observa en dos de las líneas en las condiciones estudiadas. Las diferencias en la respuesta podrían deberse al distinto fondo genético de las líneas celulares en estudio.

Los HDACi, como el LBH, han mostrado mejorar los efectos citotóxicos de distintos agentes quimioterápicos, como los platinos, en varias líneas celulares tumorales (neuroblastoma, ovario, pulmón o mama) y modelos *xenograft*²²⁷⁻²³³. Además, estos agentes alteran la reparación del DNA por HR, reduciendo la eficiencia de reparación por esta vía^{159,167,181,196}. En líneas celulares de cáncer de ovario, se ha descrito que la adición de LBH al tratamiento con cisplatino conseguía que las células tumorales resistentes al tratamiento con platinos recuperaran su sensibilidad a estos compuestos^{228,233}. La sensibilización de estas células podría deberse a un cambio en la expresión de distintos genes implicados en diversos procesos celulares, como la apoptosis, la respuesta inmune o la actividad hidrolasa o de los transportadores celulares²³³. En concreto, se ha descrito que el tratamiento combinado con cisplatino y LBH induce una reducción en los niveles de proteínas anti-apoptóticas, como la survivina, o un incremento en los niveles de proteínas pro-apoptóticas como p21 o APAF-1, lo que podría explicar la mayor apoptosis observada con el tratamiento combinado^{228,232,233}. En nuestro trabajo, se observó como el tratamiento combinado LBH/cisplatino aumentaba de una manera muy elevada la muerte celular por apoptosis comparado con los tratamientos en monoterapia, lo que se refleja en unos índices de combinación muy bajos, indicativos de un fuerte efecto sinérgico, lo que concuerda con los estudios previos mencionados^{228,232,233}. Este incremento en la citotoxicidad se observó en todas las líneas celulares de cáncer de ovario estudiadas, independientemente del subtipo histopatológico y de la sensibilidad inicial al cisplatino.

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que la inducción de daño en el DNA, junto con la inhibición de su reparación, resulta clave en la citotoxicidad de los diferentes tratamientos combinados estudiados en este trabajo. En el caso del tratamiento con CQ y LBH estos efectos explican, junto con la modulación de la autofagia, la fuerte sinergia observada tras el tratamiento con ambos fármacos¹⁸¹. El tratamiento combinado CQ/LBH ha mostrado reducir la formación de tumores en modelos *in vivo* de xenoinjertos de cáncer de mama con una baja toxicidad¹⁷³. Esto, sumado a los resultados que hemos obtenido en las líneas celulares de cáncer de ovario, indica que dicha combinación podría ser investigada en ensayos clínicos. La combinación Cisplatino/LBH también podría suponer una importante estrategia terapéutica para el tratamiento del CO, especialmente para tumores que presenten resistencias al tratamiento estándar con platinos, ya que ambos fármacos se encuentran aprobados para el tratamiento de distintos tipos de tumores en la práctica clínica.

2

Chloroquine-induced DNA damage synergizes with non-homologous end joining inhibition to cause ovarian cancer cell cytotoxicity

María Ovejero-Sánchez^{1,2,3}, Jorge Rubio-Heras², María del Carmen Vicente de la Peña², Laura San-Segundo^{1,3}, Jesús Pérez-Losada^{1,3}, Rogelio González-Sarmiento^{1,2,3*} and Ana Belén Herrero^{1,2,3*}

¹Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

²Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (IBMCC), University of Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

International Journal of Molecular Sciences: under review (25/05/2022)

CAPÍTULO 2: Efecto de la combinación de cloroquina con inhibidores de la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ)

Previamente se ha mostrado como la CQ es capaz de inhibir el proceso de autofagia en células tumorales de cáncer de ovario y también de inducir la producción de ROS, lo que ocasiona DSBs en el DNA¹⁸¹. Por otra parte, el LBH inhibe la reparación por HR, lo que explica la muerte celular en las células tratadas con la combinación de ambos fármacos. En algunos trabajos, se ha descrito que los HDACi podrían alterar la reparación por NHEJ, la otra vía principal de reparación de DSBs²³⁴⁻²³⁸. Se ha descrito que algunos HDACi podrían disminuir los niveles de expresión de algunas proteínas del proceso de reparación por NHEJ (Ku70, Ku80, DNA-PKs) en algunos tipos de líneas celulares tumorales; sin embargo, existen resultados contradictorios sobre si estos fármacos aumentan o disminuyen la frecuencia de NHEJ²³⁴⁻²³⁸. Por lo que en este apartado decidimos estudiar si el LBH afectaba a la eficiencia de reparación por NHEJ. Asimismo, decidimos estudiar si el daño en el DNA producido por la CQ era también reparado por NHEJ y si la combinación de cloroquina e inhibidores de la vía de reparación de NHEJ podría suponer una estrategia terapéutica en cáncer de ovario.

2.1. El Panobinostat no afecta a la eficiencia de reparación por NHEJ en líneas celulares de cáncer de ovario

Distintos HDACi, incluyendo el LBH, han mostrado alterar la reparación de DSBs al inhibir la reparación por HR^{159,167,181,196}. De hecho, como se ha descrito en este trabajo, el LBH inhibe el correcto reclutamiento de Rad51 a los lugares de rotura de doble cadena en líneas celulares de cáncer de ovario, lo que conduce a una inhibición de esta vía de reparación¹⁸¹. Sin embargo, el efecto de estos inhibidores en la reparación por NHEJ no está bien definido^{234,235}. Por todo ello, decidimos estudiar si el LBH afectaba a este tipo de reparación.

En primer lugar, se estudió la expresión de proteínas implicadas en la vía de reparación por NHEJ, Ku70 y Ku80, mediante western blot. La expresión de estas dos proteínas no se alteró con el tratamiento con LBH a distintos tiempos (24, 48 y 72 horas) en la línea celular SK-OV-3, por lo que decidimos estudiar los niveles de estas proteínas en las cuatro líneas celulares de ovario tras 24 horas de tratamiento con LBH. Los resultados se muestran en la **Figura 33**, donde se puede observar cómo los niveles de Ku70 y Ku80 fueron similares en las células tratadas o no con LBH. Después, se estudió si el LBH afectaba a la eficiencia de reparación por NHEJ, empleando dos estrategias: un ensayo extracromosómico empleando el plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 y la generación de líneas celulares estables con un *cassette* reportero para determinar la eficiencia de NHEJ (**Figura 12**, sección materiales y métodos).

En el caso del ensayo extracromosómico, la eficiencia de reparación se determina por la capacidad de las células de recircularizar el plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 digerido con las enzimas *I-SceI* o *HindIII*, lo que hace que las células expresen la proteína verde fluorescente. Para llevar a cabo este análisis, las líneas celulares IGROV-1 y SK-OV-3 se pretrataron o no con LBH o NU-7026, un inhibidor conocido de NHEJ, durante 24 horas. Posteriormente, estas células se transfectaron con 0,5 µg del plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 linealizado por las enzimas *HindIII* o *I-SceI* o bien con el plásmido circular pEGFP-Pem1. En ambos casos se cotransfectaron con 0,5 µg del plásmido

psDsRedN1, el cual permite normalizar por la eficiencia de transfección. Posteriormente, se volvieron a incubar otras 72 horas con LBH o NU-7026. El análisis por citometría del número de células verdes y rojas nos mostró que el LBH no alteraba la reparación por NHEJ (**Figura 33**). Sin embargo, el tratamiento con NU-7026 disminuía la eficiencia de NHEJ, como cabría esperar. Para confirmar este resultado, se construyeron dos líneas celulares de cáncer de ovario (IGROV-1 y SK-OV-3) que portan un *cassette* reportero GFP-NHEJ integrado en su genoma (IGROV-1-NHEJ, SK-OV-3-NHEJ). Estas células también se pretrataron con LBH o NU-7026 durante 24 horas, tras lo cual fueron cotransfectadas con un plásmido que expresa la endonucleasa *I-SceI* y el plásmido psDsRedN1. Después las células se incubaron de nuevo con LBH o NU-7026 otras 72 horas. La reparación por NHEJ de la rotura de doble cadena generada por la endonucleasa hace que las células expresen EGFP, lo que se puede detectar por citometría de flujo. Empleando este sistema, encontramos que, aunque el tratamiento con LBH fue efectivo (disminuyó en un 50% el número de células vivas), no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de reparación de las células tratadas o no con LBH. Este resultado confirma que este compuesto no altera la reparación mediante NHEJ en líneas celulares de ovario estudiadas (**Figura 33**).

2.2. La cloroquina genera DSBs que son reparadas por la vía de reparación por unión de extremos no homólogos en líneas celulares de cáncer de ovario

Como se mostró previamente, la CQ induce la producción de ROS en líneas celulares de cáncer de ovario, lo que conduce a la generación de roturas de doble cadena en el DNA¹⁸¹. Este tipo de lesiones pueden ser reparadas por dos vías de reparación principales: HRR y NHEJ. La reparación por NHEJ ocurre con mayor frecuencia y es más rápida que la HR¹⁵⁷. Teniendo en cuenta esto, se decidió estudiar si las DSBs producidas por la CQ se reparaban mediante NHEJ. Para ello, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en el que se monitorizó las DSBs mediante el marcaje de la fosforilación de la histona H₂AX. Así pues, las células de cáncer de ovario se trataron con CQ durante 24 horas, tras lo cual se retiró el fármaco mediante lavados, y a continuación se incubaron en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de la reparación por NHEJ. Los inhibidores de la vía de reparación por NHEJ seleccionados fueron: KU-57788 (KU) y NU-7026 (NU), inhibidores de DNA-PKs, y SCR7 pirazina (SCR7), inhibidor de la DNA ligasa IV. Tras 48 horas en presencia o ausencia de estos tres inhibidores, se analizó por inmunofluorescencia el daño en el DNA. Como se puede observar en la **Figura 34**, la CQ fue capaz de generar focos de γ H₂AX tras 24 horas de tratamiento que desaparecían 48 horas después de eliminar el compuesto, lo que se debe a una correcta reparación. Sin embargo, el daño persistía cuando se añadieron los inhibidores de NHEJ. Además, observamos que el porcentaje de células con focos de γ H₂AX en las muestras CQ+NHEJi era muy superior al encontrado cuando las células se trataron solamente con estos inhibidores. Estos resultados demuestran que, al menos una parte del daño producido por la CQ es reparado mediante NHEJ.

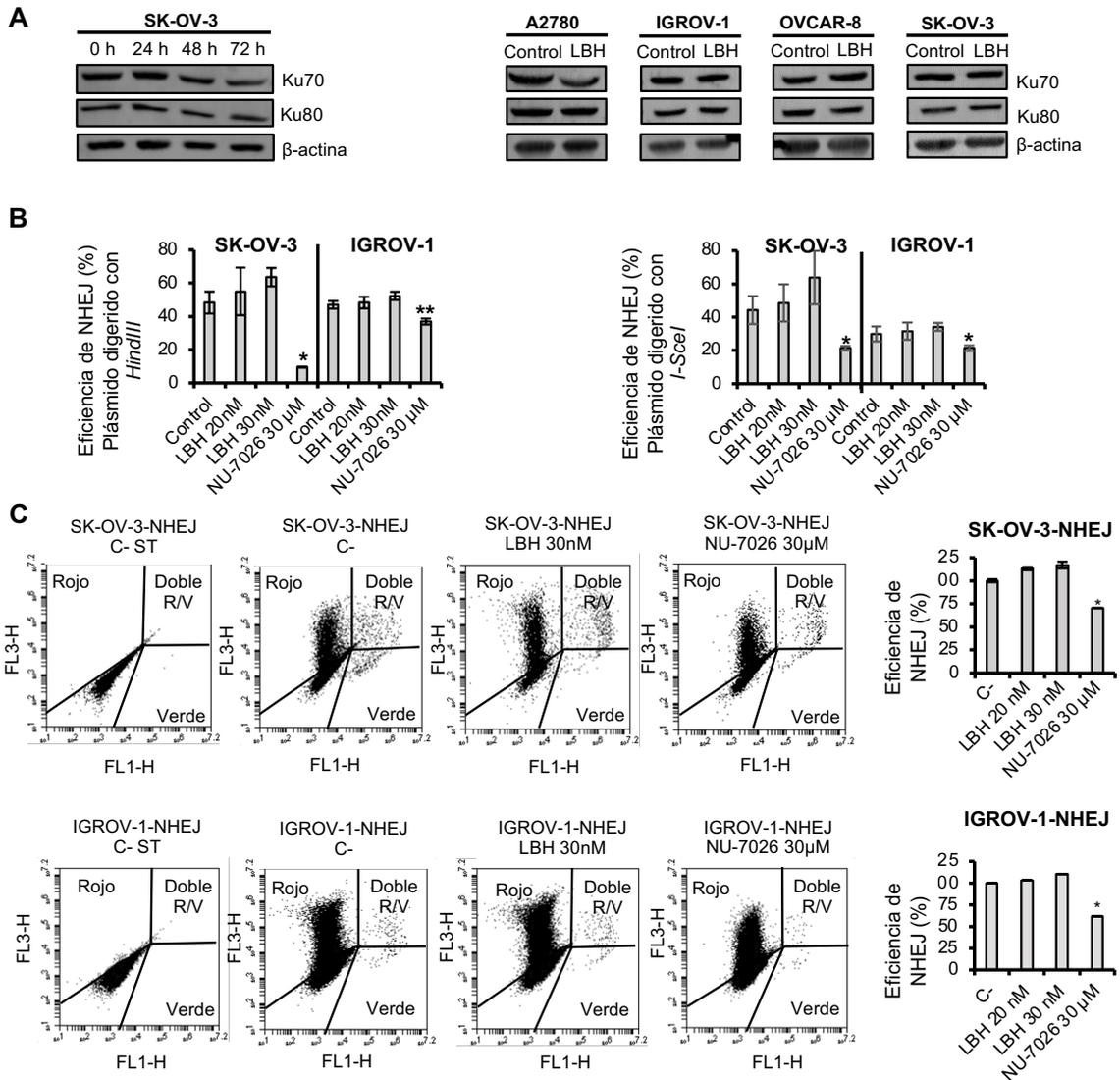


Figura 33. (A) Panel izquierdo: niveles de las proteínas Ku70 y Ku80 después del tratamiento con 50 nM de LBH durante 24, 48 o 72 horas. Panel derecho: niveles de expresión de Ku70 y Ku80 tras 24 h de tratamiento con LBH (20 nM). Los niveles de β -actina se emplearon como control de carga. (B) Porcentaje de NHEJ empleando el plásmido digerido con las enzimas *HindIII* o *I-SceI* en las líneas IGROV-1 y SK-OV-3. Las células se pretrataron o no con las dosis de LBH o NU-7026 indicadas, se transfectaron con el plásmido pEGFP-Pem1-Ad2 linealizado o el plásmido circular pEGFP-Pem1 junto con el plásmido rojo pDsRedN1 y se volvieron a tratar con las mismas dosis de LBH o NU-7026 durante 72 horas. El porcentaje se calculó tal y como se indica en material y métodos. (C) *Dot plots* de las células sin transfectar con el *cassette* integrado (SK-OV-3-NHEJ, IGROV-1-NHEJ) y transfectadas con 5 μ g de un plásmido que codifica para la endonucleasa *I-SceI* y 0,5 μ g de pDsRedN1 tras el pretratamiento de 24h con LBH o NU-7026. Estas últimas se incubaron en la presencia o ausencia de LBH o NU-7026 72 horas después de la transfección. La eficiencia de NHEJ se calculó como la proporción de células verdes entre células rojas. Los datos mostrados corresponden a la media del análisis de al menos tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

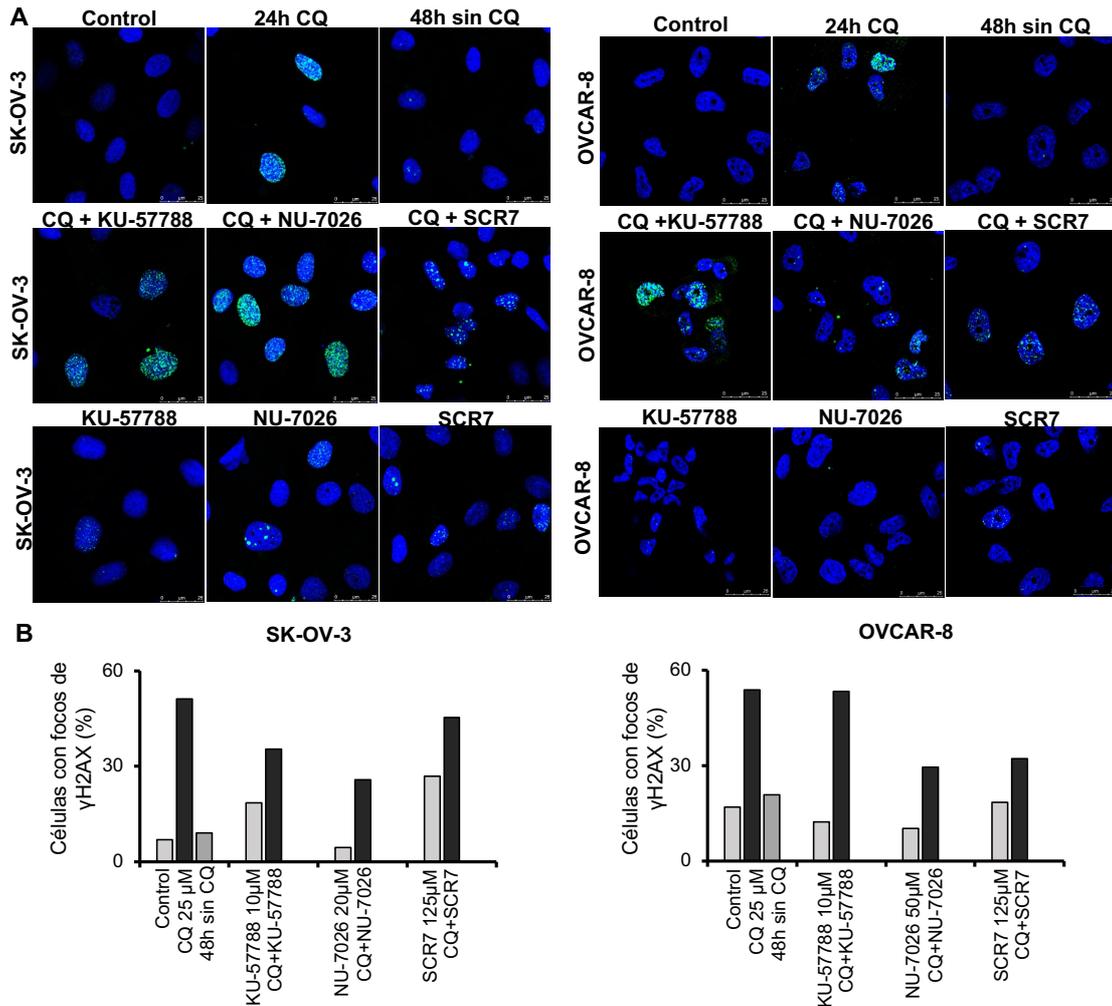


Figura 34. El daño en el DNA generado por la CQ se repara por NHEJ. Las líneas celulares SK-OV-3 y OVCAR-8 se trataron durante 24h con 25 μM de CQ. El tratamiento se eliminó y las células se trataron o no con inhibidores de NHEJ durante 48h. Además, se trataron solo con estos inhibidores. (A) Focos de γH2AX (verde) detectados mediante microscopía confocal. (B) Porcentaje de células con γH2AX (>5 focos/célula). Los datos representados corresponden a la media de al menos 50 células por línea y condición.

2.3. Los inhibidores de reparación por NHEJ inhiben la proliferación e inducen apoptosis en las líneas celulares de cáncer de ovario

Para determinar el efecto de los inhibidores de NHEJ en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario se llevaron a cabo ensayos MTT usando diferentes dosis y tiempos de incubación. Como se muestra en la **Figura 35** los tres inhibidores provocaron una inhibición de la proliferación dependiente de dosis y tiempo. No obstante, los inhibidores KU-57788 y NU-7026 mostraron una mayor potencia a la hora de reducir la proliferación celular, observándose una inhibición rápida del crecimiento tras 24 horas de iniciar el tratamiento. De hecho, los valores de IC50 a 72 horas de estos inhibidores se encuentran entre 0,96 μM y 11,07 μM, mientras que para el inhibidor SCR7 pirazina variaron entre 204,5 μM y 329,8 μM.

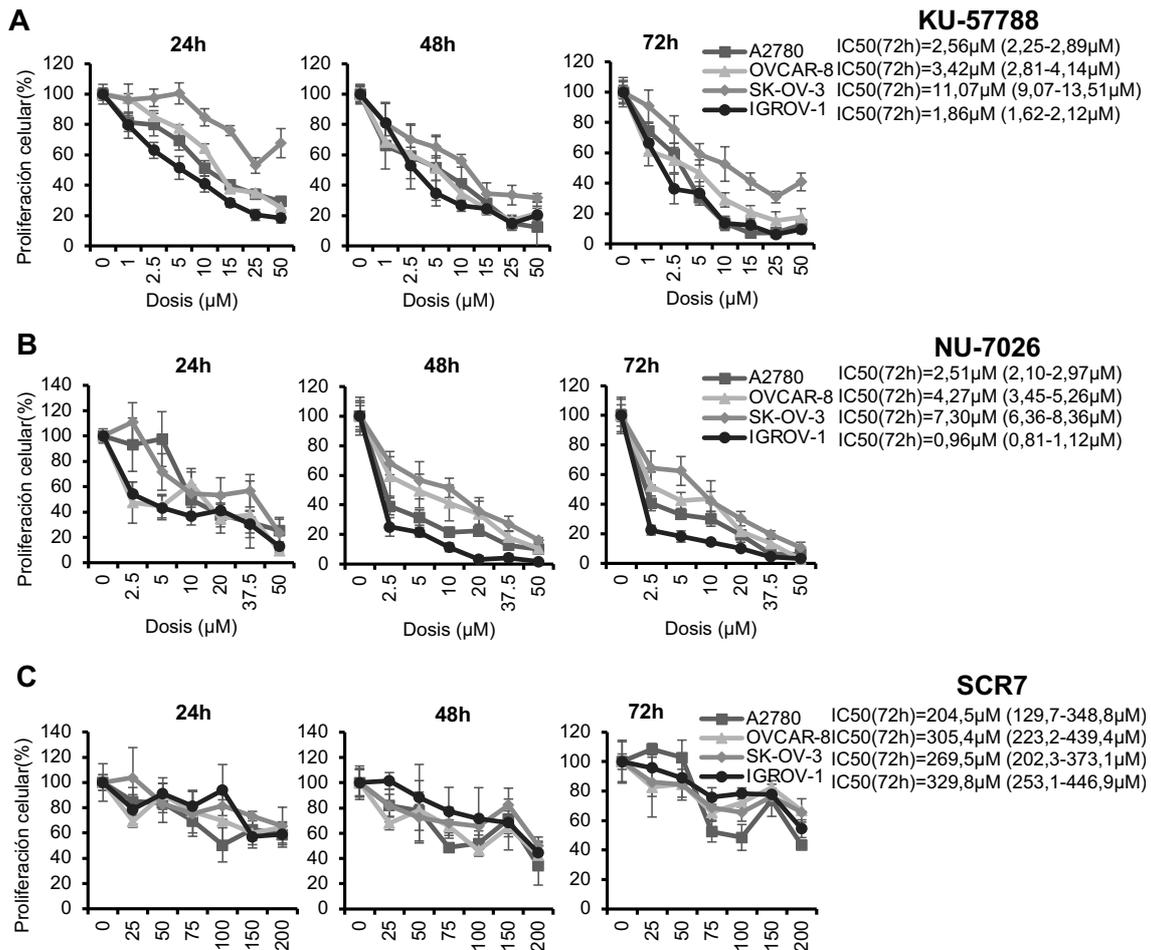


Figura 35. Efecto de los inhibidores de NHEJ en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de (A) KU-57788, (B) NU-7026 y (C) SCR7 pirazina indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

A continuación, se llevó a cabo un estudio de ciclo celular para caracterizar la actividad antiproliferativa de estos compuestos (**Figuras 36, 37 y 38**). Cuando las células se trataron con KU-57788, se observó una acumulación en la fase G0/G1 en comparación con las células no tratadas. Este mismo efecto en el ciclo celular había sido descrito anteriormente en otros estudios^{214,239-241}. También detectamos parada en G0/G1 en las líneas A2780 e IGROV-1 tratadas con el inhibidor NU-7026; sin embargo, este efecto no se observó en las otras dos líneas, OVCAR-8 y SK-OV-3, en las condiciones estudiadas. La población sub-G0, correspondiente a las células muertas, también se analizó tras los distintos tratamientos. El tratamiento con los inhibidores KU-57788 y NU-7026 incrementó significativamente el porcentaje de células en sub-G0, lo que indica que estos inhibidores no solo reducen la proliferación celular, sino que también tienen un efecto citotóxico. Por último, el tratamiento con SCR7 pirazina apenas alteró el perfil de ciclo celular en las líneas celulares empleadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el estudio de ciclo celular, se llevó a cabo un ensayo de apoptosis para determinar si el efecto citotóxico de los compuestos se debía a la inducción de este proceso de muerte celular programada. Como se muestra en la **Figura 39**, los compuestos KU-57788 y NU-7026 indujeron apoptosis de manera dependiente de dosis en todas las líneas celulares de ovario. Sin embargo, el inhibidor KU-57788 indujo apoptosis a dosis inferiores que el NU-7026.

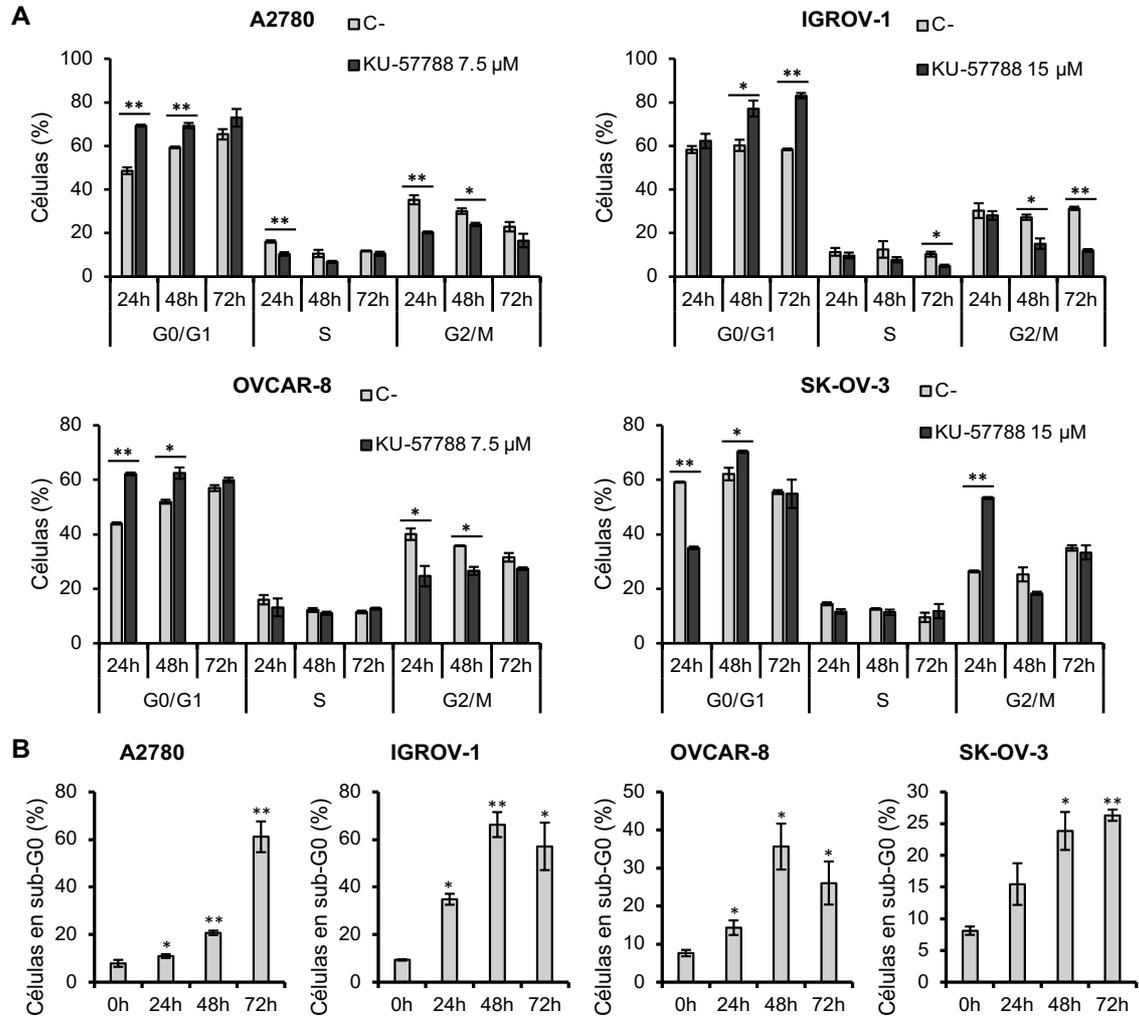


Figura 36. Efecto del inhibidor KU-57788 en el ciclo celular. (A) Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de KU-57788 (B) Porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con KU-57788. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

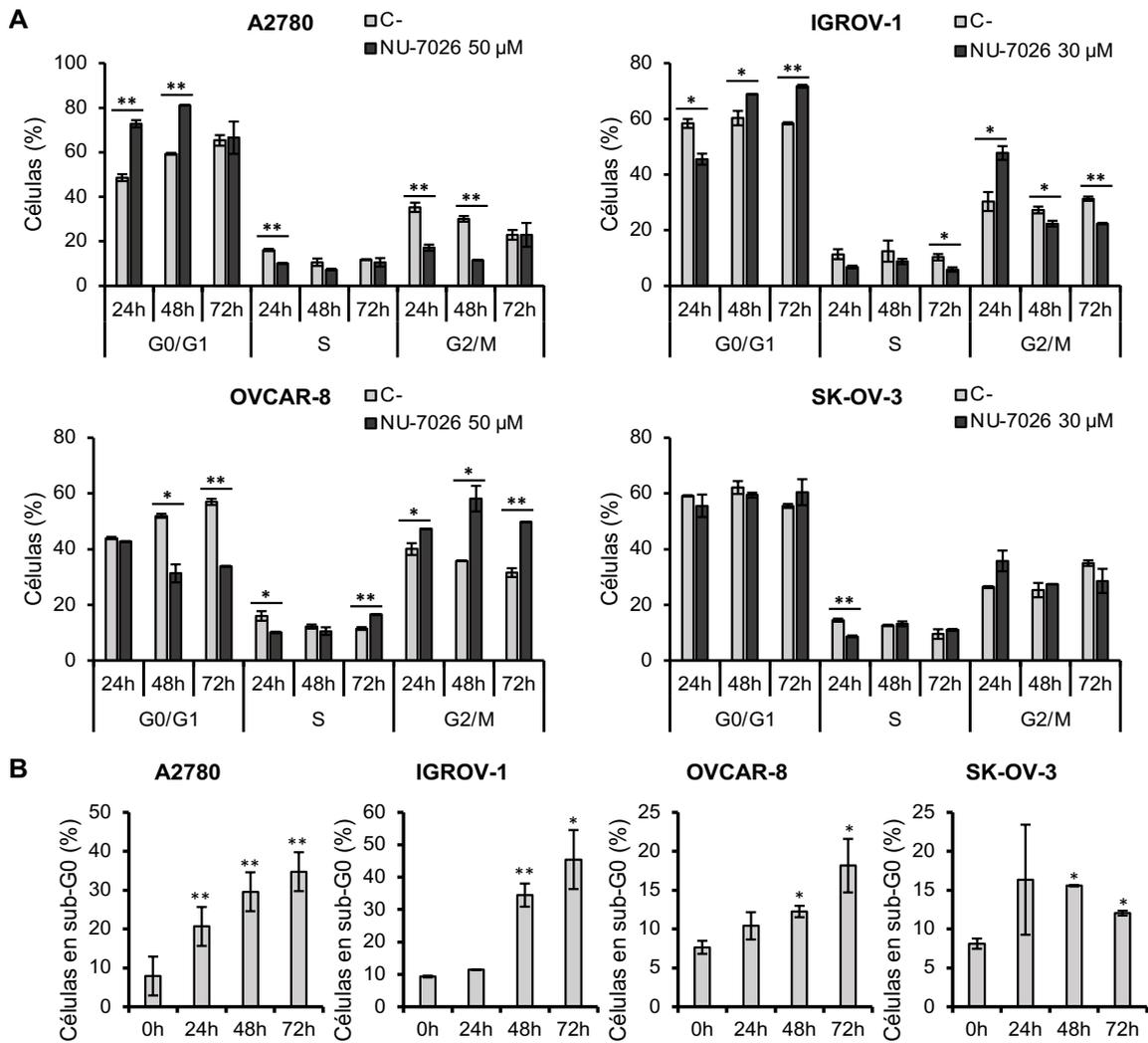


Figura 37. Efecto del inhibidor NU-7026 en el ciclo celular. (A) porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de NU-7026. (B) Porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con NU-7026. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

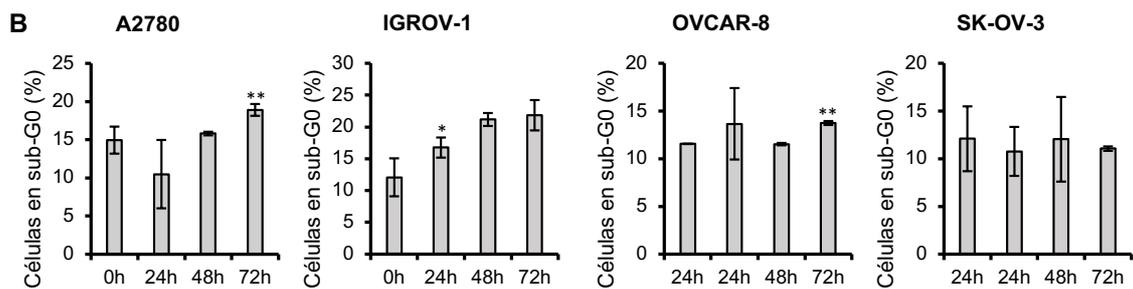
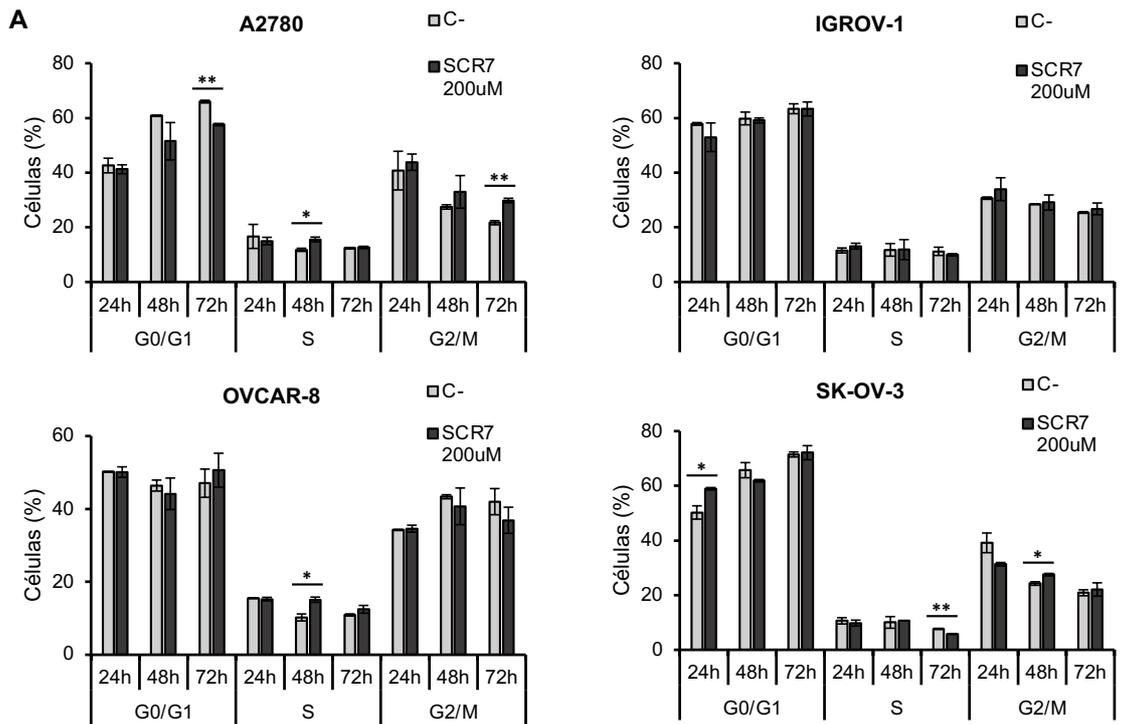


Figura 38. Efecto del inhibidor SCR7 pirazina en el ciclo celular. (A) Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas en presencia o ausencia (C-) de SCR7. (B) Porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con SCR7 pirazina. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

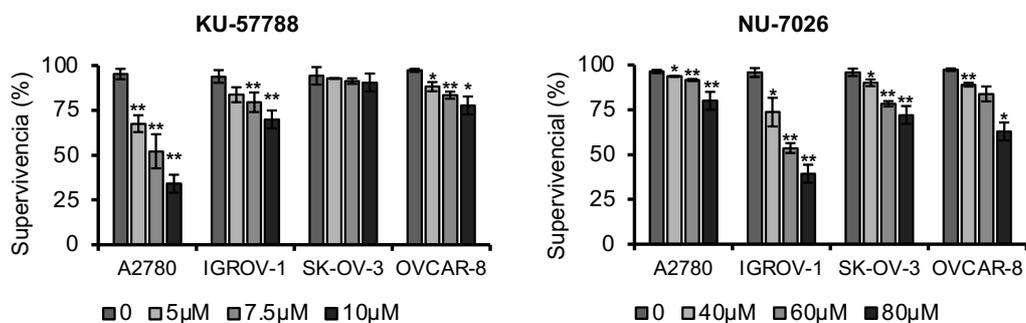


Figura 39. Efecto de los inhibidores de NHEJ en la supervivencia celular. Porcentaje de células vivas tras el tratamiento con KU-57788 (5, 7,5 y 10 μM) y con NU-7026 (40, 60 y 80 μM). Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; *p < 0,05).

2.4. La combinación de cloroquina e inhibidores de NHEJ induce muerte celular de manera sinérgica en líneas celulares de cáncer de ovario

Una vez determinado que la CQ produce daño en el DNA, que requiere de la vía de reparación de NHEJ para ser reparado, analizamos si la respuesta citotóxica de la CQ se podía incrementar con el uso de los tres inhibidores de NHEJ. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de apoptosis empleando varias dosis de los distintos compuestos (KU-57788, NU-7026 y SCR7 pirazina) y manteniendo los ratios entre las dosis constantes. Como se muestra en las **Figuras 40, 41 y 42**, el porcentaje de células vivas fue mucho menor cuando se empleó la CQ con cualquiera de los tres inhibidores que cuando se usó de manera individual, especialmente en las combinaciones de CQ-KU-57788 y CQ-NU-7026. Para determinar el tipo de interacción entre estos compuestos, se calculó el índice de combinación para cada uno de los casos usando el software Compusyn. En todos los casos se obtuvieron índices de combinación inferiores a 1, lo que indica que la CQ y los inhibidores de NHEJ presentan una interacción sinérgica.

2.5. La citotoxicidad producida por la combinación de cloroquina e inhibidores de NHEJ depende de la producción de especies reactivas de oxígeno

Como se ha descrito previamente, la CQ produce DSBs en el DNA e induce junto con el LBH, un efecto sinérgico en las líneas celulares de cáncer de ovario. La citotoxicidad provocada por la combinación de CQ y LBH dependía de la producción de ROS, ya que la adición de un antioxidante, NAC, protegía frente a la muerte celular causada por estos dos compuestos. Así pues, se decidió estudiar si la producción de estas especies reactivas era también relevante en el efecto citotóxico observado con los tratamientos combinados entre la CQ y los inhibidores de NHEJ. Para ello, se realizó un ensayo de apoptosis en el que se comparó la supervivencia celular con los distintos tratamientos con o sin la adición del antioxidante. La adición de NAC redujo la muerte celular generada tanto con la combinación CQ/KU-57788 como con CQ/NU-7026 (**Figura 43**). Estos resultados indican que la producción de ROS es determinante en la citotoxicidad generada con estos tratamientos.

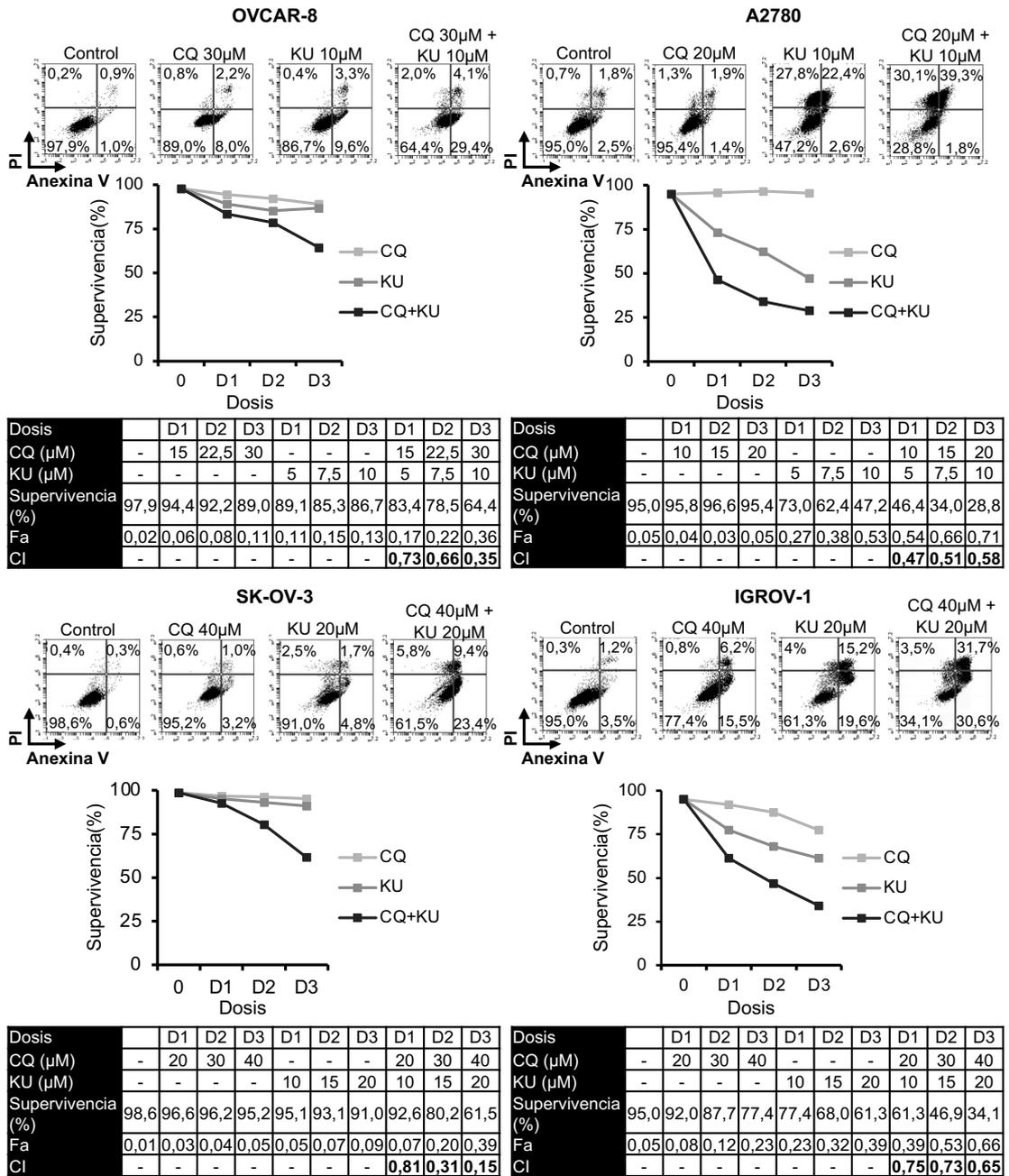


Figura 40. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y KU-57788. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y KU-57788 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

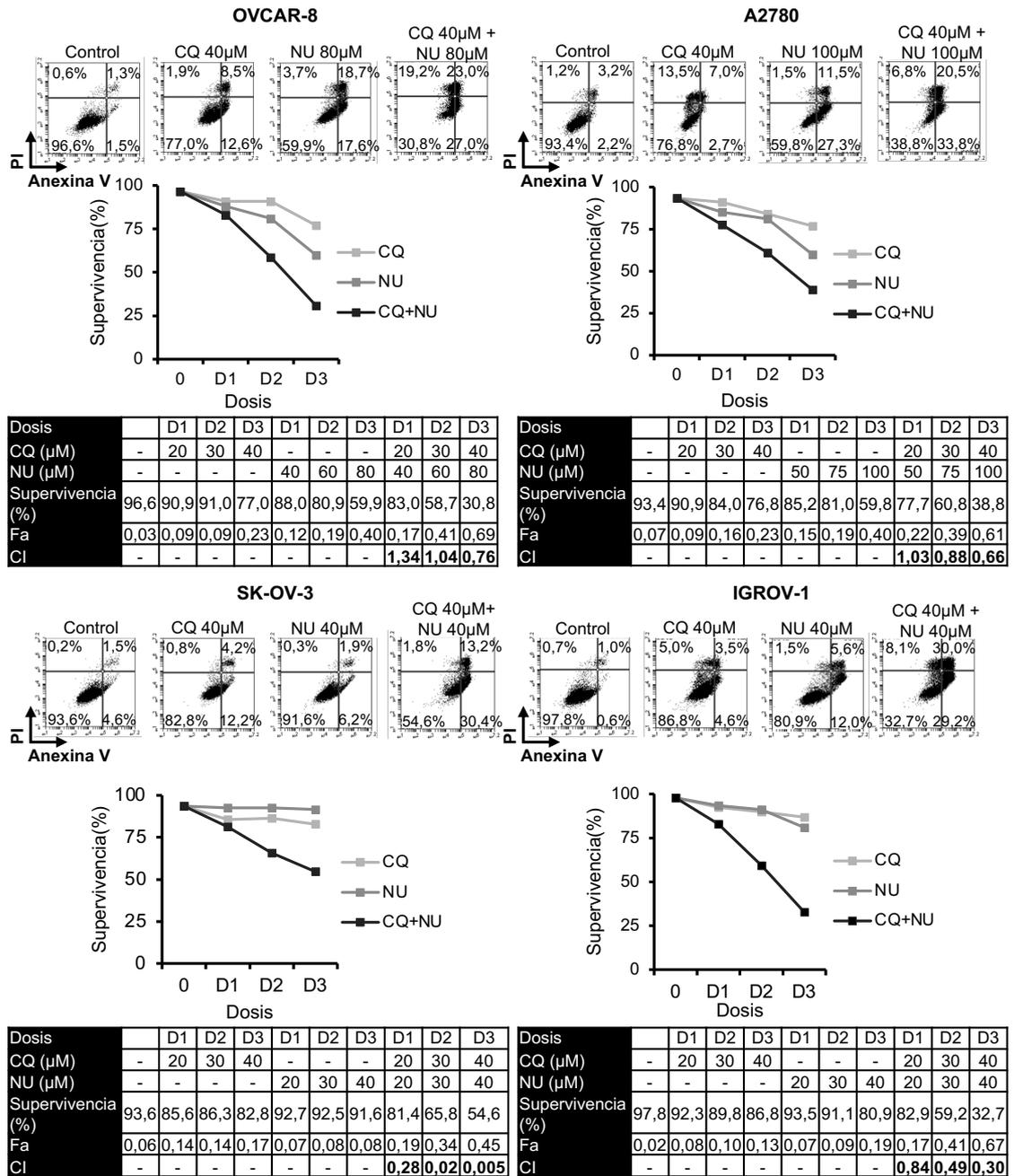


Figura 41. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y NU-7026. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y NU-7026 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

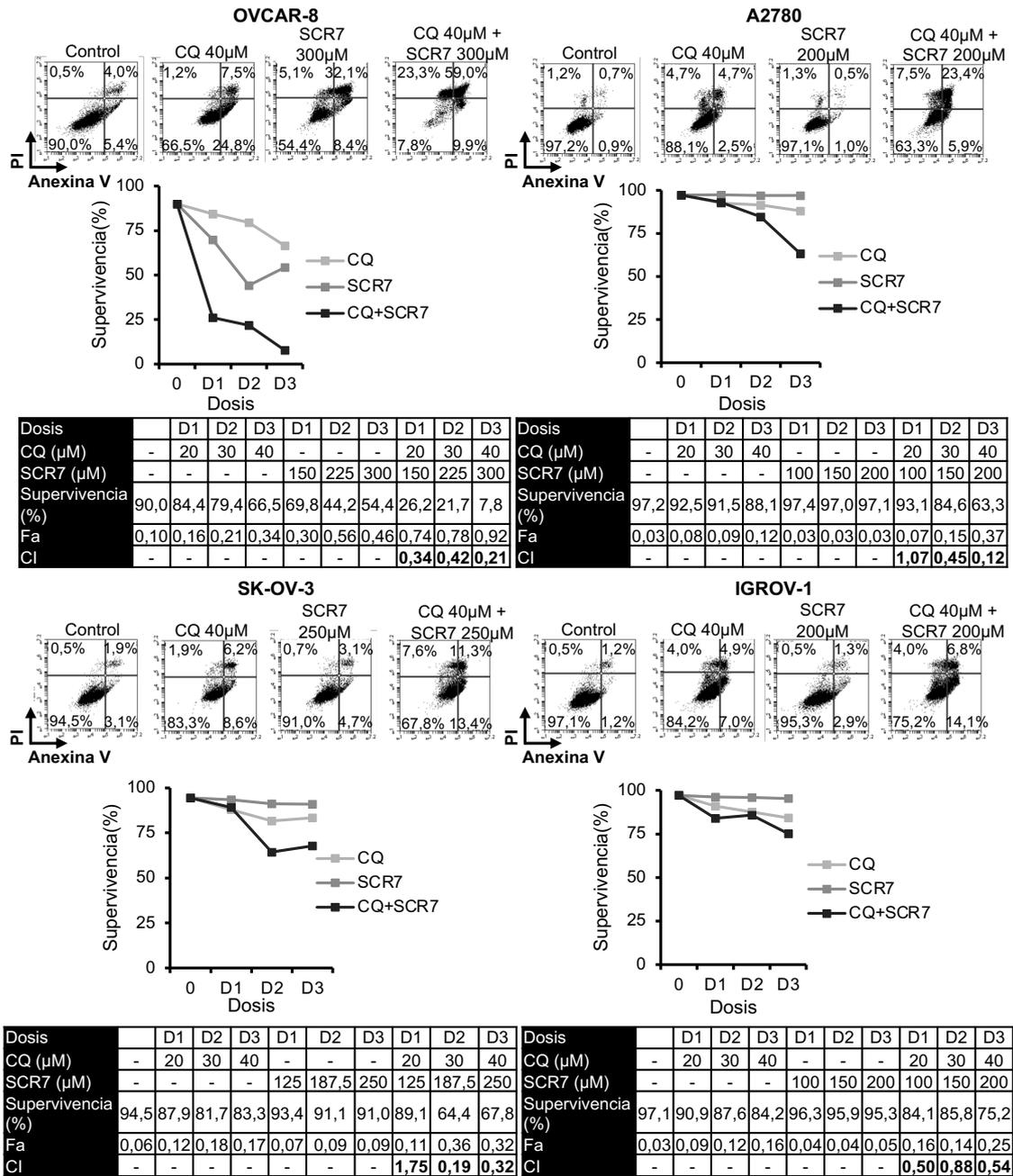


Figura 42. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con cloroquina y SCR7 pirazina. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ y SCR7 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

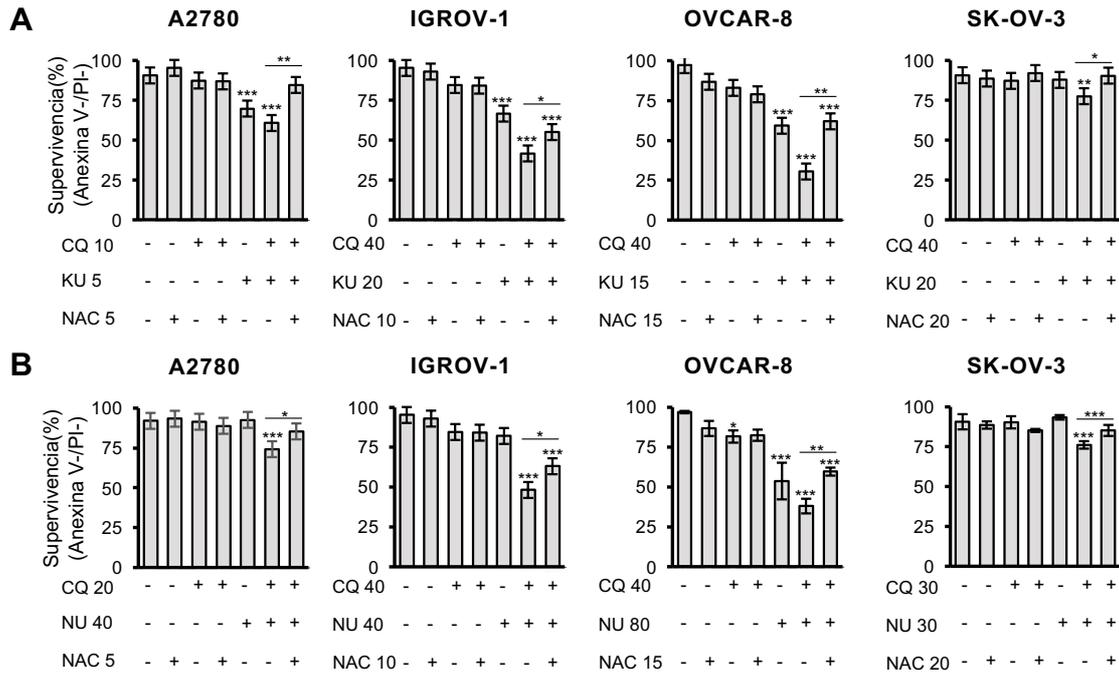


Figura 43. La citotoxicidad del tratamiento con CQ/NHEJi depende de la producción de ROS. (A) Las células fueron tratadas durante 72 horas con las concentraciones indicadas de CQ (μM), KU-57788 (μM) o (B) NU-7026 y el antioxidante NAC (mM) y el porcentaje de células apoptóticas se midió marcando con anexina V y yoduro de propidio por citometría de flujo. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

2.6. La combinación de cloroquina, Panobinostat e inhibidores de NHEJ induce una mayor muerte celular que las dobles combinaciones

Teniendo en cuenta que tanto la doble combinación de CQ y LBH como la combinación de CQ e inhibidores de NHEJ ejercen un efecto sinérgico en la supervivencia de las líneas celulares de cáncer de ovario y que el LBH inhibe la reparación por HR, pero no afecta a la eficiencia de reparación de DSBs por NHEJ, nos planteamos estudiar si la triple combinación podría incrementar la muerte celular de las líneas celulares de ovario. Para ello, las líneas celulares más resistentes a la combinación de CQ y LBH (A2780, IGROV-1 y SK-OV-3) se trataron con CQ, LBH y NU-7026/KU-57788 manteniendo los ratios entre las dosis constantes. Pasadas 72 horas de tratamiento, el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 44**, la triple combinación de CQ-LBH-NHEJi generó un fuerte efecto sinérgico que fue superior al obtenido en las dobles combinaciones, especialmente cuando se empleó el inhibidor NU-7026, con la excepción de la línea SK-OV-3, donde no se observó un mayor efecto en la combinación con CQ-LBH-KU-57788 respecto a las dobles combinaciones.

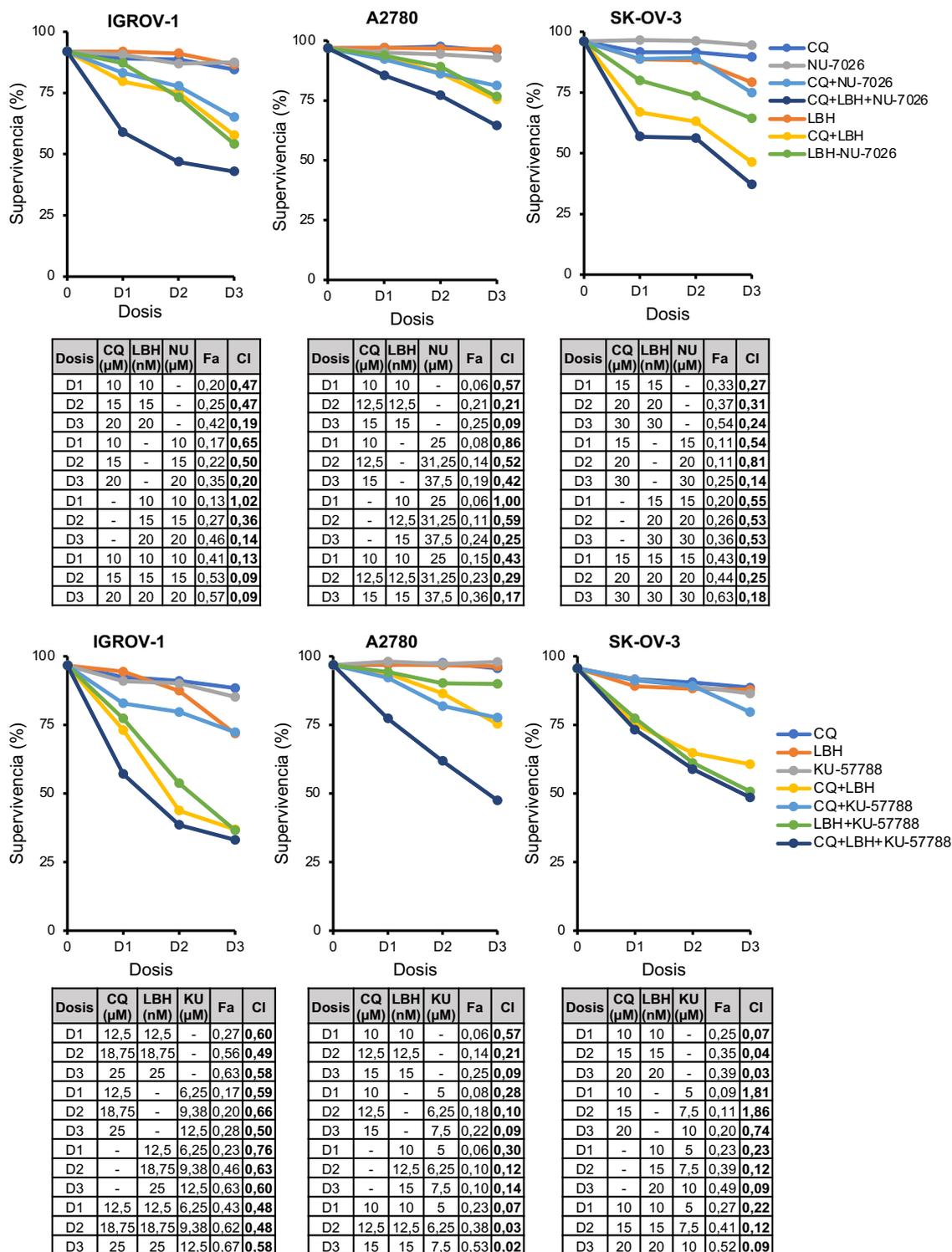


Figura 44. La triple combinación CQ-LBH-NHEJi ejerce un efecto sinérgico más potente que las combinaciones dobles. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de CQ, LBH y KU-57788/NU-7026 y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

2.7. La combinación de cloroquina y KU-57788 no reduce significativamente el crecimiento de tumores de cáncer de ovario en un modelo *xenograft*

Por último, teniendo en cuenta el efecto sinérgico observado en el tratamiento con la CQ y los inhibidores de NHEJ, se decidió estudiar el efecto de la combinación de CQ con el inhibidor KU-57788 en un modelo *xenograft* en ratones inmunodeprimidos. Se escogió el compuesto KU-57788 ya que era el que mayor potencia citotóxica mostraba en los estudios *in vitro*.

Para llevar a cabo este estudio, se generaron tres líneas celulares que expresaban la luciferasa (A2780-Luc, OVCAR-8-Luc y SK-OV-3-Luc) mediante el uso de vectores lentivirales. Una vez generadas estas líneas, se comprobó que expresaban la luciferasa. Como se puede observar en la **Figura 45**, tras la adición de luciferina, estas líneas celulares aumentaron su emisión de bioluminiscencia mientras que en las células *wild type* no se observó este incremento. El uso de líneas celulares luminiscentes resulta muy útil en los estudios *in vivo*, ya que se puede estimar el tamaño del tumor y observar su localización.

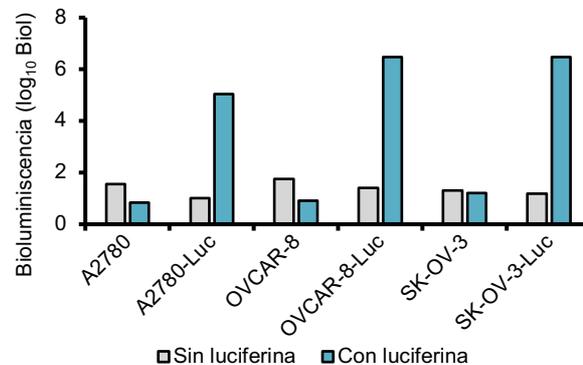


Figura 45. Bioluminiscencia de las líneas celulares con/sin luciferasa en presencia de luciferina. Se midió la bioluminiscencia de las líneas celulares indicadas en ausencia de luciferina (gris), una vez medida se añadió luciferina y se volvió a medir (azul). Los valores de bioluminiscencia se muestran en escala logarítmica.

Una vez generadas las líneas celulares Luc, se procedió a la generación del modelo *xenograft* de cáncer de ovario. Para ello, se inyectaron de manera subcutánea $3 \cdot 10^6$ células de la línea celular A2780-Luc en el flanco derecho de ratones inmunodeprimidos. La línea celular A2780-Luc fue seleccionada por su alto índice proliferativo y su buena respuesta a los compuestos en estudio. Tras dos semanas en las que se controló si se generaban tumores y el tamaño de los mismos, se procedió a la randomización de los ratones en 4 grupos y al tratamiento de éstos con CQ, KU-57788 o la combinación de ambos, manteniendo un grupo que se trató con el solvente en el que están disueltos los fármacos como control. En el momento de inicio de tratamiento, el tamaño medio de los tumores en los 4 grupos era de unos 70 mm^3 y se realizó una medida de la bioluminiscencia inicial de los tumores. A lo largo de los 15 días de tratamiento se controló cada dos días el tamaño del tumor y el peso de los animales y a los 9 días de tratamiento se volvió a controlar la bioluminiscencia de los tumores (**Figura 46**). En la **Figura 46**, se observa la bioluminiscencia emitida por los tumores de los ratones de los distintos grupos al principio y a los 9 días de tratamiento. Como se aprecia en la imagen, tras 9 días los tumores aumentaron su tamaño en todos los ratones y no se observó ninguna metástasis, manteniéndose las células tumorales en el flanco derecho. En la **Figura 47** se muestra la evolución en el tamaño del tumor y el peso de los tumores al final del tratamiento. Como se observa en esta figura, los tumores de

todos los grupos presentaron un rápido crecimiento, si bien se detectó una leve reducción en el ritmo de crecimiento en el grupo tratado con el tratamiento de CQ-KU-57788, aunque no llegó a ser significativa. La gráfica de crecimiento se tuvo que interrumpir a los 10 días del tratamiento en todos los grupos, excepto en el correspondiente al tratamiento combinado, ya que hubo que sacrificar algún ratón en estos 3 grupos (control, CQ y KU) por criterio de punto final (tamaño >1500 mm³). Estos resultados sugieren que los fármacos no están llegando a la concentración adecuada a los tumores como para producir el efecto citotóxico observado *in vitro*. Es posible por tanto que hubiera que aumentar las dosis y el régimen de tratamiento para encontrar un efecto sinérgico *in vivo*. En cuanto al peso de los tumores, se puede observar en la **Figura 47** como la mayor parte de los tumores tenían un peso de alrededor de 2 gramos al final del tratamiento.

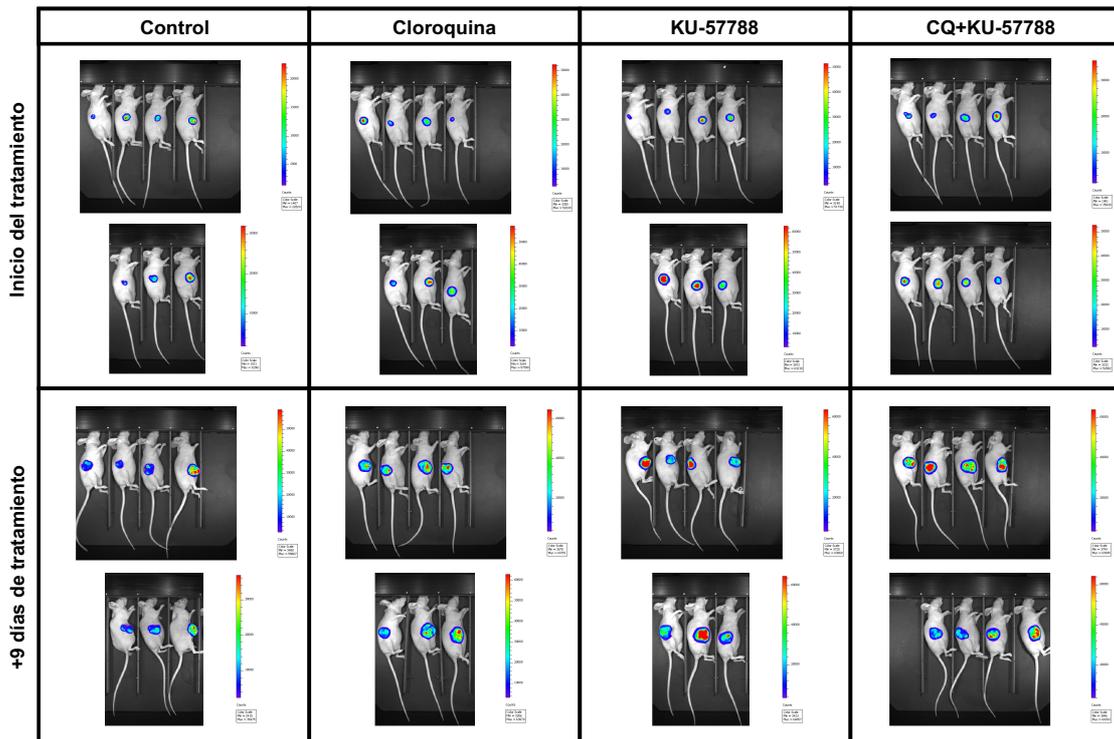


Figura 47. Bioluminiscencia de los tumores del modelo *xenograft* de cáncer de ovario. En el panel superior se muestran imágenes representativas de los cuatro grupos de ratones de estudio al inicio del tratamiento mientras que en el panel inferior se muestran imágenes representativas tras 9 días de tratamiento. Para ambos casos, se inyectó luciferina en los animales por vía intraperitoneal y tras 10 minutos, previa anestesia de los animales, se obtuvo la imagen en el equipo de bioluminiscencia Xenogen IVIS® Spectrum In Vivo Imaging System.

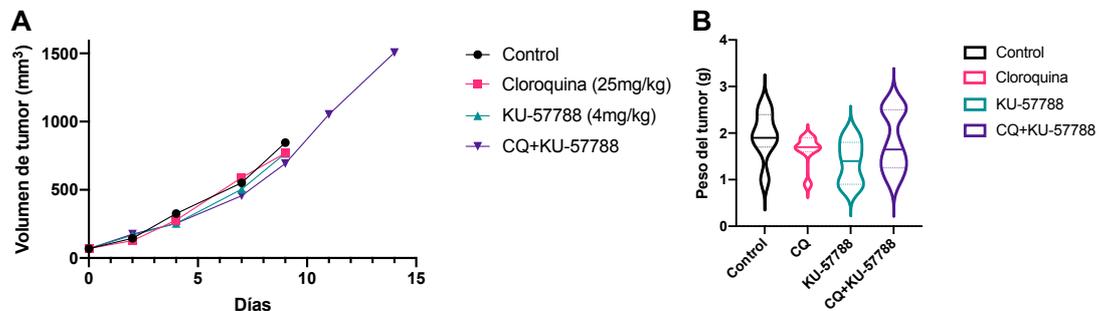


Figura 46. Evolución del tamaño tumoral a lo largo del tratamiento y peso final de los tumores. (A) Tamaño medio de los tumores a los distintos días de tratamiento. (B) *Violin plot* en el que se muestra la distribución del peso de los tumores al final del tratamiento, en el que aparece marcada la mediana de cada grupo y los cuartiles.

DISCUSIÓN

La CQ podría representar un claro ejemplo de lo que se conoce como *drug repurposing*, ya que varios trabajos y ensayos clínicos han demostrado el beneficio de combinar este compuesto con diferentes agentes quimioterápicos para el tratamiento del cáncer^{154,171–176,242–248}. En este trabajo, describimos por primera vez un efecto citotóxico sinérgico entre la CQ y distintos inhibidores de NHEJ en líneas celulares de cáncer de ovario. Hemos mostrado cómo la CQ genera roturas de doble cadena en el DNA que son reparadas mediante NHEJ, y cómo el bloqueo de esta vía de reparación con distintos inhibidores de NHEJ, genera un fuerte efecto sinérgico que podría emplearse como estrategia terapéutica.

La CQ es una base débil que bloquea el proceso de autofagia incrementando el pH lisosomal y alterando la fusión de los lisosomas a los autofagosomas^{178,247}. La inhibición de la autofagia podría explicar el efecto sinérgico que se encuentra cuando se emplea la CQ con distintos tratamientos radioterápicos y quimioterápicos. Sin embargo, como se ha comentado previamente, distintos trabajos han mostrado que otros mecanismos distintos al bloqueo de la autofagia explicarían el efecto antitumoral de este compuesto^{179,180,204,249–251}. Por ejemplo, la CQ podría reducir de una manera importante la degradación de los fármacos antitumorales en los lisosomas al aumentar el pH de estos orgánulos²⁵⁰. También podría actuar como un tampón en el microambiente tumoral permitiendo que fármacos básicos entren en las células cancerosas²⁵². Asimismo, este fármaco parece afectar a la respuesta inflamatoria y reducir la hipoxia y la capacidad de invasión y metástasis de las células tumorales²⁴⁹. La reducción de la metástasis parece debida a la eliminación de las células madre tumorales mediante un mecanismo epigenético que altera la metilación del DNA²⁵¹. Existen múltiples estudios, incluido el nuestro, que han descrito la CQ incrementa el estrés oxidativo en líneas celulares tumorales^{171,172,181,187,188,191,193,206,207}. Esta generación se puede asociar a una inhibición de la autofagia, que impediría la eliminación de mitocondrias dañadas, las cuales son la mayor fuente de ROS¹⁹² o a que este fármaco genere un daño en las crestas mitocondriales, lo que conduciría a una despolarización de la membrana mitocondrial, una disminución de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa y una acumulación de superóxido²⁵³. El incremento en el estrés oxidativo generado por la CQ podría resultar más tóxico para las células tumorales, ya que estas células muestran un mayor nivel de estrés oxidativo endógeno^{253,254}. Sin embargo, las células cancerosas suelen presentar niveles de reparación del DNA similares a las células normales o incluso incrementados, lo que las protegería de la acumulación de daño²⁵⁵. De hecho, en este trabajo se ha mostrado cómo el LBH genera un efecto citotóxico sinérgico con la CQ en líneas celulares de ovario gracias a una inhibición de la reparación por HR¹⁸¹, una de las dos vías implicada en la reparación de DSBs. La otra vía de reparación de DSBs es la de NHEJ, que ocurre de manera más rápida¹⁵⁷ y se puede emplear para la reparación de lesiones relacionadas con el estrés oxidativo²⁵⁶. En nuestro trabajo confirmamos que la vía de reparación de NHEJ es esencial para la reparación de DSBs generadas por la CQ. La inhibición de esta vía de reparación, empleando tres inhibidores distintos, evitó que los focos de γ H₂AX desaparecieran tras la eliminación del tratamiento con CQ. Además, observamos que la CQ generaba un efecto sinérgico cuando se combinaba con los tres inhibidores de NHEJ en las cuatro líneas celulares de cáncer de ovario, las cuales representan los subtipos histopatológicos más comunes de cáncer de ovario.

Previamente mostramos cómo la inducción de DSBs por la CQ y la citotoxicidad de la combinación CQ/LBH se podía revertir con el uso del antioxidante NAC. En este caso, encontramos que la adición de NAC también evitaba la muerte celular de las

células tratadas con CQ e inhibidores de NHEJ. Todo esto indica que la producción de ROS y la consecuente generación de DSBs es crítica en la citotoxicidad observada con las combinaciones estudiadas. Además, observamos que la inhibición de ambas vías de reparación del DNA (HRR y NHEJ) aumentó en gran medida el efecto sinérgico obtenido con la CQ.

La habilidad de los inhibidores de NHEJ de detener el crecimiento tumoral cuando se emplean en combinación con distintos agentes genotóxicos se ha estudiado en distintos tipos de tumores. Así, en el caso del inhibidor de DNA-PKs NU-7026, se ha descrito que su uso potencia el efecto citotóxico de compuestos que actúan sobre la topoisomerasa II en células de leucemia²⁵⁷. Además, se ha visto un efecto citotóxico sinérgico en líneas celulares de colon cuando se emplea junto con irinotecan²⁵⁸ y que sensibiliza a las células tumorales a la radiación ionizante²⁵⁹. Un efecto de radio- y quimiosensibilización se ha descrito también para el inhibidor KU-57788, otro inhibidor selectivo y potente de DNA-PKs^{239,240,260,261}, lo que justifica un mayor desarrollo de estos inhibidores para su uso en clínica. En CO, una elevada expresión de DNA-PKs se asocia con una peor supervivencia²⁶² y el uso de inhibidores de estas proteínas con agentes citotóxicos se ha estudiado en distintos trabajos^{263,264}. Por último, el inhibidor SCR7 y sus derivados, que inhiben la DNA ligasa IV, enzima responsable de sellar las DSBs, han mostrado reducir la progresión tumoral en modelos animales, especialmente cuando se administraba con agentes que dañaban el DNA y generaban DSBs²⁶⁵. Los autores observaron que la IC50 variaba entre las distintas líneas celulares tumorales estudiadas, siendo la línea de ovario A2780 una de las más resistentes, lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, a pesar de ser una de las líneas con menor sensibilidad, el modelo *xenograft* con esta línea celular mostró que el tratamiento con SCR7 conseguía la regresión del tumor sin efectos secundarios evidentes²⁶⁵.

Las ventajas de usar uno de estos inhibidores de NHEJ frente a otros, que han sido o están siendo desarrollados, en combinación con CQ han de ser evaluadas en modelos *in vivo*. Sin embargo, algunos de estos inhibidores presentan problemas con la solubilidad²⁶¹ y la CQ, que ha probado su eficacia en estudios preclínicos, ha mostrado dificultad para atravesar la membrana celular en presencia de los microambientes tumorales ácidos característicos de los tumores²⁴⁷. Estos problemas, junto con una baja biodisponibilidad en el sitio de desarrollo de los tumores debido a las concentraciones/pautas/vías de administración utilizadas, podrían ser los responsables del resultado negativo observado en nuestro estudio *xenograft*. Una opción interesante para solventar dichos problemas sería la encapsulación de la CQ en nanopartículas. Esta aproximación ha demostrado aumentar la liberación de fármacos antitumorales en la zona tumoral, obteniendo mejores perfiles farmacocinéticos, alargando el tiempo de circulación del tumor y reduciendo la toxicidad en modelos *in vivo*^{217,248,250,266,267}. Por tanto, la encapsulación de la CQ junto a un inhibidor de NHEJ podría ser una estrategia terapéutica interesante para el tratamiento del cáncer de ovario, ya que podría recapitular la eficacia del tratamiento combinado mostrado en este trabajo.

Panobinostat synergistically enhances the cytotoxicity of microtubule destabilizing drugs in ovarian cancer cells

María Ovejero-Sánchez^{1,2,3}, Gloria Asensio^{1,3}, Myriam González^{1,4,5}, Rafael Peláez^{1,4,5}, Miguel Vicente-Manzanares^{1,3}, Rogelio González-Sarmiento^{1,2,3*} and Ana Belén Herrero^{1,2,3*}

3

¹Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

²Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (IBMCC), University of Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

⁴Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

⁵Laboratorio de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

Artículo en preparación

CAPÍTULO 3: Efecto de la combinación de Panobinostat con agentes desestabilizantes de microtúbulos

Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto implicados en el transporte intracelular, la división celular, los cambios morfológicos de las células y la motilidad celular. Se trata de estructuras cilíndricas compuestas por 13 protofilamentos formados por heterodímeros de α - y β -tubulina que polimerizan verticalmente en la misma dirección²⁶⁸. Existen múltiples agentes quimioterápicos que se dirigen a los microtúbulos, entre los que se encuentran los taxanos¹³⁴.

Los taxanos se unen a la tubulina por el sitio de unión del paclitaxel y se emplean en el tratamiento del cáncer de ovario junto a los platinos. El principal taxano empleado para el tratamiento de este tipo de tumores es el paclitaxel. Como se describió en la introducción, el mecanismo de acción de estos compuestos se basa en la unión a los microtúbulos, lo que estabiliza los contactos entre los protofilamentos, promoviendo así el ensamblaje de éstos. A bajas concentraciones, los taxanos alteran la dinámica de los microtúbulos, evitando que las células completen el proceso de mitosis, lo que conduce a una acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular y a la muerte celular por apoptosis. Por otro lado, a altas concentraciones inhiben la despolimerización de los microtúbulos^{134,135}. La eficacia de estos compuestos se ve limitada por su baja solubilidad acuosa (<2 $\mu\text{g/ml}$), su toxicidad a dosis elevadas y la aparición de resistencias a estos fármacos^{138,269-271}. Las resistencias a estos compuestos se suele asociar a las proteínas P-gp, que expulsan los fármacos fuera de la célula, así como a alteraciones en la tubulina (mutaciones de los genes que codifican esta proteína o una expresión alterada de ciertos isotipos de tubulina)^{135,272-275}.

Además del sitio de unión del paclitaxel, existen otros lugares de unión de fármacos en la tubulina como son el sitio de la colchicina o el de la vinca que podrían ser útiles como diana de nuevos compuestos farmacológicos. En concreto, el lugar de unión de la colchicina presenta ciertas ventajas para el diseño de compuestos farmacológicos como que sus ligandos presentan estructuras químicas sencillas. Estos ligandos tienen efectos antitumorales y afectan a la angiogénesis. Algunos de estos compuestos han llegado a ensayos clínicos, como la combretastatina A4 o la sulfonamida ABT-751. Sin embargo, su eficacia es limitada puesto que la combretastatina A4 presenta una baja solubilidad y presenta un grupo hidroxilo fenólico que hace susceptible a esta molécula a la inactivación celular por glucuronidación y, en el caso de la sulfonamida ABT-751, su potencia es reducida²⁷⁶⁻²⁷⁸.

Teniendo en cuenta las ventajas del sitio de unión a la colchicina, en colaboración con el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, se decidió estudiar nuevos compuestos sintetizados por este departamento que se unen al sitio de unión de la colchicina de la tubulina. Se estudiaron dos tipos de compuestos: sulfonamidas desestabilizantes de microtúbulos (MDS) y una isocombretastatina. Para caracterizar su actividad citotóxica se llevaron a cabo ensayos de proliferación y de ciclo celular y para estudiar su efecto sobre la α -tubulina se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Tras el estudio de los compuestos MDS, se identificaron los 3 compuestos más eficaces que mostraban una actividad antiproliferativa frente a distintas líneas celulares de cáncer de ovario, cérvix y mama de una manera similar o mejor que los taxanos. Estos compuestos eran capaces de alterar la estructura de los microtúbulos, de inhibir la polimerización de la tubulina, de inducir apoptosis y no eran sustratos de la proteína MDR-1, característica de células quimiorresistentes (Anexo II)¹⁵⁵.

Además, se ha descrito que los HDACi, incluido el Panobinostat, afectan a la α -tubulina, impidiendo su deacetilación^{268,279-282}. Por ello, decidimos estudiar la efectividad de una nueva combinación en líneas celulares de cáncer de ovario: Panobinostat en combinación con los compuestos desestabilizantes de microtúbulos generados en el Departamento de Química Farmacéutica.

3.1. Los compuestos desestabilizantes de microtúbulos inhiben la proliferación e inducen una parada de ciclo celular en G2/M y apoptosis en líneas celulares de cáncer de ovario

Para este trabajo se emplearon cuatro compuestos sintetizados por el departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, los tres publicados recientemente (38, 42, 45) y PILA9, un fármaco aún sin caracterizar. Los fármacos 38, 42, 45 son sulfonamidas desestabilizantes de microtúbulos (MDS), moléculas híbridas resultado de la combinación de las estructuras químicas de la combretastatina A4 y la sulfonamida ABT-751. Estos compuestos mantienen los anillos A y B de la combretastatina A4, si bien se elimina el grupo hidroxilo del anillo B o sustituye por otros grupos y se modifica un hidrógeno del anillo A, y se unen por el puente sulfonamida del compuesto ABT-751 que también se modifica a nivel del nitrógeno (**Figura 48**)¹⁵⁵. En el caso del cuarto compuesto (PILA9) es una isocombretastatina que mantiene los anillos A y B de la combretastatina A4, si bien se modifica el anillo B como se muestra en la **Figura 48**.

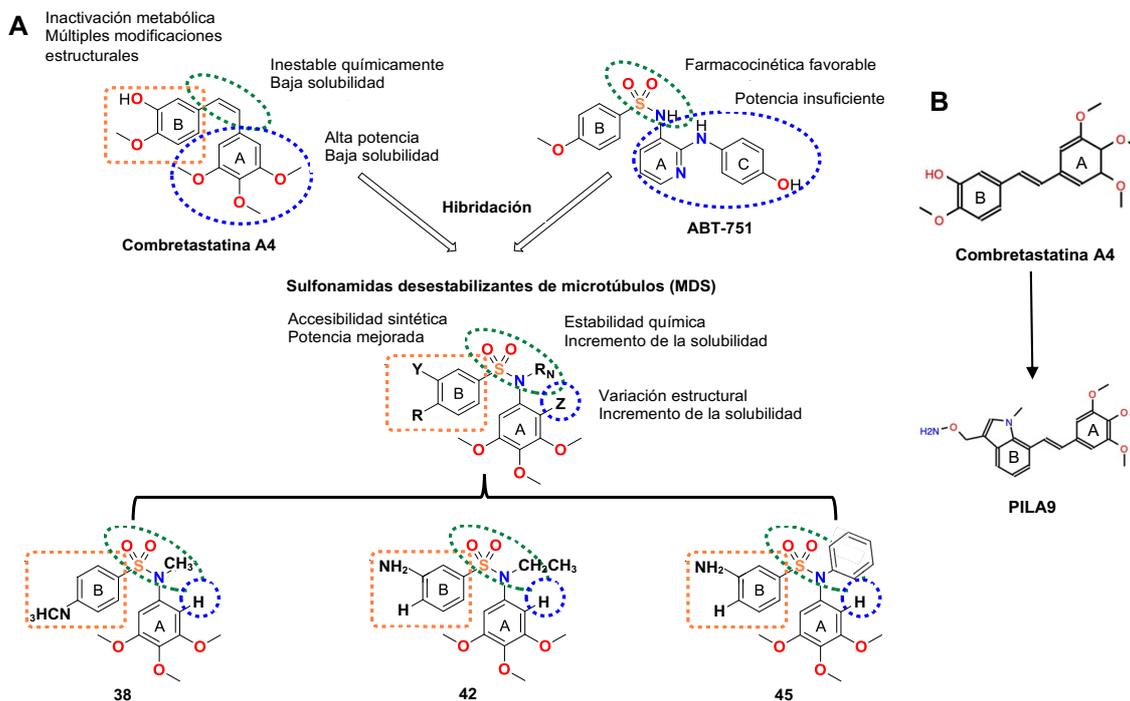


Figura 48. Estructura química de los agentes desestabilizantes de microtúbulos empleados en este trabajo. (A) Estructura química de la combretastatina A4 y la sulfonamida ABT-751 a partir de la cual se diseñaron los compuestos MDS y de los compuestos 38, 42 y 45. Adaptado de referencia¹⁵⁵. (B) Estructura química de la combretastatina A4 y la isocombretastatina PILA9. Realizado con el editor *JSME Molecular Editor*.

En primer lugar, se evaluó el efecto de estos compuestos a nivel de proliferación celular en las cuatro líneas celulares de ovario. Para ello, se estudiaron varias dosis de cada uno de los compuestos a 24, 48 y 72 horas. Los resultados se muestran en la **Figura 49**, así como la IC50 a 72 horas de tratamiento. Como se puede observar, los cuatro compuestos inhibieron la proliferación de manera dosis y tiempo dependiente. El compuesto que mostraba una mayor inhibición del crecimiento celular fue el PILA9 con IC50 inferiores a 7 nM en las 4 líneas celulares. De las cuatro líneas celulares, la que mostró una mayor sensibilidad a los compuestos MDS fue la línea SK-OV-3 y en el caso del compuesto PILA9 fue la línea celular OVCAR-8 la más sensible.

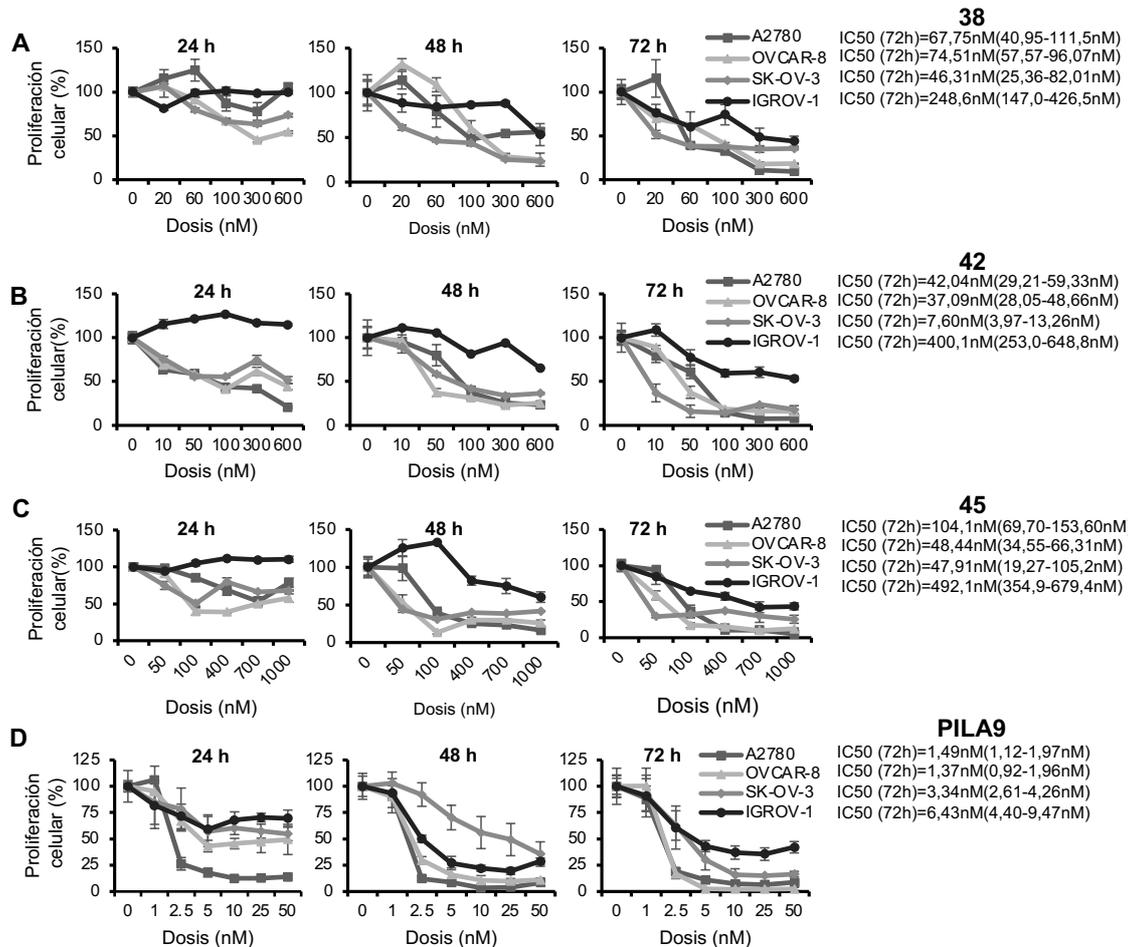


Figura 49. Efecto de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos en las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de (A) 38, (B) 42, (C) 45 y (D) PILA9 indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos.

A continuación, decidimos comprobar si la inhibición de la proliferación de estos compuestos era comparable a la observada con el paclitaxel, para ello se llevaron a cabo ensayos MTT empleando distintas dosis de este fármaco a distintos tiempos. El efecto en la proliferación celular se muestra en la **Figura 50** con el valor de la IC50 a 72 horas. El tratamiento con paclitaxel redujo la proliferación celular de manera dosis y tiempo dependiente, siendo la línea celular OVCAR-8 la más sensible a este tratamiento (6,61 nM) y siendo la línea A2780 la más resistente al tratamiento (67,75 nM). Si se compara la respuesta entre los compuestos desestabilizantes a microtúbulos y el paclitaxel, se observa como el compuesto PILA9 muestra unos valores de IC50 mejores que el que se obtiene con el tratamiento con paclitaxel, lo que indicaría una mayor potencia en la inhibición del crecimiento celular. En el caso de los MDS, observamos

unas IC50 similares entre el tratamiento con paclitaxel y estos compuestos en las líneas A2780 y SK-OV-3, excepto en el caso del compuesto 42, cuya IC50 es mucho menor (7,61 nM) a la obtenida con el paclitaxel (38,36 nM). La línea IGROV-1 resultó ser más resistente a los MDS que a paclitaxel.

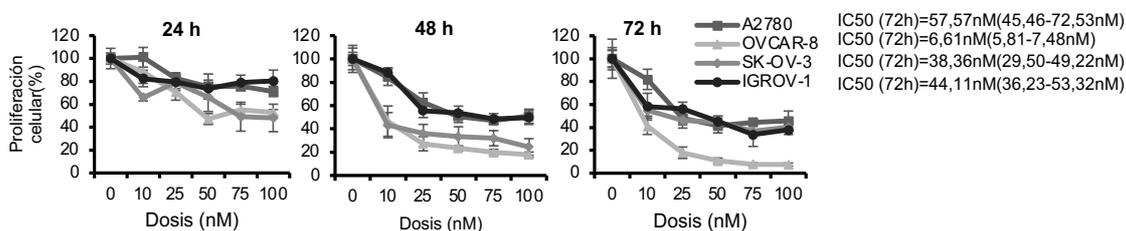


Figura 50. Efecto del paclitaxel en las líneas celulares de cáncer de ovario. Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis de paclitaxel indicadas durante 24, 48 y 72 horas tras lo que se midió la viabilidad celular. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos

Posteriormente, se decidió realizar un estudio de ciclo celular para caracterizar la actividad antiproliferativa de estos compuestos. En el caso de los compuestos MDS, se seleccionó la línea celular más sensible (SK-OV-3) para este estudio, y para el compuesto PILA9 se escogieron dos concentraciones distintas para este estudio: 1,75 nM para las líneas A2780 y OVCAR-8 (más sensibles) y 7,5 nM para las líneas IGROV-1 y SK-OV-3 (más resistentes). Los resultados se muestran en las **Figuras 51 y 52**. Los tratamientos con los agentes desestabilizantes de microtúbulos generaron una parada en la fase G2/M de ciclo celular, salvo el tratamiento con el compuesto 42 en las condiciones estudiadas. La parada en esta fase del ciclo celular fue especialmente marcada en las células tratadas con el compuesto PILA9. Además, todos los compuestos causaron un efecto citotóxico, puesto que aumentaron el porcentaje de células en fase subG0. Tras el estudio de ciclo celular, se llevó a cabo un ensayo de apoptosis. Como se muestra en la **Figura 52**, los compuestos MDS indujeron apoptosis en la línea celular SK-OV-3. El compuesto PILA9 también generó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas en las cuatro líneas celulares como se observa en la **Figura 52**. El aumento fue mayor en las líneas celulares A2780 y OVCAR-8, en las que con dosis inferiores se observa una inducción más fuerte de la apoptosis.

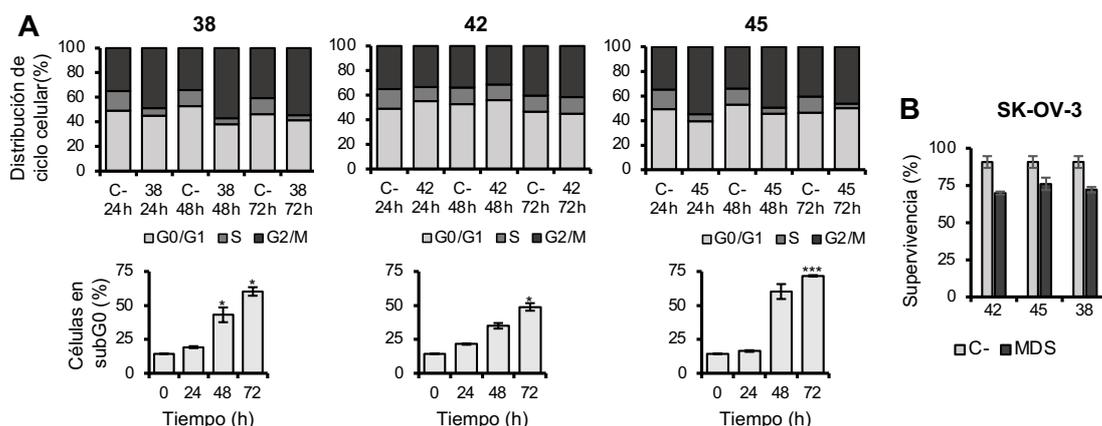


Figura 51. Efecto de los compuestos MDS en el ciclo celular y en la supervivencia celular de la línea celular SK-OV-3. (A) Panel superior: Distribución de ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas comparando las células tratadas con 38 (600 nM), 42 (50 nM) o 45 (400 nM) con las no tratadas excluyendo la población sub-G0. Panel inferior: porcentaje de células muertas (sub-G0) tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con los compuestos MDS. (B) Porcentaje de células vivas tras el tratamiento con 38 (400 nM), 42 (50 nM) y 45 (600 nM). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (**p < 0,01; ***p < 0,001; *p < 0,05).

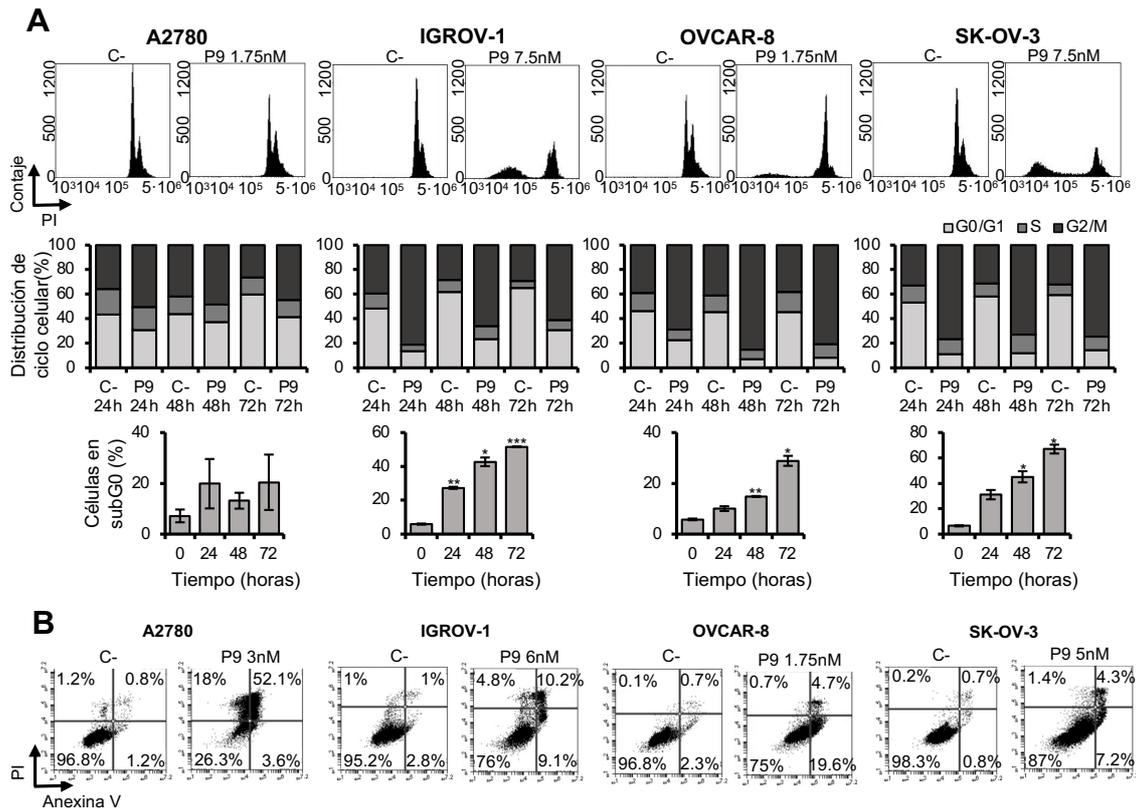


Figura 52. Efecto del compuesto PILA9 en el ciclo celular y en la supervivencia celular. (A) Panel superior: perfiles de ciclo celular con o sin el tratamiento con P9 a las dosis indicadas durante 72h. Panel medio: Distribución de ciclo celular tras 24, 48 y 72 horas comparando las células tratadas con P9 con las no tratadas excluyendo la población sub-G0. Panel inferior: porcentaje de células muertas tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con P9. Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar de los datos (***p<0,001; **p < 0,01; *p < 0,05). (B) Las distintas líneas celulares se trataron con las dosis indicadas del fármaco y tras el marcaje con yoduro de propidio y anexina V se obtuvieron los distintos dot plots en los que se observa el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas) y necróticas (PI positivas)

3.2. Los compuestos desestabilizantes de microtúbulos alteran la estructura de los microtúbulos de líneas celulares de cáncer de ovario

Para estudiar el efecto de las sulfonamidas desestabilizantes de microtúbulos en la línea celular más sensible a estos compuestos (SK-OV-3). Para ello se realizó un ensayo de inmunofluorescencia donde se marcó en verde la α -tubulina de las células. En la **Figura 53**, se muestra el efecto de los distintos MDS sobre la α -tubulina en la línea SK-OV-3. Los compuestos 38, 42 y 45 alteraron la estructura de los microtúbulos. La α -tubulina en las células sin tratar mostró un aspecto de “hebras” mientras que, en el caso de las células tratadas con las distintas sulfonamidas desestabilizantes de microtúbulos, la α -tubulina mostró un aspecto más difuso. Asimismo, encontramos células con múltiples núcleos con los tres tratamientos.

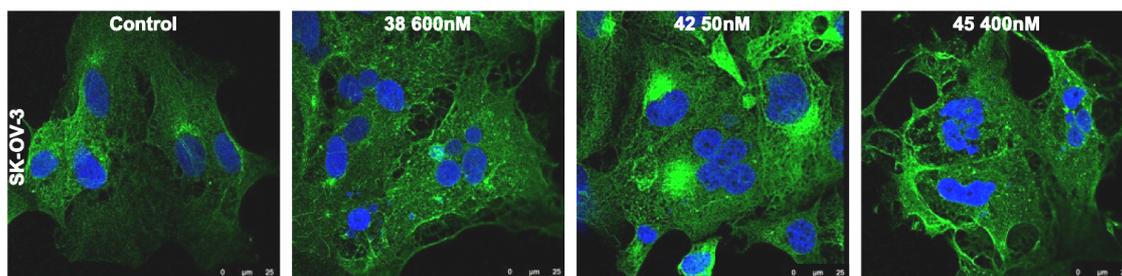


Figura 54. Efecto de los compuestos MDS en la α -tubulina de la línea celular SK-OV-3. Mediante microscopía confocal se observa en la α -tubulina en verde y los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul) de las células sin tratar y tratadas 72 horas con los compuestos 38 (600 nM), 42 (50 nM) y 45 (400 nM).

Una vez comprobado el efecto de los compuestos MDS en la α -tubulina, se decidió estudiar si el efecto de la isocombretastatina PILA9 era similar. Para ello se empleó microscopía de fluorescencia, en el que se marcó en verde la α -tubulina y en rojo se empleó la faloidina, que marca la actina de las células. Los resultados en la línea A2780 y SK-OV-3 se muestran en la **Figura 54**. Como se puede observar, el tratamiento con PILA9 generó una pérdida del aspecto habitual en “hebras” de los microtúbulos en tan solo 24 horas, mostrándose totalmente difusos, especialmente en la línea SK-OV-3. Estos resultados indican que tanto los MDS 38, 42 y 45 como PILA9 alteran la red de microtúbulos de las células.

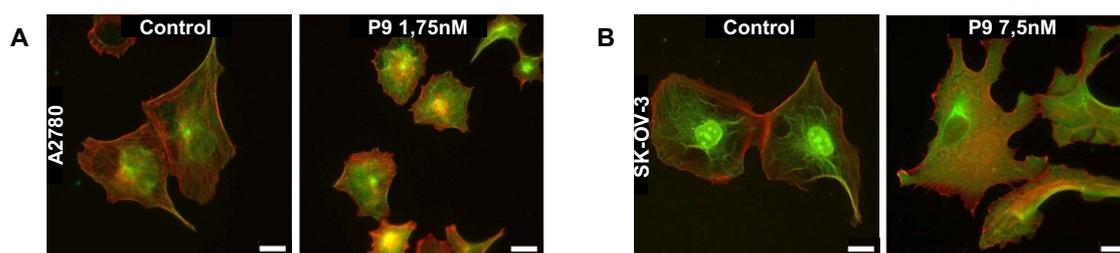


Figura 53. Efecto del compuesto PILA9 en la α -tubulina. (A) La línea A2780 se trató con 1,75 nM del compuesto y (B) la línea SK-OV-3 fue tratada con 7,5 nM del compuesto durante 24 horas. Mediante microscopía de inmunofluorescencia se observa la α -tubulina en verde y la actina marcada en rojo de las células sin tratar y las tratadas con PILA9. Escala: 10 μ m.

3.3. La combinación de Panobinostat y compuestos desestabilizantes de microtúbulos induce muerte celular de manera sinérgica en líneas celulares de cáncer de ovario

La acetilación es una modificación post-traducciona l de la α -tubulina con importantes funciones celulares, como la migración, la polaridad, el transporte de vesículas o el desarrollo. Esta acetilación tiene lugar en el residuo de lisina 40 de la α -tubulina, que se encuentra en la región interna del microtúbulo²⁶⁸. Los pan-inhibidores de histona deacetilasa, como el Panobinostat, actúan sobre la histona deacetilasa 6 que es la encargada de deacetilar la α -tubulina de las células. Por lo que, el tratamiento de células con estos compuestos inhibe la actividad de la HDAC6, lo que conduce a un aumento de la acetilación de la α -tubulina de las células. Existen múltiples estudios en los que se ha estudiado el uso combinado de estos agentes con compuestos citotóxicos, como el paclitaxel^{280,281,283–285}. Asimismo, en los últimos años existen múltiples trabajos en los que se están diseñando inhibidores duales, de HDACs y de la tubulina, en los que se observa un fuerte efecto antitumoral y antiangiogénico^{286–291}. Teniendo en cuenta todo esto, decidimos realizar ensayos de apoptosis para estudiar el efecto combinado

de los distintos agentes desestabilizantes de microtúbulos junto con el Panobinostat. Para ello, se emplearon varias dosis de los distintos compuestos manteniendo la relación entre las dosis de los distintos fármacos constante. Como se observa en las Figuras 55, 56, 57 y 58, el empleo de Panobinostat junto con los compuestos desestabilizantes de microtúbulos generó una citotoxicidad muy superior al de los tratamientos individuales. Para determinar el tipo de interacción entre estos compuestos, se calculó el índice de combinación para cada uno de los casos usando el software Compusyn. En todos los casos se obtuvieron índices de combinación inferiores a 1, cuando se empleaban las dosis más elevadas, lo que indica que el Panobinostat y estos agentes presentan una interacción sinérgica.

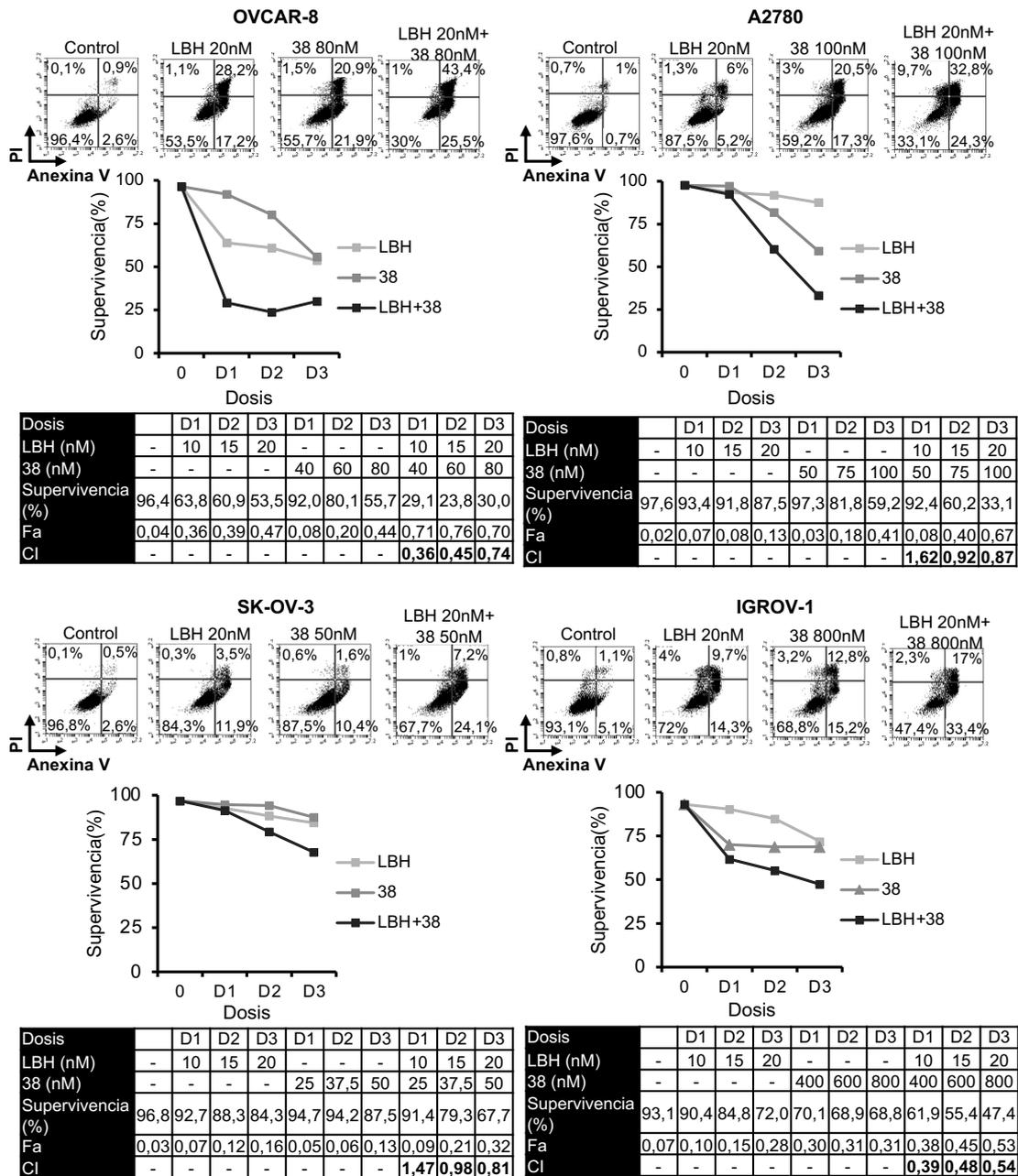


Figura 55. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto 38. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

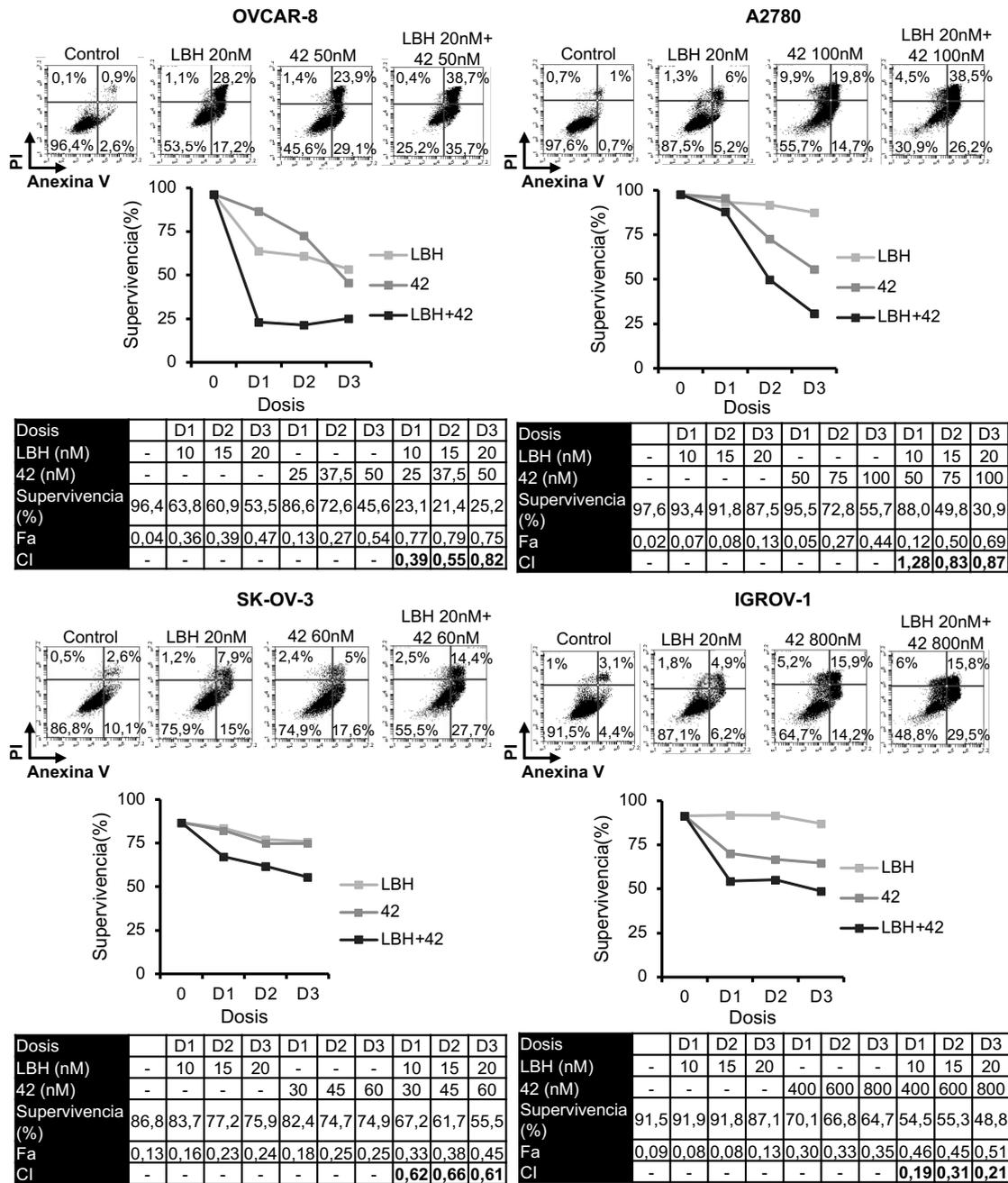


Figura 56. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto 42. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

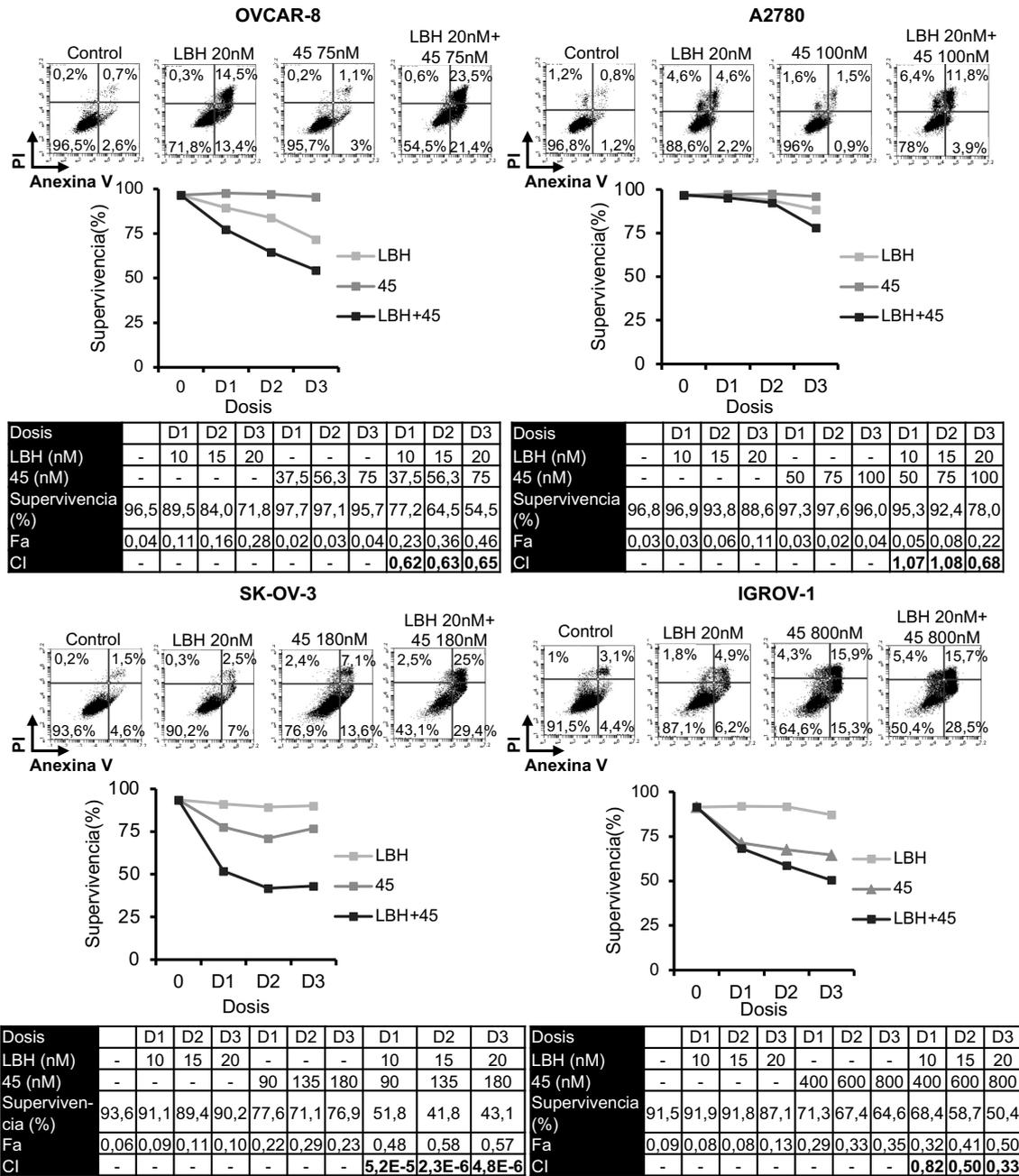


Figura 57. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto 45. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

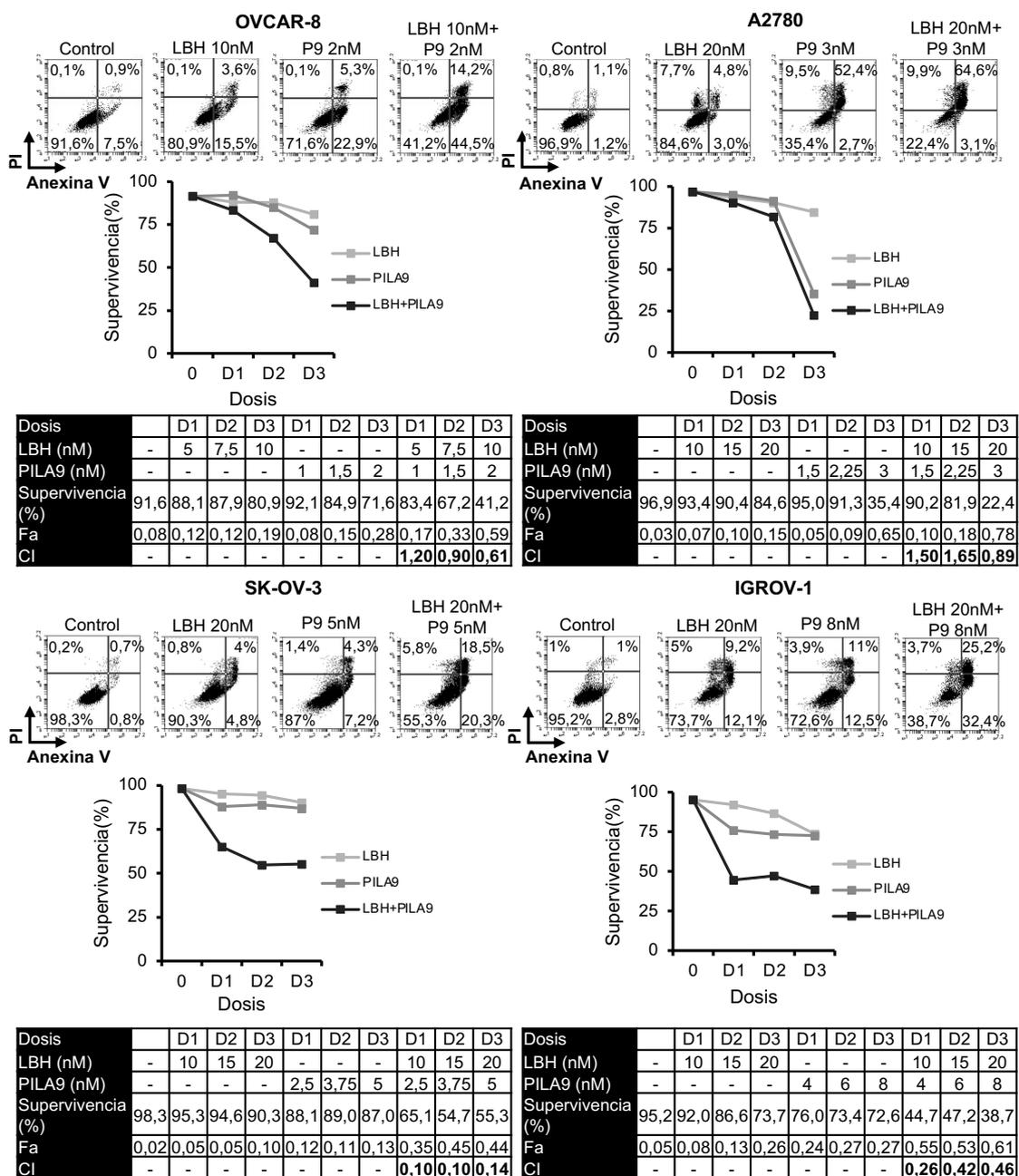


Figura 58. Efecto sinérgico del tratamiento combinado con Panobinostat y el compuesto PILA9. Las células se trataron durante 72h a las dosis indicadas de cada fármaco y el porcentaje de células apoptóticas se obtuvo por citometría de flujo. La dosis de cada fármaco, la supervivencia, la fracción alterada (Fa) y el índice de combinación (CI) se muestran en las distintas tablas.

3.4. El Panobinostat y los compuestos desestabilizantes de microtúbulos afectan a la acetilación de la α -tubulina

Teniendo en cuenta la actividad de los inhibidores de histona deacetilasa sobre la histona deacetilasa 6, encargada de deacetilar la α -tubulina de las células, se decidió estudiar la acetilación de la α -tubulina tras el tratamiento con Panobinostat. Para ello, se trataron las distintas líneas celulares de ovario con 20 nM de LBH durante 24 horas, tras lo cual se extrajeron proteínas y se estudió la expresión de la α -tubulina y la α -

tubulina acetilada, empleando como control de carga la expresión de la β -actina. Los resultados se muestran en la **Figura 59**, donde se puede observar como el tratamiento con Panobinostat aumentó la proporción de α -tubulina acetilada en las cuatro líneas celulares estudiadas. El incremento en la acetilación fue mayor en las líneas OVCAR-8 y SK-OV-3, que eran las que presentaban una mayor sensibilidad a este compuesto (IC50 más bajo) y en las que se observaba una parada en G2/M tras el tratamiento con este compuesto (**Figura 19 y 20**).

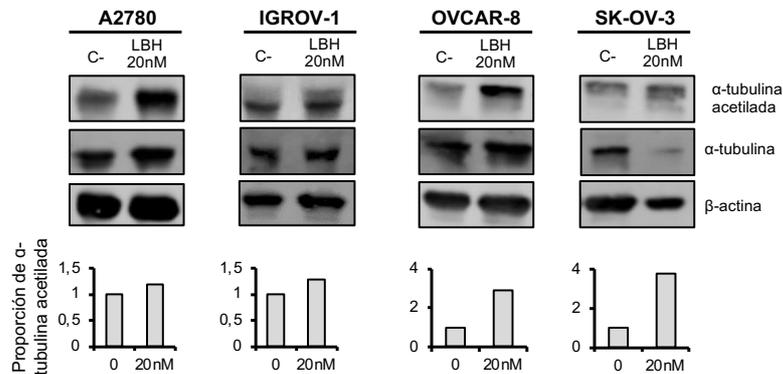


Figura 59. Efecto del Panobinostat en la acetilación de la α -tubulina. Se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada y la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100.

A continuación, se decidió estudiar si los compuestos desestabilizantes de microtúbulos afectaban a los niveles de acetilación de α -tubulina. En el caso de los compuestos MDS, se eligió el compuesto 38 para este estudio. Para determinar el efecto sobre la acetilación de la α -tubulina, las distintas líneas celulares se trataron con dosis crecientes del compuesto 38 y del compuesto PILA9 durante 24 horas y se estudió la acetilación de esta proteína mediante western blot de la misma manera que para el estudio del Panobinostat. Los resultados se pueden observar en la **Figura 60**, donde se ve cómo el compuesto 38 generó un incremento en la proporción de α -tubulina acetilada a dosis bajas, mientras que a dosis más elevadas se observó una bajada en esta acetilación. Además, se puede observar cómo la cantidad de α -tubulina total se reduce levemente con el aumento de dosis del fármaco, lo que se puede explicar ya que los compuestos MDS se unen a la α -tubulina e inducen su despolimerización. En el caso del compuesto PILA9, la proporción de α -tubulina acetilada solo parece aumentar en la dosis más baja estudiada (1,75 nM). La proporción de tubulina acetilada se reduce en gran medida con un aumento de la dosis en todas las líneas celulares estudiadas. En las líneas más sensibles (A2780 y OVCAR-8), se observa una leve reducción en los niveles de α -tubulina total al igual que en el caso del compuesto 38.

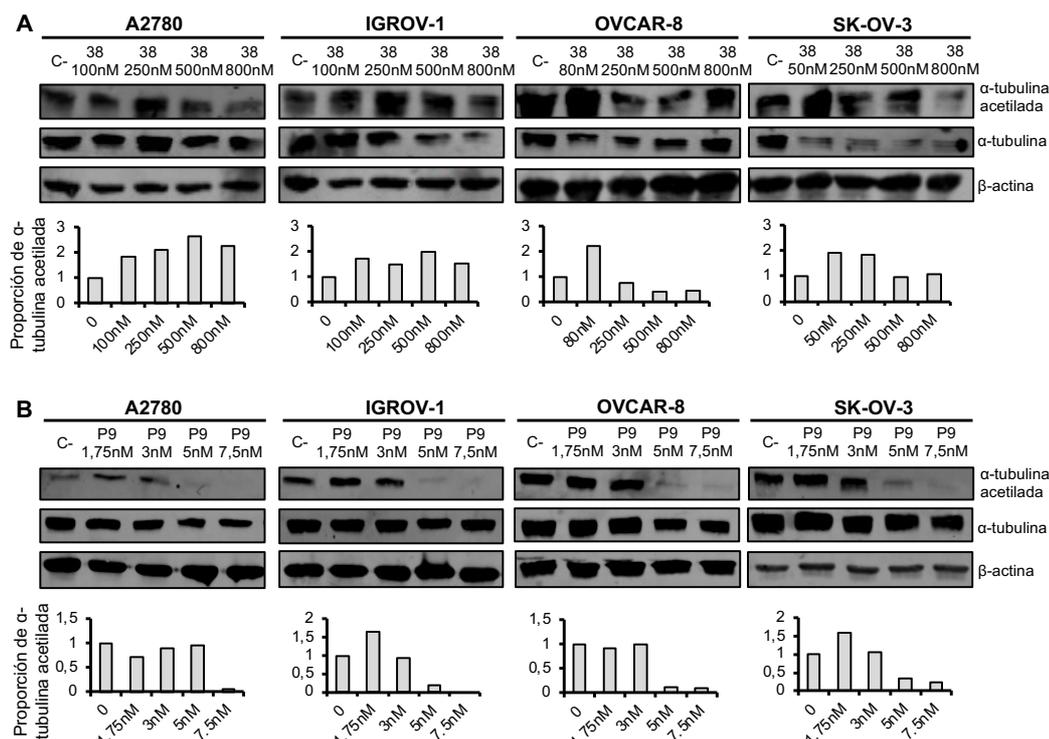


Figura 60. Efecto de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos en la acetilación de la α -tubulina. Las células se trataron con dosis crecientes de (A) 38 y (B) P9 y los niveles de α -tubulina total y acetilada y la proporción de α -tubulina acetilada se muestran. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100.

3.5. La combinación de Panobinostat y compuestos desestabilizantes de microtúbulos inducen una elevada acetilación de la α -tubulina

Como se ha mostrado en las Figuras 59 y 60 tanto el Panobinostat como los compuestos desestabilizantes de microtúbulos son capaces de inducir una acetilación de la α -tubulina. Esta acetilación se suele asociar con microtúbulos más estables, aunque no está claro si esta modificación sería la responsable de dicha estabilidad^{268,292}. Una hiperacetilación de la tubulina se ha relacionado con una parada aberrante de la mitosis que conduce a una inestabilidad cromosómica y a una aneuploidía de las células, lo que podría acabar produciendo la muerte celular²⁹³. Además, en algunos estudios se ha correlacionado el nivel de acetilación de la α -tubulina con la apoptosis^{294,295}. Basándonos en estos antecedentes, nos propusimos estudiar el efecto combinado del Panobinostat con compuestos desestabilizantes de microtúbulos sobre la acetilación de la α -tubulina. Estudiamos los niveles de expresión de la α -tubulina acetilada y total cuando las células se trataron 24 horas con Panobinostat a 20 nM y el compuesto 38 (50 nM para la línea SK-OV-3, 80 nM para la línea OVCAR-8 y 100 nM para la línea A2780) mediante western blot, y también mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 61. En las tres líneas celulares, se puede observar como el tratamiento simple con Panobinostat o con el compuesto 38 aumentó de nuevo la acetilación de la α -tubulina en comparación con los niveles observados en células sin tratar (control). Cuando se emplearon ambos agentes juntos, el incremento de la acetilación fue muy superior al observado por el efecto de los compuestos de manera individual.

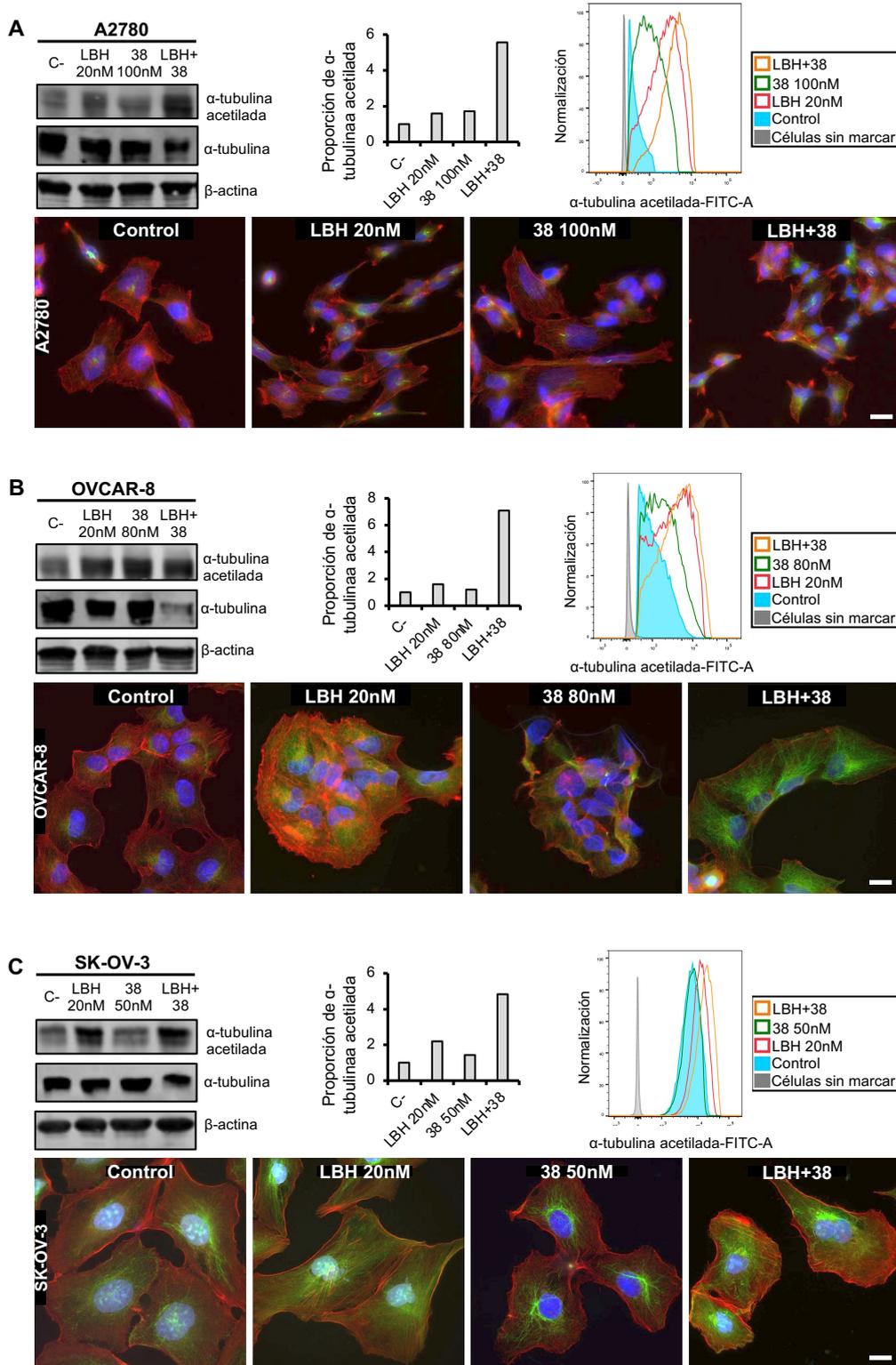


Figura 61. La combinación de Panobinostat y el compuesto 38 induce una gran acetilación de la α-tubulina. Las líneas celulares (A) A2780, (B) OVCA8-8 y (C) SK-OV-3 se trataron con LBH (20 nM) y el compuesto 38 a las dosis indicadas durante 24 horas. En la parte superior de los paneles se muestran los niveles de α-tubulina total y acetilada por western blot (izquierda) y citometría de flujo (derecha) y la proporción de α-tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α-tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β-actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100. En la parte inferior de los paneles se observa mediante microscopia de inmunofluorescencia la α-tubulina acetilada marcada en verde, la actina marcada en rojo y los núcleos marcados en azul de las células sin tratar y las tratadas con los distintos compuestos. Escala: 10 μm.

A continuación, se quiso comprobar el efecto sobre la acetilación de la tubulina de los otros dos compuestos análogos de sulfonamidas, 42 y 45. Para ello, se estudiaron los niveles de expresión de la α -tubulina acetilada y total en los tratamientos de 24 horas con Panobinostat y dichos compuestos mediante western blot. Los resultados se muestran en la **Figura 62**. Se puede observar cómo la acetilación de la tubulina aumentó con los tratamientos individuales con LBH, 42 y 45. El tratamiento combinado LBH-42 y LBH-45 produjo un aumento aún mayor en la acetilación, con la excepción de la línea celular OVCAR-8 tratada con LBH y 42, donde los niveles fueron similares a los obtenidos con el LBH en monoterapia. Estos resultados fueron además verificados mediante inmunofluorescencia (**Figura 62**).

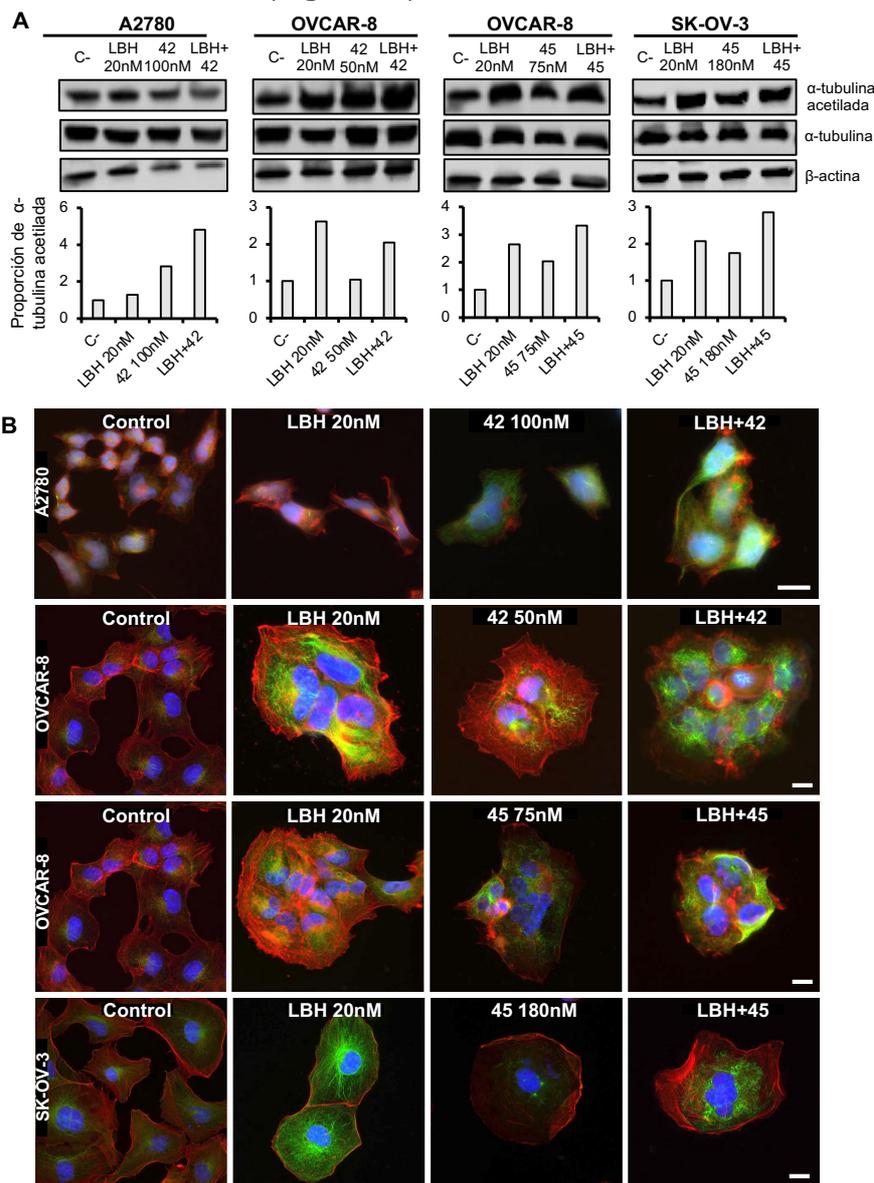


Figura 62. La combinación de Panobinostat y los compuestos 42 y 45 induce una gran acetilación de la α -tubulina. (A) Las líneas celulares A2780, OVCAR-8 y SK-OV-3 se trataron con LBH y los compuestos 42/45 a las dosis indicadas durante 24 horas. En la parte superior de los paneles se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada por western blot y en la parte inferior la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100. (B) Imágenes representativas obtenidas por microscopia de inmunofluorescencia en las que se observa la α -tubulina acetilada en verde, la actina en rojo y los núcleos en azul de las células sin tratar y las tratadas con los distintos compuestos. Escala: 10 μ m.

Por último, se exploró el efecto de la combinación de Panobinostat y PILA9 tras 24 horas de tratamiento. Teniendo en cuenta que los niveles de α -tubulina acetilada se reducen drásticamente con el tratamiento con esta isocombretastatina a dosis elevadas, se empleó una dosis más baja de este compuesto (1,75 nM) junto con el LBH. Los resultados se muestran en la **Figura 63**. El tratamiento con LBH y PILA9 aumentó la proporción de tubulina acetilada y la combinación de ambos agentes incrementó esta acetilación en gran medida.

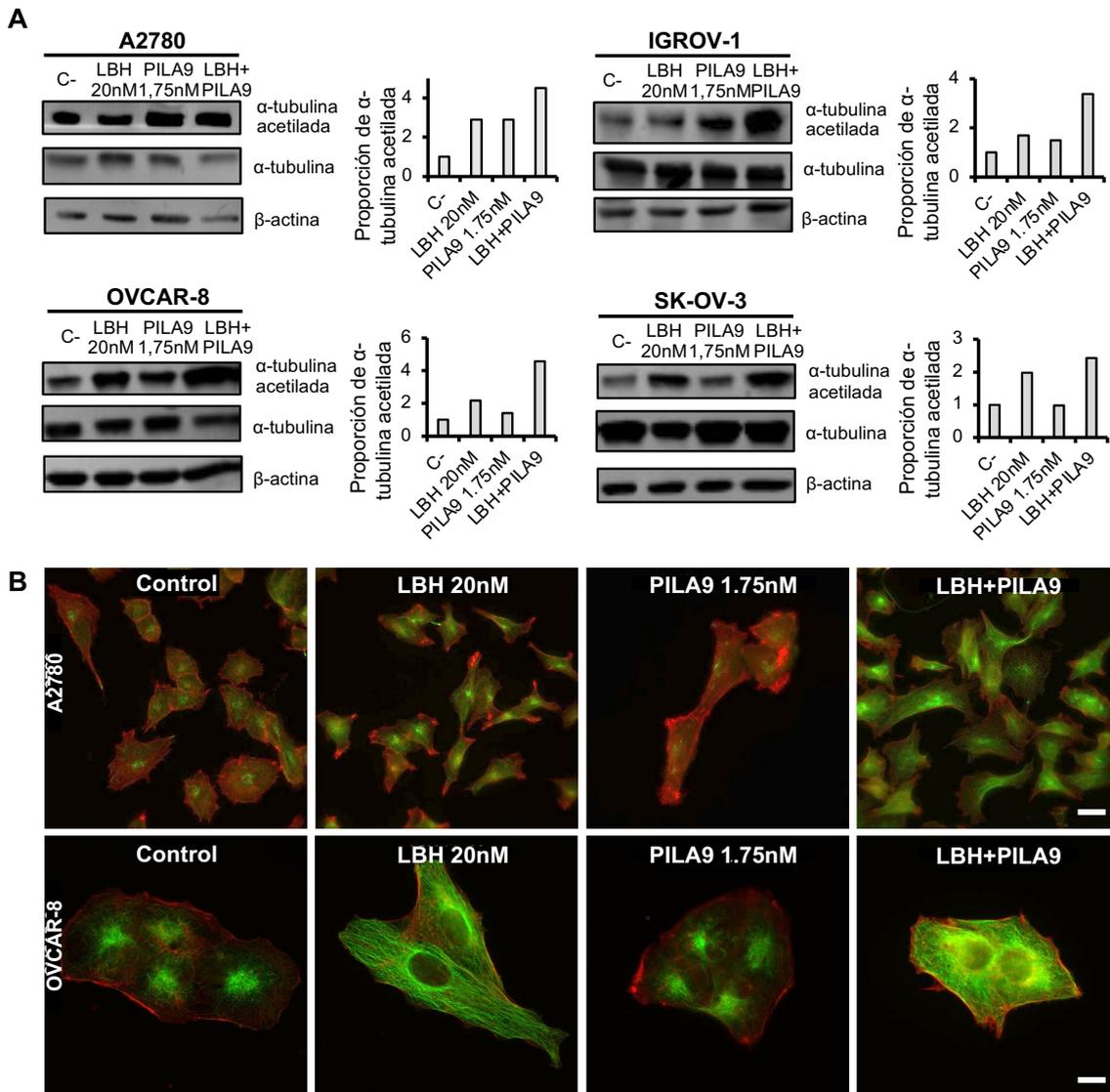


Figura 63. La combinación de Panobinostat y PILA9 una gran acetilación de la α -tubulina. (A) Las líneas celulares de cáncer de ovario se trataron con LBH y PILA9 a las dosis indicadas durante 24 horas. Se muestran los niveles de α -tubulina total y acetilada por western blot y la proporción de α -tubulina acetilada. La proporción de tubulina acetilada se calculó como el ratio entre los niveles de α -tubulina acetilada y total previa normalización de estos con los niveles de β -actina (control de carga). Los niveles de las células sin tratar (C-) se consideraron como 100. (B) Imágenes representativas obtenidas por microscopia de inmunofluorescencia en las que se observa la α -tubulina acetilada en verde y la actina en rojo de las células sin tratar y las tratadas con los distintos compuestos. Escala: 10 μ m.

DISCUSIÓN

Los taxanos, generalmente el paclitaxel en monoterapia o en combinación con platinos, representan la primera línea de tratamiento quimioterápico de los tumores ginecológicos, incluyendo el cáncer de ovario^{38,94,296}. Estos compuestos se unen al sitio taxol de la β -tubulina generando una parada de ciclo celular, un incremento de la polimerización de los microtúbulos y una inhibición de la replicación de las células tumorales^{138,272}. No obstante, la eficacia de este tratamiento se ve limitada por la toxicidad, los problemas de farmacocinética y la aparición de resistencias, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos^{272,273}. La tubulina presenta otros sitios de unión de interés farmacológico, entre los que se encuentra el sitio de la colchicina. El lugar de unión de la colchicina presenta ciertas ventajas para el diseño de compuestos farmacológicos como que sus ligandos presentan estructuras químicas sencillas. En este trabajo, se han estudiado cuatro compuestos que se unen al sitio de la colchicina de la tubulina y que podrían presentar un gran potencial como agentes antitumorales en monoterapia y especialmente combinados con un inhibidor de histona deacetilasa, el Panobinostat. Tres de estos compuestos son sulfonamidas desestabilizantes de microtúbulos (38, 42 y 45)¹⁵⁵, moléculas híbridas de la combretastatina A4 y el compuesto ABT-751, y uno de ellos es una isocombretastatina (PILA9).

Los compuestos que se unen al sitio de la colchicina, como la combretastatina A4 o el ABT-751 se han empleado para el tratamiento de distintos tipos de enfermedades incluido el cáncer^{297,298}. La combretastatina A4 presenta actividad antimitótica, antiangiogénica, capacidad de bloquear la migración de las células tumorales y una gran citotoxicidad frente a líneas celulares quimiorresistentes. El compuesto ABT-751, por su parte, presenta una buena farmacocinética si bien su citotoxicidad es reducida^{297,298}. Los fármacos frente al sitio de la colchicina generan un efecto citotóxico en líneas celulares tumorales junto con una parada en G2/M²⁹⁷⁻³⁰¹. Coincidiendo con lo descrito, los compuestos estudiados mostraron una fuerte respuesta antiproliferativa en las cuatro líneas celulares de ovario, especialmente en la línea SK-OV-3, que es la que muestra una mayor sensibilidad (IC50 menor). Asimismo, encontramos que el tratamiento con estos compuestos induce apoptosis y una fuerte parada en la fase G2/M del ciclo celular. En cuanto a la disposición de los microtúbulos, observamos que los cuatro compuestos alteraban la estructura de los microtúbulos, que pierden su aspecto de "hebras" para adoptar una disposición más difusa. Estos cambios en la estructura de la tubulina son similares a los observados en distintas líneas celulares tumorales con otros compuestos que se unen al sitio de unión de la colchicina, donde se ha visto que estos agentes se unen a la β -tubulina impidiendo que el microtúbulo adopte una posición recta, inhibiendo así el correcto ensamblaje y la polimerización de los microtúbulos^{297,299-301}.

Como se ha descrito anteriormente, las histonas deacetilasas presentan un papel esencial en la regulación epigenética actuando como represores transcripcionales. Una expresión elevada se ha observado de manera frecuente en distintos tumores, incluidos los de ovario^{127-129,289}. Esta alta expresión se relaciona con la progresión tumoral, un mal pronóstico y el desarrollo de quimioresistencias¹²⁷⁻¹²⁹, por lo que el uso de inhibidores de HDAC podría ser útil para el tratamiento de este tipo de tumores. Los HDACi promueven la transcripción de distintos genes cuya expresión aparece reprimida en los distintos tumores¹⁶⁴. Los pan-HDACi, como el LBH o el Vorinostat, inhiben distintas HDACs como la histona deacetilasa 6. La HDAC6 se encarga de deacetilar el residuo 40 de lisina de la α -tubulina, por lo que la actividad de los HDACi recupera la acetilación de la α -tubulina^{268,279}. En las líneas celulares de CO, detectamos un incremento en la acetilación de la α -tubulina tras el tratamiento con LBH, lo que coincide con lo observado

en distintos estudios en los que se describe una estabilización de los microtúbulos tras el tratamiento con HDACis en distintas líneas celulares, incluidas las de cáncer de ovario²⁸⁰⁻²⁸².

Diversos trabajos han observado un incremento en la citotoxicidad producida por agentes que se unen a la tubulina en combinación con HDACi, por lo que se están desarrollando moléculas inhibidoras duales que parecen presentar una fuerte respuesta citotóxica²⁸⁰⁻²⁹¹. Esta mayor inducción de la apoptosis también se ha observado en modelos *xenograft*, donde se ha visto como el tratamiento combinado aumentaba al supervivencia de los ratones²⁸⁵. En cáncer de ovario, también se ha descrito como distintos inhibidores de histona deacetilasas, como el Vorinostat, potencian la apoptosis generada por el paclitaxel^{280,283,284}. Estos resultados son similares a los observados en nuestro trabajo, donde la adición del LBH al tratamiento con agentes que interfieren con los microtúbulos produce sinergia en las líneas CO^{280,283,284}. La eficacia de los taxanos en combinación con los HDACi se ha atribuido al efecto que tienen ambos agentes sobre la estabilización de los microtúbulos, puesto que los dos inducen una mayor acetilación de la α -tubulina, y con ello una estabilización de los microtúbulos²⁸¹. Sin embargo, los agentes desestabilizantes de microtúbulos (MDS) típicamente disminuyen los niveles de acetilación de la tubulina^{302,303}. No obstante, nuestros resultados indican que, a dosis bajas, los MDS estudiados también aumentan los niveles de acetilación de la tubulina, es más, la combinación de estos MDS con LBH potencia el efecto sobre la acetilación de los tratamientos individuales. Estos datos están en consonancia con otros trabajos donde también observan un nivel elevado de acetilación en condiciones de despolimerización de los microtúbulos. Así, los investigadores observaron que la colchicina bloquea la mitosis a altas concentraciones, mientras que a dosis más bajas estabiliza los microtúbulos, mostrándose niveles elevados de acetilación³⁰³. Además, los microtúbulos resistentes a la colchicina mostraban altos niveles de acetilación³⁰³. Por otro lado, se ha visto que los niveles de acetilación de α -tubulina se podrían correlacionar con los niveles de apoptosis. Esto se podría explicar porque una hiperacetilación de esta proteína se relaciona con una parada aberrante de la mitosis, lo que conduce a una inestabilidad cromosómica y a una aneuploidía de las células que podría acabar en muerte celular^{293-295,303}. En nuestro caso, una inducción del proceso de apoptosis podría explicar el incremento de acetilación que observamos con nuestros compuestos.

Teniendo en cuenta todos los resultados observados, el empleo de un HDACi junto a un compuesto desestabilizante de microtúbulos podría suponer una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del CO, especialmente para tumores que presenten resistencias al tratamiento estándar con taxanos. Sería necesario el estudio de estas combinaciones en modelos animales para testar la citotoxicidad que podrían provocar ambos agentes, especialmente la de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos, ya que, de momento, solo hemos estudiado su actividad *in vitro*.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

1. La cloroquina, además de inhibir la autofagia, induce la producción de especies reactivas de oxígeno generando roturas de doble cadena del DNA. Estas lesiones pueden ser reparadas tanto por la vía de reparación de recombinación homóloga como por la vía de reparación por unión de extremos no homólogos.
2. El Panobinostat, inhibidor de histona deacetilasa, presenta efectos celulares pleiotrópicos afectando a la reparación del DNA por recombinación homóloga, al proceso de autofagia y a la acetilación de la α -tubulina.
3. La combinación de compuestos que provocan daño en el DNA, como la cloroquina o el cisplatino, junto con agentes que alteran la reparación del DNA, como el Panobinostat o los inhibidores de la vía de reparación por unión de extremos no homólogos, produce un efecto citotóxico sinérgico en líneas celulares de cáncer de ovario, representando una posible estrategia terapéutica en pacientes con este tipo de tumor.
4. El estudio de nuevos compuestos que afectan a los microtúbulos, con mayor potencia y una solubilidad mejorada respecto a los taxanos, tiene un gran potencial frente al tratamiento de distintos tipos de tumores, como los de ovario, donde los taxanos representan el tratamiento estándar.
5. La combinación de inhibidores de histona deacetilasa, como el Panobinostat, junto con agentes que alteran la estabilidad de los microtúbulos mejora el efecto citotóxico de estos últimos, lo que representaría una posible estrategia en el tratamiento de tumores de cáncer de ovario.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Gibson, E. & Mahdy, H. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary*. StatPearls (StatPearls Publishing, 2019).
2. Szmelskyj, I., Aquilina, L. & Szmelskyj, A. O. Anatomy and physiology of the reproductive system. in *Acupuncture for IVF and Assisted Reproduction* 23–58 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/b978-0-7020-5010-7.00002-3.
3. Hinson, J., Raven, P. & Chew, S. HORMONAL CONTROL OF REPRODUCTION PART II. in *The Endocrine System* 99–113 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/b978-0-7020-3372-8.00009-4.
4. Ravindran, F. & Choudhary, B. Ovarian Cancer: Molecular Classification and Targeted Therapy. in *Ovarian Cancer - Updates in Tumour Biology and Therapeutics [Working Title]* (IntechOpen, 2021). doi:10.5772/intechopen.95967.
5. Perven, H. A. *et al.* Histological study of proportion of cortex and medulla of the ovary in Bangladeshi women. *Bangladesh Med. J.* **44**, 8–10 (2016).
6. Barrière, P., Mirallie, S. & Jean, M. Embriología del aparato genital femenino. *EMC - Ginecol.* **36**, 1–11 (2000).
7. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *The Cell: A Molecular Approach, Seventh Edition*. vol. 00 (2015).
8. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
9. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Las cifras del cáncer en España. 2022.* (2022).
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
11. Stewart, C., Ralyea, C. & Lockwood, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin. Oncol. Nurs.* **35**, 151–156 (2019).
12. Ray-Coquard, I. *et al.* Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **29**, iv1–iv18 (2018).
13. Reid, B. M., Permeth, J. B. & Sellers, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* **14**, 9–32 (2017).
14. Matulonis, U. A. *et al.* Ovarian cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 1–22 (2016).
15. Asociación contra el cáncer (AECC). ¿Qué es el cáncer de ovario? | Asociación Española Contra el Cáncer. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-ovario/que-es-cancer-ovario>.
16. Institute, N. N. C. *Cancer Facts & Figures 2020*. CA: A Cancer Journal for Clinicians (2020).
17. Torre, L. A. *et al.* Ovarian cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 284–296 (2018).
18. Dyba, T. *et al.* The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur. J. Cancer* **157**, 308–347 (2021).

19. Cancer burden statistics and trends across Europe | ECIS. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>.
20. The World Ovarian Cancer Coalition. The World Ovarian Cancer Coalition Atlas: Global Trends in Incidence, Mortality and Survival. *The every woman study* 1–39 (2018).
21. Budiana, I. N. G., Angelina, M. & Pemayun, T. G. A. Ovarian cancer: Pathogenesis and current recommendations for prophylactic surgery. *J. Turkish-German Gynecol. Assoc.* **20**, 47–54 (2019).
22. Karst, A. M. & Drapkin, R. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *J. Oncol.* **2010**, 1–13 (2010).
23. Piek, J. M. J. *et al.* Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J. Pathol.* **195**, 451–456 (2001).
24. Kindelberger, D. W. *et al.* Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* **31**, 161–169 (2007).
25. Kurman, R. J. & Shih, I. M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: A proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 433–443 (2010).
26. Shih, I. M. & Kurman, R. J. Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *American Journal of Pathology* vol. 164 1511–1518 (2004).
27. Kurman, R. J. & Shih, I. M. The dualistic model of ovarian carcinogenesis revisited, revised, and expanded. *American Journal of Pathology* vol. 186 733–747 (2016).
28. Karlan, B. Y. (Beth Y., Bristow, R. E. & Li, A. J. Gynecologic oncology: clinical practice & surgical atlas. 715 (2012).
29. Mok, S. C. *et al.* Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Dis. Markers* **23**, 367–376 (2007).
30. Yang, W. L., Godwin, A. K. & Xu, X. X. Tumor Necrosis Factor- α -Induced Matrix Proteolytic Enzyme Production and Basement Membrane Remodeling by Human Ovarian Surface Epithelial Cells: Molecular Basis Linking Ovulation and Cancer Risk. *Cancer Res.* **64**, 1534–1540 (2004).
31. Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P. & Tan, N. S. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cellular Immunology* vol. 343 (2019).
32. Rosenblatt, K. A., Weiss, N. S., Cushing-Haugen, K. L., Wicklund, K. G. & Rossing, M. A. Genital powder exposure and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Causes Control* **22**, 737–742 (2011).
33. Devouassoux-Shisheboran, M. & Genestie, C. Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chinese Journal of Cancer* vol. 34 50–55 (2015).
34. Kurman, R. J., Carcangiu, M. L., Harrington, C. S. & Young, R. H. WHO classification of tumours of female reproductive organs. *IARC Press* (2014).
35. Horta, M. & Cunha, T. M. Sex cord-stromal tumors of the ovary: A comprehensive review and update for radiologists. *Diagnostic and Interventional Radiology* (2015) doi:10.5152/dir.2015.34414.

36. Hatano, Y. *et al.* A comprehensive review of ovarian serous carcinoma. *Advances in Anatomic Pathology* vol. 26 329–339 (2019).
37. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Ovarian Cancer - Including Fallopian Tube Cancer and Primary Peritoneal Cancer Version 1.2016. 115 (2018) doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246.
38. Berek, J. S., Kehoe, S. T., Kumar, L. & Friedlander, M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **143**, 59–78 (2018).
39. Cho, K. R. & Shih, I.-M. OVARIAN CANCER. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246.
40. Cheng, E. J. *et al.* Molecular genetic analysis of ovarian serous cystadenomas. *Lab. Investig.* **84**, 778–784 (2004).
41. Morgan, F., Quevedo, E., Morgan, F., Báez, J. & López, G. Masas anexiales : Tumores benignos de ovarios , salpinges y misceláneos. *Rev Med UAS* **6**, 81–107 (2016).
42. Cormio, G. *et al.* Borderline Epithelial Tumors of the Ovary. in *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update* (InTech, 2013). doi:10.5772/54828.
43. Guleria, S., Jensen, A. & Kjær, S. K. Risk of borderline ovarian tumors among women with benign ovarian tumors: A cohort study. *Gynecol. Oncol.* **148**, 86–90 (2018).
44. Hauptmann, S., Friedrich, K., Redline, R. & Avril, S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch.* **470**, 125–142 (2017).
45. Soong, T. R., Dinulescu, D. M., Xian, W. & Crum, C. P. Frontiers in the Pathology and Pathogenesis of Ovarian Cancer: Cancer Precursors and “Precursor Escape”. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 32 915–928 (2018).
46. Ovarian Cancer SPORE — Gynecologic Disease Laboratory. <http://www.gynecologycancer.org/contact>.
47. Prat, J., D'Angelo, E. & Espinosa, I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. *Hum. Pathol.* **80**, 11–27 (2018).
48. Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. & Ledermann, J. A. Ovarian cancer. *Lancet* **384**, 1376–1388 (2014).
49. Dion, L. *et al.* The Landscape and Therapeutic Implications of Molecular Profiles in Epithelial Ovarian Cancer. *J. Clin. Med.* **9**, 2239 (2020).
50. Zeppernick, F. & Meinhold-Heerlein, I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* **290**, 839–842 (2014).
51. Daniilidis, A. & Karagiannis, V. Epithelial ovarian cancer. Risk factors, screening and the role of prophylactic oophorectomy. *Hippokratia* **11**, 63–66 (2007).
52. Toss, A. *et al.* Hereditary ovarian cancer: Not only BRCA 1 and 2 Genes. *BioMed Research International* (2015) doi:10.1155/2015/341723.
53. Andrews, L. & Mutch, D. G. Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* vol. 41 31–48

- (2017).
54. NAKAMURA, K. *et al.* Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Mol. Clin. Oncol.* (2014) doi:10.3892/mco.2014.397.
 55. Harris, H. R. & Terry, K. L. Polycystic ovary syndrome and risk of endometrial, ovarian, and breast cancer: a systematic review. *Fertil. Res. Pract.* **2**, (2016).
 56. Brilhante, A. V. M. *et al.* Endometriosis and ovarian cancer: An integrative review (endometriosis and ovarian cancer). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* vol. 18 11–16 (2017).
 57. Rasmussen, C. B. *et al.* Pelvic inflammatory disease and the risk of ovarian cancer and borderline ovarian tumors: A pooled analysis of 13 case-control studies. *American Journal of Epidemiology* vol. 185 8–20 (2017).
 58. Kvåle, G., Heuch, I., Nilssen, S. & Beral, V. Reproductive factors and risk of ovarian cancer: A prospective study. *Int. J. Cancer* **42**, 246–251 (1988).
 59. Rizzuto, I., Behrens, R. F. & Smith, L. A. Risk of ovarian cancer in women treated with ovarian stimulating drugs for infertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2013 (2013).
 60. Ness, R. B. *et al.* Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: A pooled analysis of case-control studies. *Am. J. Epidemiol.* **155**, 217–224 (2002).
 61. Van Leeuwen, F. E. *et al.* Risk of borderline and invasive ovarian tumours after ovarian stimulation for in vitro fertilization in a large Dutch cohort. *Hum. Reprod.* **26**, 3456–3465 (2011).
 62. Modugno, F. *et al.* Hormone response in ovarian cancer: Time to reconsider as a clinical target? *Endocrine-Related Cancer* vol. 19 (2012).
 63. Gharwan, H., Bunch, K. P. & Annunziata, C. M. The role of reproductive hormones in epithelial ovarian carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer* (2015) doi:10.1530/ERC-14-0550.
 64. Liu, Y. *et al.* Menopausal Hormone Replacement Therapy and the Risk of Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Endocrinology* vol. 10 (2019).
 65. Mizushima, T. & Miyamoto, H. The Role of Androgen Receptor Signaling in Ovarian Cancer. *Cells* **8**, 176 (2019).
 66. Chung, W. M. *et al.* Androgen/androgen receptor signaling in ovarian cancer: Molecular regulation and therapeutic potentials. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 67. Terry, K. L. *et al.* Incessant ovulation, mucin 1 immunity, and risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2007) doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0688.
 68. Purdie, D. M., Bain, C. J., Siskind, V., Webb, P. M. & Green, A. C. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **104**, 228–232 (2003).
 69. Koshiyama. The Effects of the Dietary and Nutrient Intake on Gynecologic Cancers. *Healthcare* **7**, 88 (2019).
 70. Crane, T. E., Khulpateea, B. R., Alberts, D. S., Basen-Engquist, K. & Thomson, C. A. Dietary intake and ovarian cancer risk: A systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* vol. 23 255–273 (2014).
 71. Cannioto, R. *et al.* Chronic recreational physical inactivity and epithelial ovarian

- cancer risk: Evidence from the ovarian cancer association consortium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **25**, 1114–1124 (2016).
72. Bae, H. S. *et al.* Obesity and epithelial ovarian cancer survival: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Ovarian Research* vol. 7 (2014).
73. Foong, K. W. & Bolton, H. Obesity and ovarian cancer risk: A systematic review. *Post Reproductive Health* vol. 23 183–198 (2017).
74. Genkinger, J. M. *et al.* Alcohol intake and ovarian cancer risk: A pooled analysis of 10 cohort studies. *Br. J. Cancer* **94**, 757–762 (2006).
75. Webb, P. M., Purdie, D. M., Bain, C. J. & Green, A. C. Alcohol, wine, and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2004).
76. Faber, M. T. *et al.* Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: A pooled analysis of 21 case-control studies. *Cancer Causes Control* **24**, 989–1004 (2013).
77. Calle, E. E. *et al.* Ovarian cancer and smoking: Individual participant meta-analysis including 28 114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* **13**, 946–956 (2012).
78. Peres, L. C. *et al.* Racial/ethnic differences in the epidemiology of ovarian cancer: A pooled analysis of 12 case-control studies. *Int. J. Epidemiol.* **47**, 460–472 (2018).
79. Li, D. P. *et al.* Breastfeeding and ovarian cancer risk: A systematic review and meta-analysis of 40 Epidemiological studies. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **15**, 4829–4837 (2014).
80. Iodice, S. *et al.* Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: A meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **46**, 2275–2284 (2010).
81. Moorman, P. G. *et al.* Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* **31**, 4188–4198 (2013).
82. Iversen, L. *et al.* Association between contemporary hormonal contraception and ovarian cancer in women of reproductive age in Denmark: Prospective, nationwide cohort study. *BMJ* **362**, (2018).
83. Webb, P. M. & Jordan, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **41**, 3–14 (2017).
84. Wu, N. Y. *et al.* Progesterone Prevents High-Grade Serous Ovarian Cancer by Inducing Necroptosis of p53-Defective Fallopian Tube Epithelial Cells. *Cell Rep.* **18**, 2557–2565 (2017).
85. Han, K. H., Kim, M.-K., Kim, H. S., Chung, H. H. & Song, Y. S. Protective Effect of Progesterone during Pregnancy against Ovarian Cancer. *J. Cancer Prev.* **18**, 113–122 (2013).
86. Barnard, M. E. *et al.* Association of Analgesic Use With Risk of Ovarian Cancer in the Nurses' Health Studies. *JAMA Oncol.* (2018) doi:10.1001/jamaoncol.2018.4149.
87. Baandrup, L., Kjaer, S. K., Olsen, J. H., Dehlendorff, C. & Friis, S. Low-dose aspirin use and the risk of ovarian cancer in Denmark. *Ann. Oncol.* **26**, 787–792 (2015).
88. L'Espérance, K., Datta, G. D., Qureshi, S. & Koushik, A. Vitamin D exposure and

- ovarian cancer risk and prognosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 17 (2020).
89. Cannioto, R. *et al.* Chronic recreational physical inactivity and epithelial ovarian cancer risk: Evidence from the ovarian cancer association consortium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2016) doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-1330.
 90. Ezzati, M. *et al.* Recent advancements in prognostic factors of epithelial ovarian carcinoma. *ISRN Obstet. Gynecol.* **2014**, (2014).
 91. Ghisoni, E., Imbimbo, M., Zimmermann, S. & Valabrega, G. Ovarian cancer immunotherapy: Turning up the heat. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–16 (2019).
 92. Wang, W., Liu, J. R. & Zou, W. Immunotherapy in Ovarian Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **28**, 447–464 (2019).
 93. Dexeus, S., Torrent, J. J., Dexeus, D., Pascual, M. A. & Surís, J. C. Factores de riesgo, pronóstico y screening en el carcinoma de ovario. *Progresos Obstet. y Ginecol.* **43**, 341–353 (2000).
 94. Orr, B. & Edwards, R. P. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **32**, 943–964 (2018).
 95. Doubeni, C. A., Doubeni, A. R. B. & Myers, A. E. Diagnosis and management of ovarian cancer. *Am. Fam. Physician* **93**, 937–944 (2016).
 96. Sundar, S., Neal, R. D. & Kehoe, S. Diagnosis of ovarian cancer. *BMJ* **351**, 1–7 (2015).
 97. Dong, A., Lu, Y. & Lu, B. Genomic/epigenomic alterations in ovarian carcinoma: Translational insight into clinical practice. *Journal of Cancer* vol. 7 1441–1451 (2016).
 98. Muñoz-Galván, S. & Carnero, A. Leveraging genomics, transcriptomics, and epigenomics to understand the biology and chemoresistance of ovarian cancer. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–16 (2021).
 99. Tafurt Cardona, Y. & Marin Morales, M. Principales Mecanismos De Reparación De Daños En La Molécula De Adn. *Biosalud* **13**, 95–110 (2014).
 100. Gee, M. E., Faraahi, Z., McCormick, A. & Edmondson, R. J. DNA damage repair in ovarian cancer: Unlocking the heterogeneity. *J. Ovarian Res.* **11**, 1–12 (2018).
 101. Kelley, M. R. & Fishel, M. L. *Overview of DNA repair pathways, current targets, and clinical trials bench to clinic. DNA Repair in Cancer Therapy: Molecular Targets and Clinical Applications: Second Edition* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-803582-5.00001-2.
 102. Zhang, Y., Cao, L., Nguyen, D. & Lu, H. TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl. Cancer Res.* **5**, 650–663 (2016).
 103. López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M. & Martínez de Pancorbo, M. P53, Un Gen Supresor Tumoral. *Gac. Médica Bilbao* **98**, 21–27 (2001).
 104. Zilfou, J. T. & Lowe, S. W. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 1 (2009).
 105. Qiao, B., Zhang, Z. & Li, Y. Association of MGMT promoter methylation with tumorigenesis features in patients with ovarian cancer: A systematic meta-analysis. *Mol. Genet. Genomic Med.* **6**, 69–76 (2018).

106. Ford, J. M. & Kastan, M. B. 11 - DNA Damage Response Pathways and Cancer. in *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)* (eds. Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Kastan, M. B., Doroshow, J. H. & Tepper, J. E.) 154-164.e4 (Content Repository Only!, 2020). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47674-4.00011-6>.
107. Ackerson, S. M., Romney, C., Schuck, P. L. & Stewart, J. A. To Join or Not to Join: Decision Points Along the Pathway to Double-Strand Break Repair vs. Chromosome End Protection. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 1830 (2021).
108. da Cunha Colombo Bonadio, R. R., Fogace, R. N., Miranda, V. C. & Diz, M. D. P. E. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: A review of its epidemiology and management. *Clinics* (2018) doi:10.6061/clinics/2018/e450s.
109. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.* **2**, 130–143 (2013).
110. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017 188 18**, 495–506 (2017).
111. Teeuwssen & Fodde. Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, EMT, and Therapy Resistance. *J. Clin. Med.* **8**, 1658 (2019).
112. Nguyen, V. H. L., Hough, R., Bernaudo, S. & Peng, C. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *J. Ovarian Res.* **12**, 1–17 (2019).
113. Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M. & Kohn, E. C. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer* **120**, 3446–3456 (2014).
114. Wong, K.-K., Gershenson, D. & Tsai, C.-C. BRAF mutational analysis in ovarian tumors: recent perspectives. *Pathol. Lab. Med. Int.* **75** (2015) doi:10.2147/plmi.s64383.
115. Cheaib, B., Auguste, A. & Leary, A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: Therapeutic opportunities and challenges. *Chin. J. Cancer* **34**, 4–16 (2015).
116. Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H. & Samarakoon, S. R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin. Cancer Biol.* **59**, 147–160 (2019).
117. Bonello, M., Sims, A. H. & Langdon, S. P. Human epidermal growth factor receptor targeted inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cancer Biol. Med.* **15**, 375–388 (2018).
118. Cao, W., Li, J., Yang, K. & Cao, D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull. Cancer* **108**, 304–322 (2021).
119. Zhan, L. *et al.* Autophagy as an emerging therapy target for ovarian carcinoma. *Oncotarget* **7**, 83476–83487 (2016).
120. Pyo, J. O., Nah, J. & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* **44**, 73–80 (2012).
121. Yoshida, G. J. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 67 (2017).
122. Kenney, D. L. & Benarroch, E. E. The autophagy-lysosomal pathway: General

- concepts and clinical implications. *Neurology* **85**, 634–645 (2015).
123. Ryter, S. W., Cloonan, S. M. & Choi, A. M. K. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol. Cells* **36**, 7–16 (2013).
 124. Chang, N. C. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal . *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8 138 (2020).
 125. Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A. & Isaka, Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res.* **73**, 3–7 (2013).
 126. Peracchio, C., Alabiso, O., Valente, G. & Isidoro, C. Involvement of autophagy in ovarian cancer: a working hypothesis. *J. Ovarian Res.* **5**, (2012).
 127. Moufarrij, S. *et al.* Epigenetic therapy for ovarian cancer: Promise and progress. *Clin. Epigenetics* **11**, 1–11 (2019).
 128. Smith, H. J., Straughn, J. M., Buchsbaum, D. J. & Arend, R. C. Epigenetic therapy for the treatment of epithelial ovarian cancer: A clinical review. *Gynecol. Oncol. Reports* **20**, 81–86 (2017).
 129. Yang, Q. *et al.* Epigenetics in ovarian cancer: Premise, properties, and perspectives. *Mol. Cancer* **17**, (2018).
 130. Samartzis, E. P., Noske, A., Dedes, K. J., Fink, D. & Imesch, P. ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18824–18849 (2013).
 131. De, P. & Dey, N. Mutation-driven signals of ARID1A and PI3K pathways in ovarian carcinomas: Alteration is an opportunity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–16 (2019).
 132. Kim, A., Ueda, Y., Naka, T. & Enomoto, T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 14 (2012).
 133. Song, M., Cui, M. & Liu, K. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **232**, 114205 (2022).
 134. Mollinedo, F. & Gajate, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **8**, 413–450 (2003).
 135. Orr, G. A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H. & Horwitz, S. B. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003 2247 **22**, 7280–7295 (2003).
 136. Giornelli, G. H. Management of relapsed ovarian cancer: a review. *Springerplus* **5**, (2016).
 137. Van Zyl, B., Tang, D. & Bowden, N. A. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: What can we use to improve treatment. *Endocr. Relat. Cancer* **25**, R303–R318 (2018).
 138. Freimund, A. E., Beach, J. A., Christie, E. L. & Bowtell, D. D. L. Mechanisms of Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **32**, 983–996 (2018).
 139. Arend, R. C., Jackson-Fisher, A., Jacobs, I. A., Chou, J. & Monk, B. J. Ovarian cancer: new strategies and emerging targets for the treatment of patients with advanced disease. *Cancer Biol. Ther.* **22**, 89–105 (2021).
 140. Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A. & Lisowska, K. M. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 17–38 (2018).
 141. Markowska, A., Sajdak, S., Markowska, J. & Huczyński, A. Angiogenesis and

- cancer stem cells: New perspectives on therapy of ovarian cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **142**, 87–94 (2017).
142. Zheng, F. *et al.* Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 123 (2020).
 143. Patel, M., Nowsheen, S., Maraboyina, S. & Xia, F. The role of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of cancer and methods to overcome resistance: a review. *Cell Biosci.* **10**, 1–12 (2020).
 144. Wong-Brown, M. W., van der Westhuizen, A. & Bowden, N. A. Targeting DNA Repair in Ovarian Cancer Treatment Resistance. *Clin. Oncol.* **32**, 518–526 (2020).
 145. Lee, J. M., Minasian, L. & Kohn, E. C. New strategies in ovarian cancer treatment. *Cancer* vol. 125 (2019).
 146. Katopodis, P. *et al.* Kinase inhibitors and ovarian cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–17 (2019).
 147. Cheung, A. *et al.* Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget* vol. 7 52553–52574 (2016).
 148. Ghoneum, A. & Said, N. PI3K-AKT-mTOR and NFkB pathways in ovarian cancer: Implications for targeted therapeutics. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 149. Konecny, G. E. *et al.* Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer* (2009) doi:10.1038/sj.bjc.6605381.
 150. Świdorska, J., Kozłowski, M., Kwiatkowski, S. & Cymbaluk-Płoska, A. Immunotherapy of ovarian cancer with particular emphasis on the PD-1/PDL-1 as target points. *Cancers* vol. 13 (2021).
 151. Mokhtari, R. B. *et al.* Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **8**, 38022–38043 (2017).
 152. Greco, W. R., Faessel, H. & Levasseur, L. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers? *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 699–700 (1996).
 153. Hontecillas-Prieto, L. *et al.* Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Front. Genet.* **11**, 1113 (2020).
 154. Verbaanderd, C. *et al.* Repurposing drugs in oncology (ReDO) - Chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancermedicalscience* **11**, (2017).
 155. González, M. *et al.* Microtubule Destabilizing Sulfonamides as An Alternative to Taxane-Based Chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1907 (2021).
 156. Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research* vol. 70 440–446 (2010).
 157. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 1765–1771 (2008).
 158. Herrero, A. B. & Gutiérrez, N. C. Targeting ongoing DNA damage in multiple myeloma: Effects of DNA damage response inhibitors on plasma cell survival. *Front. Oncol.* **7**, 98 (2017).
 159. López-Iglesias, A. A. *et al.* Preclinical anti-myeloma activity of EDO-S101, a new

- bendamustine-derived molecule with added HDACi activity, through potent DNA damage induction and impairment of DNA repair. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 1–14 (2017).
160. Chicaybam, L. *et al.* An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **4**, (2017).
 161. Herrero, A. B., SanMiguel, J. & Gutierrez, N. C. Deregulation of DNA double-strand break repair in multiple myeloma: Implications for genome stability. *PLoS One* **10**, (2015).
 162. The jamovi project (2021). jamovi (Version 2.2) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.
 163. Eckschlager, T., Pich, J., Stiborova, M. & Hrabeta, J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
 164. Kim, T. Y., Bang, Y. J. & Robertson, K. D. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics* **1**, 15–24 (2006).
 165. Newbold, A., Falkenberg, K. J., Prince, H. M. & Johnstone, R. W. How do tumor cells respond to HDAC inhibition? *FEBS J.* **283**, 4032–4046 (2016).
 166. Bolden, J. E., Peart, M. J. & Johnstone, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 769–784 (2006).
 167. Wilson, A. J. *et al.* Panobinostat sensitizes cyclin E high, homologous recombination-proficient ovarian cancer to olaparib. *Gynecol. Oncol.* **143**, 143–151 (2016).
 168. Adimoolam, S. *et al.* HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19482–19487 (2007).
 169. Thurn, K. T., Thomas, S., Raha, P., Qureshi, I. & Munster, P. N. Histone deacetylase regulation of ATM-mediated DNA damage signaling. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 2078–2087 (2013).
 170. Bishop, E. & Bradshaw, T. D. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **82**, 913–922 (2018).
 171. Carew, J. S. *et al.* Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* **110**, 313–322 (2007).
 172. Carew, J. S. *et al.* Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2448–2459 (2010).
 173. Rao, R. *et al.* Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 973–983 (2012).
 174. Gao, L. *et al.* Histone deacetylase inhibitor trichostatin a and autophagy inhibitor chloroquine synergistically exert anti-tumor activity in H-ras transformed breast epithelial cells. *Mol. Med. Rep.* **17**, 4345–4350 (2018).
 175. Kommalapati, V. K., Kumar, D. & Tangutur, A. D. Inhibition of JNJ-26481585-mediated autophagy induces apoptosis via ROS activation and mitochondrial membrane potential disruption in neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **468**, 21–34 (2020).

176. Torgersen, M. L., Engedal, N., Bøe, S. O., Hokland, P. & Simonsen, A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* **122**, 2467–2476 (2013).
177. Al-Bari, A. A. Chloroquine analogues in drug discovery: New directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 1608–1621 (2014).
178. Mauthe, M. *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455 (2018).
179. Maycotte, P. *et al.* Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* **8**, (2012).
180. Eng, C. H. *et al.* Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 182–187 (2016).
181. Ovejero-Sánchez, M., González-Sarmiento, R. & Herrero, A. B. Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. *Neoplasia* **23**, 515–528 (2021).
182. Gammoh, N. *et al.* Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6561–6565 (2012).
183. Liu, Y. L. *et al.* Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* **6**, 1057–1065 (2010).
184. Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A. & Jiang, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 18030–18035 (2004).
185. Chiu, H. W. *et al.* A new histone deacetylase inhibitor enhances radiation sensitivity through the induction of misfolded protein aggregation and autophagy in triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
186. Carew, J. S. *et al.* Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. **14**, 2448–2459 (2010).
187. Qu, X. *et al.* Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS. *PLoS One* **12**, (2017).
188. Ganguli, A., Choudhury, D., Datta, S., Bhattacharya, S. & Chakrabarti, G. Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis. *Biochimie* **107**, 338–349 (2014).
189. Rosato, R. R. *et al.* Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3285–3297 (2008).
190. Ruefli, A. A. *et al.* The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10833–10838 (2001).
191. Park, D. & Lee, Y. Biphasic Activity of Chloroquine in Human Colorectal Cancer Cells. *Dev. Reprod.* **18**, 225–231 (2014).

192. Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R. & Boyer-Guittaut, M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* **4**, 184–192 (2015).
193. Pare, J. *et al.* Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia* **47**, 9–20 (2004).
194. Scott, S. P. & Pandita, T. K. The cellular control of DNA double-strand breaks. *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 99 1463–1475 (2006).
195. Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* vol. 25 101084 (2019).
196. de Andrade, P. V. *et al.* The histone deacetylase inhibitor PCI-24781 as a putative radiosensitizer in pediatric glioblastoma cell lines. *Cancer Cell Int.* **16**, 31 (2016).
197. Lai, T. H. *et al.* HDAC Inhibition Induces MicroRNA-182, which Targets RAD51 and Impairs HR repair to sensitize cells to sapacitabine in acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3537–3549 (2016).
198. Kachhap, S. K. *et al.* Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One* **5**, (2010).
199. Wilson, A. J. *et al.* Panobinostat enhances olaparib efficacy by modifying expression of homologous recombination repair and immune transcripts in ovarian cancer. *Neoplasia (United States)* **24**, 63–75 (2022).
200. Peterson, S. E. *et al.* Activation of DSB Processing Requires Phosphorylation of CtIP by ATR. *Mol. Cell* **49**, 657–667 (2013).
201. Awasthi, P., Foiani, M. & Kumar, A. ATM and ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **128**, 4255–4262 (2015).
202. Blackford, A. N. & Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **66**, 801–817 (2017).
203. Yamamoto, S. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines. *Anticancer Res.* (2008).
204. Enzenmüller, S., Gonzalez, P., Debatin, K. M. & Fulda, S. Chloroquine overcomes resistance of lung carcinoma cells to the dual PI3K/mTOR inhibitor PI103 by lysosome-mediated apoptosis. *Anticancer. Drugs* **24**, 14–19 (2013).
205. Shukla, A. M. & Shukla, A. W. Expanding horizons for clinical applications of chloroquine, hydroxychloroquine, and related structural analogues. *Drugs Context* **8**, (2019).
206. Hu, T. *et al.* Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **35**, 43–49 (2016).
207. Farombi, E. O. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: Protective role of free radical scavengers. *Cell Biol. Toxicol.* **22**, 159–167 (2006).
208. Pei, X. Y., Dai, Y. & Grant, S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3839–3852 (2004).
209. Rosato, R. R., Almenara, J. A. & Grant, S. The histone deacetylase inhibitor MS-

- 275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1. *Cancer Res.* **63**, 3637–3645 (2003).
210. Lodovichi, S., Cervelli, T., Pellicoli, A. & Galli, A. Inhibition of DNA repair in cancer therapy: Toward a multi-target approach. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–29 (2020).
211. Li, L. Y., Guan, Y. Di, Chen, X. S., Yang, J. M. & Cheng, Y. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Front. Pharmacol.* **11**, 2520 (2021).
212. Li, Y. & Yang, D. Q. The ATM inhibitor KU-55933 suppresses cell proliferation and induces apoptosis by blocking Akt in cancer cells with overactivated Akt. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 113–125 (2010).
213. Harris, B. R. E. *et al.* ATM inhibitor KU-55933 induces apoptosis and inhibits motility by blocking GLUT1-mediated glucose uptake in aggressive cancer cells with sustained activation of Akt. *FASEB J.* **35**, 1–23 (2021).
214. Shaheen, F. S. *et al.* Targeting the dna double strand break repair machinery in prostate cancer. *PLoS One* **6**, e20311 (2011).
215. Moolmuang, B. & Ruchirawat, M. The antiproliferative effects of ataxia-telangiectasia mutated and ATM- And Rad3-related inhibitions and their enhancements with the cytotoxicity of DNA damaging agents in cholangiocarcinoma cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **73**, 40–51 (2021).
216. Vávrová, J. *et al.* Inhibition of ATR kinase with the selective inhibitor VE-821 results in radiosensitization of cells of promyelocytic leukaemia (HL-60). *Radiat. Environ. Biophys.* **52**, 471–479 (2013).
217. Tian, X. *et al.* Improving DNA double-strand repair inhibitor KU55933 therapeutic index in cancer radiotherapy using nanoparticle drug delivery. *Nanoscale* **7**, 20211–20219 (2015).
218. Teng, P. N. *et al.* Pharmacologic inhibition of ATR and ATM offers clinically important distinctions to enhancing platinum or radiation response in ovarian, endometrial, and cervical cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **136**, 554–561 (2015).
219. Prevo, R. *et al.* The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1072–1081 (2012).
220. Jossé, R. *et al.* ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* **74**, 6968–6978 (2014).
221. Salovska, B. *et al.* Radio-sensitizing effects of VE-821 and beyond: Distinct phosphoproteomic and metabolomic changes after ATR inhibition in irradiated MOLT-4 cells. *PLoS ONE* vol. 13 (2018).
222. Abu-Sanad, A. *et al.* Simultaneous inhibition of ATR and PARP sensitizes colon cancer cell lines to irinotecan. *Front. Pharmacol.* **6**, (2015).
223. Southgate, H. E. D., Chen, L., Tweddle, D. A. & Curtin, N. J. ATR Inhibition Potentiates PARP Inhibitor Cytotoxicity in High Risk Neuroblastoma Cell Lines by Multiple Mechanisms. *Cancers 2020, Vol. 12, Page 1095* **12**, 1095 (2020).
224. Feng, W. *et al.* ATR and p-ATR are emerging prognostic biomarkers and DNA damage response targets in ovarian cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **12**, 1–18 (2020).

225. Huntoon, C. J. *et al.* ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res.* **73**, 3683–3691 (2013).
226. Lima, M. *et al.* Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. *Oncotarget* **7**, 25885–25901 (2016).
227. Wang, G. *et al.* Panobinostat Synergistically Enhances the Cytotoxic Effects of Cisplatin, Doxorubicin or Etoposide on High-Risk Neuroblastoma Cells. *PLoS One* **8**, (2013).
228. Moita, A. J. R. *et al.* Priming with hdac inhibitors sensitizes ovarian cancer cells to treatment with cisplatin and hsp90 inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–22 (2020).
229. Helland, Ø. *et al.* The HDACi panobinostat shows growth inhibition both in vitro and in a bioluminescent orthotopic surgical xenograft model of ovarian cancer. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
230. Wang, L. *et al.* Pan-HDAC inhibition by panobinostat mediates chemosensitization to carboplatin in non-small cell lung cancer via attenuation of EGFR signaling. *Cancer Lett.* **417**, 152–160 (2018).
231. Ha, K. *et al.* Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* **5**, 5637–5650 (2014).
232. Bandolik, J. J., Hamacher, A., Schrenk, C., Weishaupt, R. & Kassack, M. U. Class i-histone deacetylase (Hdac) inhibition is superior to pan-hdac inhibition in modulating cisplatin potency in high grade serous ovarian cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
233. Ma, Y. Y. *et al.* Low-dose LBH589 increases the sensitivity of cisplatin to cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **50**, 165–171 (2011).
234. Robert, C. *et al.* Histone deacetylase inhibitors decrease NHEJ both by acetylation of repair factors and trapping of PARP1 at DNA double-strand breaks in chromatin. *Leuk. Res.* **45**, 14 (2016).
235. Smith, S. *et al.* Histone Deacetylase Inhibitors Selectively Target Homology Dependent DNA Repair Defective Cells and Elevate Non-Homologous Endjoining Activity. *PLoS One* **9**, e87203 (2014).
236. Munshi, A. *et al.* Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4912–4922 (2005).
237. Munshi, A. *et al.* Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1967–1974 (2006).
238. Zhang, F. *et al.* Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 823–831 (2009).
239. Ciszewski, W. M., Tavecchio, M., Dastyh, J. & Curtin, N. J. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. *Breast Cancer Res. Treat.* **143**, 47–55 (2014).
240. Alikarami, F., Safa, M., Faranoush, M., Hayat, P. & Kazemi, A. Inhibition of DNA-PK enhances chemosensitivity of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells to doxorubicin. *Biomed. Pharmacother.* **94**, 1077–1093 (2017).

241. Tichý, A. *et al.* Radio-sensitization of human leukaemic molt-4 cells by DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026. *Acta Medica (Hradec Kral.* **55**, 66–73 (2012).
242. Draz, H. *et al.* Autophagy inhibition improves the chemotherapeutic efficacy of cruciferous vegetable-derived diindolymethane in a murine prostate cancer xenograft model. *Invest. New Drugs* **36**, 718–725 (2018).
243. Wang, F. *et al.* Chloroquine Enhances the Radiosensitivity of Bladder Cancer Cells by Inhibiting Autophagy and Activating Apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 54–66 (2018).
244. Ye, H. *et al.* Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurol.* **16**, (2016).
245. Sehgal, A. R. *et al.* You eat what you are: autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia. *Leukemia* **29**, 517–525 (2015).
246. Baker, N. C., Ekins, S., Williams, A. J. & Tropsha, A. A bibliometric review of drug repurposing. *Drug Discovery Today* vol. 23 661–672 (2018).
247. Varisli, L., Cen, O. & Vlahopoulos, S. Dissecting pharmacological effects of chloroquine in cancer treatment: interference with inflammatory signaling pathways. *Immunology* **159**, 257–278 (2020).
248. Xu, R., Ji, Z., Xu, C. & Zhu, J. The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* **97**, (2018).
249. Maes, H. *et al.* Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell* **26**, 190–206 (2014).
250. Shao, M. *et al.* Encapsulation of chloroquine and doxorubicin by MPEG-PLA to enhance anticancer effects by lysosomes inhibition in ovarian cancer. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 8231–8245 (2018).
251. Choi, D. S. *et al.* Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells* **32**, 2309–2323 (2014).
252. Chen, D. *et al.* Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
253. Liang, D. H. *et al.* The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair. *Cancer Lett.* **376**, 249–258 (2016).
254. Liou, G. Y. & Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**, 479–496 (2010).
255. Srivastava, M. & Raghavan, S. C. DNA Double-Strand Break Repair Inhibitors as Cancer Therapeutics. *Chem. Biol.* **22**, 17–29 (2015).
256. Slupphaug, G., Kavli, B. & Krokan, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* **531**, 231–251 (2003).
257. Willmore, E. *et al.* A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* **103**, 4659–4665 (2004).
258. Davidson, D. *et al.* Irinotecan and DNA-PKcs inhibitors synergize in killing of colon

- cancer cells. *Invest. New Drugs* **30**, 1248–1256 (2012).
259. Veuger, S. J., Curtin, N. J., Richardson, C. J., Smith, G. C. M. & Durkacz, B. W. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res.* **63**, 6008–6015 (2003).
260. Lee, T. W. *et al.* Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma lines by DNA-PK inhibitors is more effective than PARP-1 inhibition and is enhanced by SLFN11 and hypoxia. *Int. J. Radiat. Biol.* **95**, 1597–1612 (2019).
261. Zhao, Y. *et al.* Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res.* **66**, 5354–5362 (2006).
262. Medová, M. *et al.* DNA-PK in human malignant disorders: Mechanisms and implications for pharmacological interventions. *Pharmacol. Ther.* **215**, 107617 (2020).
263. Gordhandas, S. B. *et al.* Pre-clinical activity of the oral DNA-PK inhibitor, peposertib (M3814), combined with radiation in xenograft models of cervical cancer. *Sci. Rep.* **12**, (2022).
264. Wise, H. C. *et al.* Activity of M3814, an Oral DNA-PK Inhibitor, In Combination with Topoisomerase II Inhibitors in Ovarian Cancer Models. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
265. Srivastava, M. *et al.* An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell* **151**, 1474–1487 (2012).
266. Chen, L. X. *et al.* Preparation, characterization, in vitro and in vivo anti-tumor effect of thalidomide nanoparticles on lung cancer. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 2463–2476 (2018).
267. Belhadj, Z. *et al.* Multifunctional targeted liposomal drug delivery for efficient glioblastoma treatment. *Oncotarget* **8**, 66889–66900 (2017).
268. Nekooki-Machida, Y. & Hagiwara, H. Role of tubulin acetylation in cellular functions and diseases. *Med. Mol. Morphol.* **53**, 191–197 (2020).
269. Hamada, H., Ishihara, K., Masuoka, N., Mikuni, K. & Nakajima, N. Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 369–371 (2006).
270. Yang, T. *et al.* Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. *Drug Deliv.* **14**, 301–308 (2007).
271. Ten Tije, A. J., Verweij, J., Loos, W. J. & Sparreboom, A. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 665–685 (2003).
272. Das, T. *et al.* Therapeutic strategies to overcome taxane resistance in cancer. *Drug Resist. Updat.* **55**, 100754 (2021).
273. Tymon-Rosario, J., Adjei, N. N., Roque, D. M. & Santin, A. D. Microtubule-interfering drugs: Current and future roles in epithelial ovarian cancer treatment. *Cancers* vol. 13 6239 (2021).
274. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 194–204 (2010).
275. Yusuf, R., Duan, Z., Lamendola, D., Penson, R. & Seiden, M. Paclitaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Pharmacologic Manipulation. *Curr.*

- Cancer Drug Targets* **3**, 1–19 (2005).
276. Ji, Y.-T., Liu, Y.-N. & Liu, Z.-P. Tubulin colchicine binding site inhibitors as vascular disrupting agents in clinical developments. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1348–1360 (2015).
277. Tron, G. C. *et al.* Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *J. Med. Chem.* **49**, 3033–3044 (2006).
278. ABT-751. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=abt-751&cntry=&state=&city=&dist=>.
279. Zhang, Y. *et al.* HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* **22**, 1168 (2003).
280. Zuco, V. *et al.* Synergistic antitumor effects of novel HDAC inhibitors and paclitaxel in vitro and in vivo. *PLoS One* **6**, (2011).
281. Dowdy, S. C. *et al.* Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2767–2776 (2006).
282. Chao, M. W. *et al.* The synergic effect of vincristine and vorinostat in leukemia in vitro and in vivo. *J. Hematol. Oncol.* **8**, (2015).
283. Dietrich, C. S. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) potentiates paclitaxel-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* **116**, 126–130 (2010).
284. Liu, Z. *et al.* Effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with paclitaxel (PTX) on paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and insights into the underlying mechanisms. *Cancer Cell Int.* **14**, (2014).
285. Cooper, A. L. *et al.* In vitro and in vivo histone deacetylase inhibitor therapy with suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and paclitaxel in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **104**, 596–601 (2007).
286. Mourad, A. A. E., Mourad, M. A. E. & Jones, P. G. Novel HDAC/Tubulin Dual Inhibitor: Design, Synthesis and Docking Studies of α -Phthalimido-Chalcone Hybrids as Potential Anticancer Agents with Apoptosis-Inducing Activity. *Drug Des. Devel. Ther.* **14**, 3111 (2020).
287. Wang, Y. *et al.* Discovery of novel tubulin/HDAC dual-targeting inhibitors with strong antitumor and antiangiogenic potency. *Eur. J. Med. Chem.* **225**, 113790 (2021).
288. Wang, B. *et al.* Anti-tumor activity evaluation of novel tubulin and HDAC dual-targeting inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 2638–2645 (2019).
289. Peng, X. *et al.* Efficient Synthesis and Bioevaluation of Novel Dual Tubulin/Histone Deacetylase 3 Inhibitors as Potential Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **64**, 8447–8473 (2021).
290. Hei Antonio Cheung, C. *et al.* A Novel Dual HDAC6 and Tubulin Inhibitor, MPT0B451, Displays Anti-tumor Ability in Human Cancer Cells in Vitro and in Vivo. (2018) doi:10.3389/fphar.2018.00205.
291. Lamaa, D. *et al.* Design and Synthesis of Tubulin and Histone Deacetylase Inhibitor Based on iso-Combretastatin A-4. *J. Med. Chem.* **61**, 6574–6591 (2018).
292. Eshun-Wilson, L. *et al.* Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure

- and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 10366–10371 (2019).
293. Lee, J. K. *et al.* Oncogenic microtubule hyperacetylation through BEX4-mediated sirtuin 2 inhibition. *Cell Death Dis.* **7**, e2336–e2336 (2016).
294. Wang, Q. & Liu, X. VDAC upregulation and α TAT1-mediated α -tubulin acetylation contribute to tanespimycin-induced apoptosis in Calu-1 cells. *Oncol. Rep.* **44**, 2725–2734 (2020).
295. Wang, Q. & Liu, X. The dual functions of α -tubulin acetylation in cellular apoptosis and autophagy induced by tanespimycin in lung cancer cells. *Cancer Cell Int.* **20**, (2020).
296. Kuroki, L. & Guntupalli, S. R. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ* **371**, 1–20 (2020).
297. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. & Miller, D. D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm. Res.* **29**, 2943 (2012).
298. McLoughlin, E. C. & O'boyle, N. M. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review. *Pharmaceuticals* **13**, (2020).
299. Yang, J. *et al.* The compound millepachine and its derivatives inhibit tubulin polymerization by irreversibly binding to the colchicine-binding site in β -tubulin. *J. Biol. Chem.* **293**, 9461–9472 (2018).
300. Liu, W. *et al.* Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg. Chem.* **118**, 105486 (2022).
301. González, M. *et al.* Methoxy and bromo scans on N-(5-methoxyphenyl) methoxybenzenesulphonamides reveal potent cytotoxic compounds, especially against the human breast adenocarcinoma MCF7 cell line. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **36**, 1029–1047 (2021).
302. Meany, H. J. *et al.* Clinical Outcome in Children with Recurrent Neuroblastoma Treated with ABT-751 and Effect of ABT-751 on Proliferation of Neuroblastoma Cell Lines and on Tubulin Polymerization In Vitro. *Pediatr. Blood Cancer* **54**, 47 (2010).
303. Kim, S. K. *et al.* The colchicine derivative CT20126 shows a novel microtubule-modulating activity with apoptosis. *Exp. Mol. Med.* **45**, e19 (2013).

ANEXOS



Original Research

Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair ^{☆, ☆☆}

María Ovejero-Sánchez ^{a,b,c};
Rogelio González-Sarmiento ^{a,b,c,*};
Ana Belén Herrero ^{a,b,c,*}

^aInstitute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

^bMolecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

^cInstitute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (IBMCC), University of Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the deadliest gynecologic malignancy, which is mainly due to late-stage diagnosis and chemotherapy resistance. Therefore, new and more effective treatments are urgently needed. The *in vitro* effects of Panobinostat (LBH), a histone deacetylase inhibitor that exerts pleiotropic antitumor effects but induces autophagy, in combination with Chloroquine (CQ), an autophagy inhibitor that avoid this cell survival mechanism, were evaluated in 4 OC cell lines. LBH and CQ inhibited ovarian cancer cell proliferation and induced apoptosis, and a strong synergistic effect was observed when combined. Deeping into their mechanisms of action we show that, in addition to autophagy modulation, treatment with CQ increased reactive oxygen species (ROS) causing DNA double strand breaks (DSBs), whereas LBH inhibited their repair by avoiding the correct recruitment of the recombinase Rad51 to DSBs. Interestingly, CQ-induced DSBs and cell death caused by CQ/LBH combination were largely abolished by the ROS scavenger N-Acetylcysteine, revealing the critical role of DSB generation in CQ/LBH-induced lethality. This role was also manifested by the synergy found when we combined CQ with Mirin, a well-known homologous recombination repair inhibitor. Altogether, our results provide a rationale for the clinical investigation of CQ/LBH combination in ovarian cancer.

Neoplasia (2021) 23, 515–528

Keywords: Chloroquine, Panobinostat, autophagy, ROS, DNA damage and repair, homologous recombination

Introduction

Ovarian cancer (OC) is one of the most common gynecologic malignancies and it has the highest mortality rate among them, nearly 185 000 annual deaths worldwide [1]. This high mortality is mainly due to the

asymptomatic growth of the tumor that results in its diagnosis in advanced stages [2]. In addition, relapse of disease is common after surgery and standard platinum-based chemotherapy [3,4], and also after further treatments with different chemotherapeutic agents [5]. Therefore, there is a clear need to develop new therapeutic strategies. One of these strategies should be efficient drug combinations that could overcome resistances and improve ovarian cancer survival.

Histone deacetylase inhibitors (HDACi) represent promising agents in cancer treatment [6]. The first of these compounds approved by the FDA was SAHA in 2006 for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, followed by Romidepsin in 2009, Belinostat in 2014 and Panobinostat (LBH) in 2015 for the treatment of different hematological malignancies [7]. Many others HDACi are currently in clinical trials for the treatment of several cancers. All these molecules inhibit HDACs, critical regulators of gene expression that deacetylate different histones acting as transcriptional repressors [8]. The inhibition of HDACs promotes transcriptional activation of multiple genes that are silenced in human tumors [9]. Moreover, HDACi have been shown to exert pleiotropic antitumor effects; they induce the expression of proapoptotic genes, cause cellular differentiation and/or cell cycle arrest

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gonzalez@usal.es (R. González-Sarmiento), anah@usal.es (A.B. Herrero).

* Abbreviations: CQ, Chloroquine; DSB, double strand breaks; HDACi, histone deacetylase inhibitors; OC, ovarian cancer; LBH, Panobinostat; ROS, reactive oxygen species.

** Declaration of competing interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Received 17 February 2021; received in revised form 8 April 2021; accepted 10 April 2021

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.04.003>

[6,10,11] and impair DNA repair [12–16]. HDACi also promote autophagy, but this effect instead of exerting antitumor effects has been proposed as a potential mechanism of resistance to these drugs; autophagy might recycle proteins to generate energy in an attempt to survive stressful conditions generated by the treatment [17]. This is the reason why some researchers have analyzed the effect of the combination of HDACi and other proautophagy drugs with autophagy inhibitors, such as Chloroquine (CQ), and have found synergistic effects in some tumor cell lines, such as breast, colon, leukemic and neuroblastoma cell lines [18–23].

CQ was originally discovered and used to treat malaria, and subsequently it was used as an anti-inflammatory agent to treat inflammatory diseases [24]. CQ is a weak base and therefore it can raise the pH of cellular compartments. This led to the assumption that CQ blocks the autophagic flux by increasing the lysosomal pH, which promotes the inhibition of resident hydrolases. However, a recent report has shown that CQ mainly inhibits autophagy by impairing autophagosome fusion with lysosomes rather than by affecting the acidity of this organelle [25]. Some clinical trials have shown that CQ enhance the potential of combinatorial anticancer therapies by increasing tumor cell death [26], although it remains unclear whether this is really due to autophagy inhibition [27,28]. In fact, it has recently been suggested that the ability of CQ to inhibit autophagy by blocking autophagolysosome formation may not be the only mechanism by which it exerts antitumor effect [27,29].

In this study, we analyzed the effect of one HDACi, LBH, and of CQ and their combination in ovarian cancer cells. We show that CQ increases reactive oxygen species (ROS) which causes DNA double strand breaks (DSBs), whereas LBH inhibits the repair of these lethal lesions by affecting the recruitment of the recombinase Rad51 to DSBs (graphical abstract). These results provide an explanation, together with the modulation of autophagy, for the strong synergistic effect that we observed in ovarian cancer cell lines treated with a combination of these drugs.

Materials and methods

Cell lines and culture conditions

The ovarian cancer cell lines (OCCLs) IGROV-1, OVCAR-8, SK-OV-3 and A2780 were acquired from American Type Culture Collection (ATCC) (OVCAR-8, SK-OV-3), European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (A2780) and Merck Millipore (IGROV-1). Multiple myeloma cell line JLN3-HR was previously constructed in our group [12]. IGROV-1, A2780 and JLN3-HR were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). SK-OV-3 and OVCAR-8 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. All cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The presence of mycoplasma was routinely checked with MycoAlert kit (Lonza) and only mycoplasma-free cells were used in the experiments.

Reagents

Chloroquine (CQ) and N-Acetylcysteine (NAC) were purchased from Sigma-Aldrich, Mirin and Bafilomycin A1 (Baf) were obtained from MedChemExpress, and Panobinostat (LBH) was provided by Novartis Pharmaceuticals.

Cell proliferation assay

OCCLs were seeded into 96-well plates (4×10^3 cells/mL) and were treated with different concentrations of Chloroquine (10, 25, 50, 75, 100 and 125 μ M) or Panobinostat (10, 25, 50, 75, 100 and 150 nM) for 24, 48 or

72 h. Cell proliferation was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich). MTT was dissolved in PBS (5 mg/mL) and 10 μ L of this salt per well was added to cells. After 1 h of incubation, medium was aspirated, and formazan crystals were dissolved in DMSO (100 μ L/well). Absorbance was measured at 570 nm in a plate reader (Ultra Evolution, Tecan). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated using GraphPad Prism 8.

Cell cycle analysis

OCCLs were treated with Panobinostat or Chloroquine, fixed in 70% ethanol and stored at 4 °C for later use. Cells were rehydrated with PBS, stained with 50 μ g/mL propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich) and treated overnight with 100 μ g/mL RNase A in the dark (Sigma-Aldrich). Cell cycle profiles were then analyzed by flow cytometry using BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed with BD Accuri C6 Software.

Apoptosis assay

OCCLs were treated with Chloroquine, NAC and/or Panobinostat, Bafilomycin A1 and/or Panobinostat, and Mirin and/or Chloroquine, for 72 h and then stained with FITC Apoptosis Detection Kit CE (Immunostep) according to the manufacturer's guidelines. Apoptotic cells were determined using BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer. The synergism of the combination was quantified using Compusyn Software (ComboSyn, Inc) which is based on the Chou-Talalay method [58] and calculates a combination index (CI) with the following interpretation: CI > 1: antagonistic effect; CI = 1: additive effect; CI < 1 synergistic effect.

Western blot

Cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis), and protein concentration was measured using the Bradford assay (BioRad). Protein samples (50 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). After blocking, membranes were incubated with antibodies against the following proteins: LC3B (1:1000, NB600-1384, Novus Biologicals), Beclin-1 (1:1000, 3738S, Cell signaling), p62 (1:1000, ab109012, abcam) and β -actin (1:10000, Sigma-Aldrich). β -actin was used for loading control. Horseradish peroxidase linked-sheep (antimouse) (NXA931, GE Healthcare) or -goat (antirabbit) (AP307P, Millipore) were used as secondary antibodies at a 1:10000 dilution. Immunoblots were incubated for 1h at room temperature and developed using enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (Thermo Fisher Scientific). Protein expression levels were calculated using ImageJ software.

Detection of reactive oxygen species (ROS) generation

The production of intracellular ROS was determined by DCFH-DA staining using flow cytometry. For short times, OCCLs were seeded at 250,000 cells/well in 6-well plates, incubated for 24 h and then stained with 5 μ M DCFH-DA (Sigma-Aldrich) in serum-free medium for 30 min in darkness. After this incubation, performed at 37°C in 5% CO₂, cells were treated with different concentrations of Chloroquine (25, 50 μ M), Panobinostat (25, 50 nM) or NAC (15 mM) for 15 min. For long times, OCCLs were seeded at 250,000 cells/well, incubated for 24 h and treated with Chloroquine (25, 50 μ M) and/or Panobinostat (25, 50 nM). After that, cells were stained with 5 μ M DCFH-DA in serum-free medium for 30 min in darkness (37°C in 5% CO₂). ROS generation was then analyzed using BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer.

Immunofluorescence

OCCLs were plated on round glass coverslips (12 mm diameter) (250,000 cells/well in 6-well plates) and after 24 h of culture, cells were treated with Chloroquine, NAC and/or Panobinostat for 48 or 72 h. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized using 0.5% Triton X-100 (Boehringer Mannheim) in PBS for 10 min, blocked in 10% BSA in PBS for 30 min and incubated with phospho-H2AX antibody (1:1000, 05-636, Sigma-Aldrich) and/or Rad51 antibody (1:1000, PC130, Sigma-Aldrich) or LC3B (1:200, NB600-1384, Novus Biologicals) for 1h 30min. After washing, coverslips were incubated with fluorescent secondary antibodies (1:400, Alexa Fluor 488 goat antimouse IgG and/or Alexa Fluor 594 antirabbit, Molecular Probes, Invitrogen) for 1h. DAPI (dihydrochloride of 4', 6-diamidino-2-phenylindole, Roche) was used to visualize the nuclei. Mowiol reagent (Calbiochem) was used to fix preparations on slides. Cells were then analyzed by confocal microscopy (63x) using a LEICA SP5 microscope DMI-6000V model coupled to a LEICA LAS AF software computer.

Homologous recombination (HR) functional assay

SK-OV-3 cell line was transfected with 1 μ g of pHR plasmid linearized by digestion with NheI [30]. G418 was added at 500 μ g/mL 72 h post-transfection and stable pools were obtained after 3 wk of selection. To measure HR efficiency in stable pools, cells (SK-OV-3 and JN3) were first preincubated with different concentrations of Panobinostat (5, 7 or 10 nM) for 24 h. Then, 10^6 cells were cotransfected with 5 μ g of a plasmid that express I-SceI and 0.5 μ g of pDsRed-N1 to correct for differences in transfection efficiencies. Transfections were performed using the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V and Amaxa Nucleofector device (Lonza). Programs used were V-005 for SK-OV-3 cell line and T-016 for JN3 cell line. After transfection, cells were incubated again with the same concentration of Panobinostat for 48 h. Green (EGFP) and Red (DsRed) fluorescence were measured by flow cytometry using BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer. HR efficiency was calculated as the ratio of GFP+ to DsRed+ cells.

Statistical analysis

Differences between the results obtained from treated and nontreated cells were assessed for statistical significance using Student's unpaired 2 tailed t-test with IBM SPSS Statistics for Windows version 25.0 (IBM Corp.). ANOVA with Tukey's posthoc test was used when more than 2 groups were compared. Data are presented as mean \pm standard deviations. Statistical significance was concluded for values of $P \leq 0.05$.

Results

Chloroquine inhibits proliferation, induces apoptosis and blocks autophagy in ovarian cancer cell lines

The effect of CQ on the proliferation of ovarian cancer cells was evaluated at different concentrations of the drug in 4 OCCLs. We found that treatment with CQ inhibited cell proliferation in a dose- and time-dependent manner in all the cell lines analyzed (Fig. 1A) with IC50 values that ranged from 12.31 μ M for A2780 up to 29.05 μ M for IGROV-1. To characterize CQ antiproliferative activity, a cell cycle study was performed. Flow cytometry analysis showed that cell cycle profiles were similar in treated/untreated cells at the conditions assayed. A slight accumulation in G0/G1 phase was observed in some cell lines at 24 h that only reached significance in A2780 cell line (P -value < 0.05) (Figs. 1B and S1). In addition, a slight increase in the percentage of the sub-G0 population was observed in IGROV-1, OVCAR-8 and SK-OV-3 cell lines; however, a strong and significant increase in the

sub-G0 population was found in A2780 cell line after 72 h of treatment (P -value < 0.05) (Fig. 1B). To determine whether the cytotoxic effect of CQ was due to the induction of apoptosis, ovarian cancer cells were treated with variable concentrations of the drug, stained with Annexin V-PI, and analyzed by flow cytometry. The results showed that CQ induced apoptosis in a dose-dependent manner, with A2780 being the most sensitive cell line (Fig. 1C).

Chloroquine is a well-known autophagy inhibitor [25], therefore we also analyzed the expression of autophagy-related proteins in OCCLs at different times post treatment. The levels of LC3-II and Beclin-1 increased after CQ treatment (Fig. 1D) in all the cell lines tested. p62 levels also increased in all cell lines except for IGROV-1, probably due to their resistance to CQ. All these results suggest a blockage of the autophagy process [25,27]. To confirm this hypothesis, we performed immunofluorescence assays for LC3B detection. We observed a clear accumulation of autophagosomes in the cytoplasm of the 4 OCCLs (Figure S2).

Panobinostat inhibits proliferation and induces G2/M cell cycle arrest, apoptosis and autophagy

Next, we studied the effect of Panobinostat (LBH) on the proliferation of OCCLs. A dose- and time-dependent effect was observed in the 4 cell lines analyzed, being OVCAR-8 the most sensitive to the HDAC inhibitor (Fig. 2A). An analysis of the cell cycle profiles after LBH treatment revealed that this drug caused an accumulation of cells in G2/M phase in the most sensitive cell lines (SK-OV-3, OVCAR-8) (Figures S2, P -value < 0.05) and a strong increase in the percentage of death cells, as determined by the quantification of sub-G0 population (Fig. 2B). A dose-dependent induction of apoptosis after treatment with LBH was demonstrated by Annexin-V labeling (Fig. 2C).

HDAC inhibitors have been described to induce autophagy by a variety of mechanisms [31–34]. To investigate whether LBH modulates autophagy in OC cells the levels of autophagy-related proteins were analyzed by western blot. A decrease in p62 protein levels (except for the A2780 cell line) together with an increment of Beclin-1 (in OVCAR-8, IGROV-1 and A2780 cell lines) and LC3B-I were detected after treatment with the drug (Fig. 2D), indicating an induction of autophagy. Interestingly, cotreatment with CQ inhibited LBH-mediated decline in p62 levels (Figure S4), in agreement with a previous report in breast cancer cells [19].

Combination of Panobinostat and Chloroquine synergistically induces cell death in OCCLs

Next, we compared the effect of the combination of LBH and CQ with these agents in monotherapy in the 4 OCCLs. When cells were treated with a combination of CQ (20 μ M) and Panobinostat (20 nM) we observed that cell viability was much lower than the observed with each drug alone (Fig. 3). To investigate a putative synergistic effect, we used different doses and maintained a constant ratio. The combination indices (CIs), calculated with the Compusyn software, were below 1 in all OCCLs analyzed, revealing a synergistic interaction between the 2 drugs (Fig. 3). The synergism of the double combination was stronger in OVCAR-8 and A2780 than in the other 2 cell lines since they exhibited very low CIs.

Reactive oxygen species (ROS) generation plays a critical role in CQ/LBH-induced lethality

HDAC inhibitors and CQ are known to exert pleiotropic effects in the cells, which might contribute to their cytotoxicity and to the observed synergism. One of these effects is ROS generation that has been demonstrated in some models [18,35–41]. To determine whether CQ and/or LBH increase ROS generation in OCCLs cells were treated with different concentrations

518 Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. Ovejero-Sánchez, R. González-Sarmiento and A.B. Herrero
Neoplasia Vol. 23, No. 5, 2021

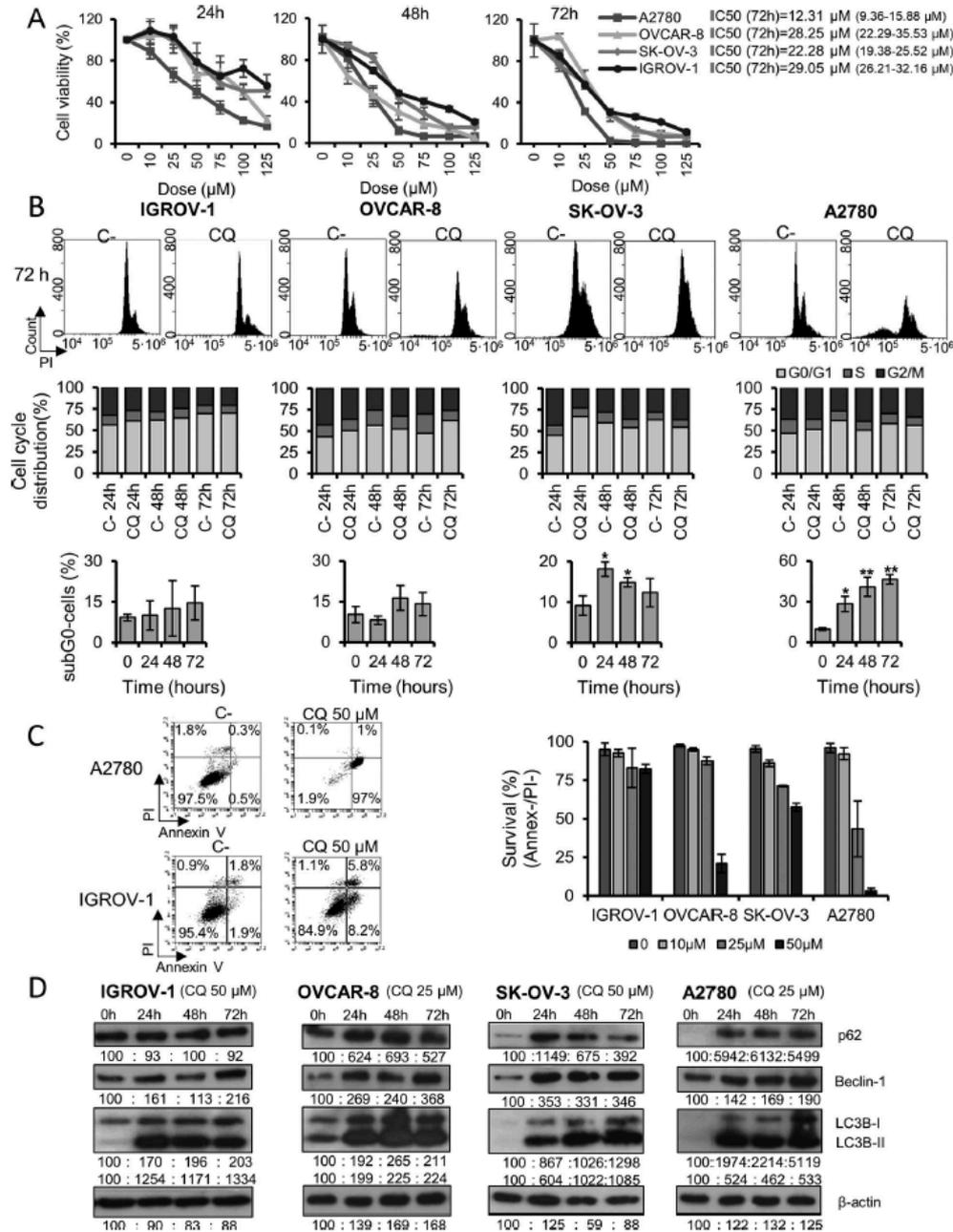


Fig. 1. Effect of Chloroquine in proliferation, cell cycle distribution, apoptosis and autophagy-related proteins in OCCLs. (A) Cell viability after treatment with the indicated doses of CQ for 24, 48 and 72 h. (B) Top panel, cell cycle profile after CQ treatment (50 μM) for 24, 48 and 72 h compared to untreated cells. Middle panel, cell cycle distribution of OCCLs after CQ treatment (50 μM) for 24, 48 and 72 h compared to untreated cells excluding the sub-G0 population. Bottom panel, percentage of death cells after 24, 48 or 72 h of treatment with 50 μM CQ. (C) Effect of 72 h CQ-treatment (10, 25 and 50 μM) on apoptosis in OCCLs. (D) Time-response of autophagy-related proteins (Beclin-1, LC3B, p62) after CQ treatment (25 or 50 μM). β -actin was used as a loading control. Protein levels were quantified using ImageJ and are indicated. Values were normalized with those corresponding to 0 h that were taken as 100. C-: negative control (untreated cells). Data are the mean of 3 independent experiments. Error bars represent the SD (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

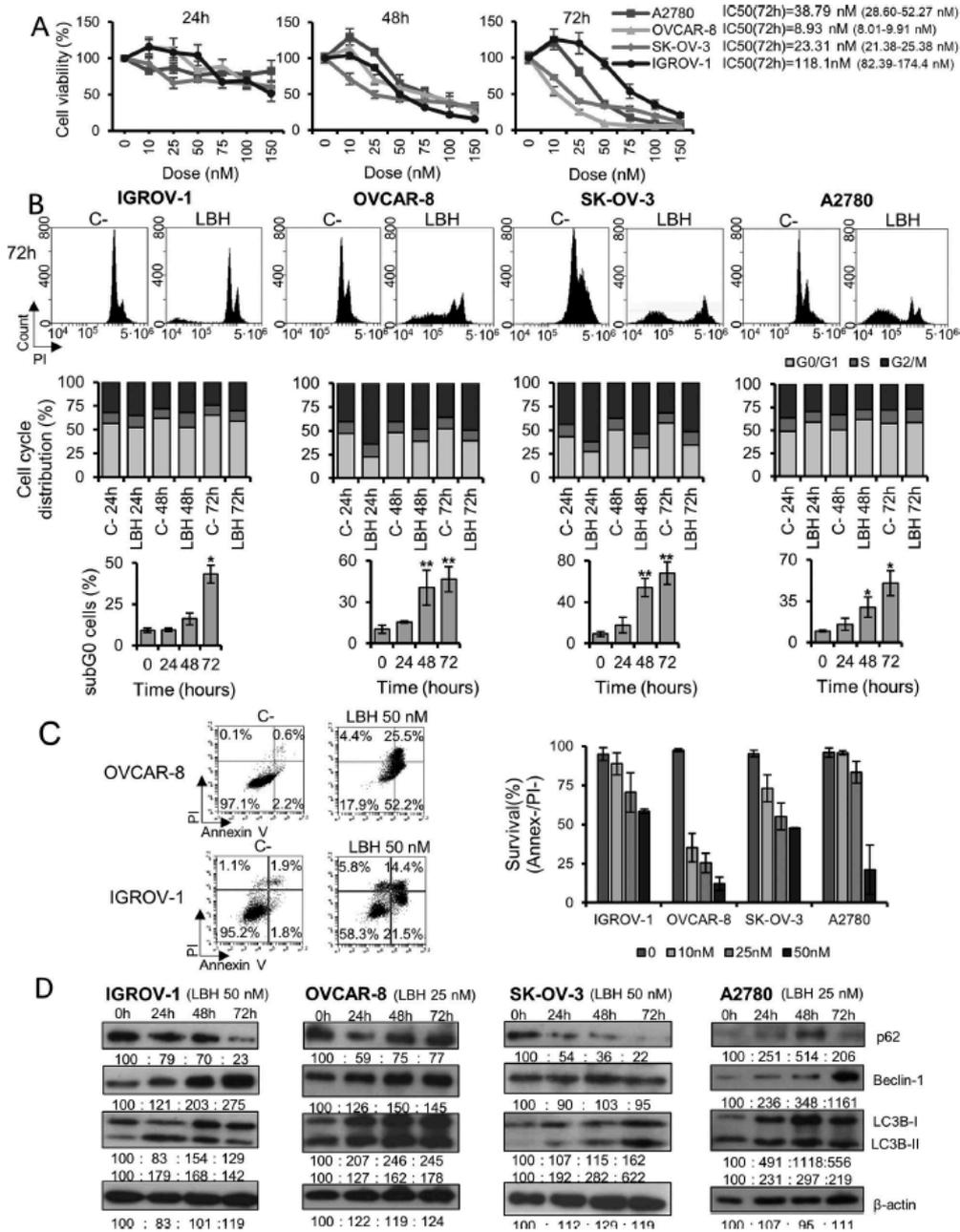


Fig. 2. Effect of Panobinostat in proliferation, cell cycle distribution, apoptosis and autophagy-related proteins in OCCLs. A) Cell viability after treatment with the indicated doses of LBH for 24, 48 and 72 h. B) Top panel, cell cycle profile after LBH treatment (50 nM) for 72 h. Middle the panel, cell cycle distribution of OCCLs after LBH treatment (50 nM) for 24, 48 and 72 h compared with untreated cells excluding the sub-G0 population. Bottom panel, percentage of death cells after 24,48 or 72 h of treatment with 50 nM LBH. C) Effect of 72 h LBH-treatment (10, 25 and 50 nM) on apoptosis in OCCLs. D) Time-response of autophagy-related proteins (Beclin-1, LC3B, p62) after LBH treatment (25 or 50 nM). β -actin was used as a loading control. Protein levels were quantified using ImageJ and are indicated. Values were normalized with those corresponding to 0 h that were taken as 100. C-: negative control (untreated cells). Data are the mean of 3 independent experiments. Error bars represent the SD (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

520 Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. Ovejero-Sánchez, R. González-Sarmiento and A.B. Herrero
Neoplasia Vol. 23, No. 5, 2021

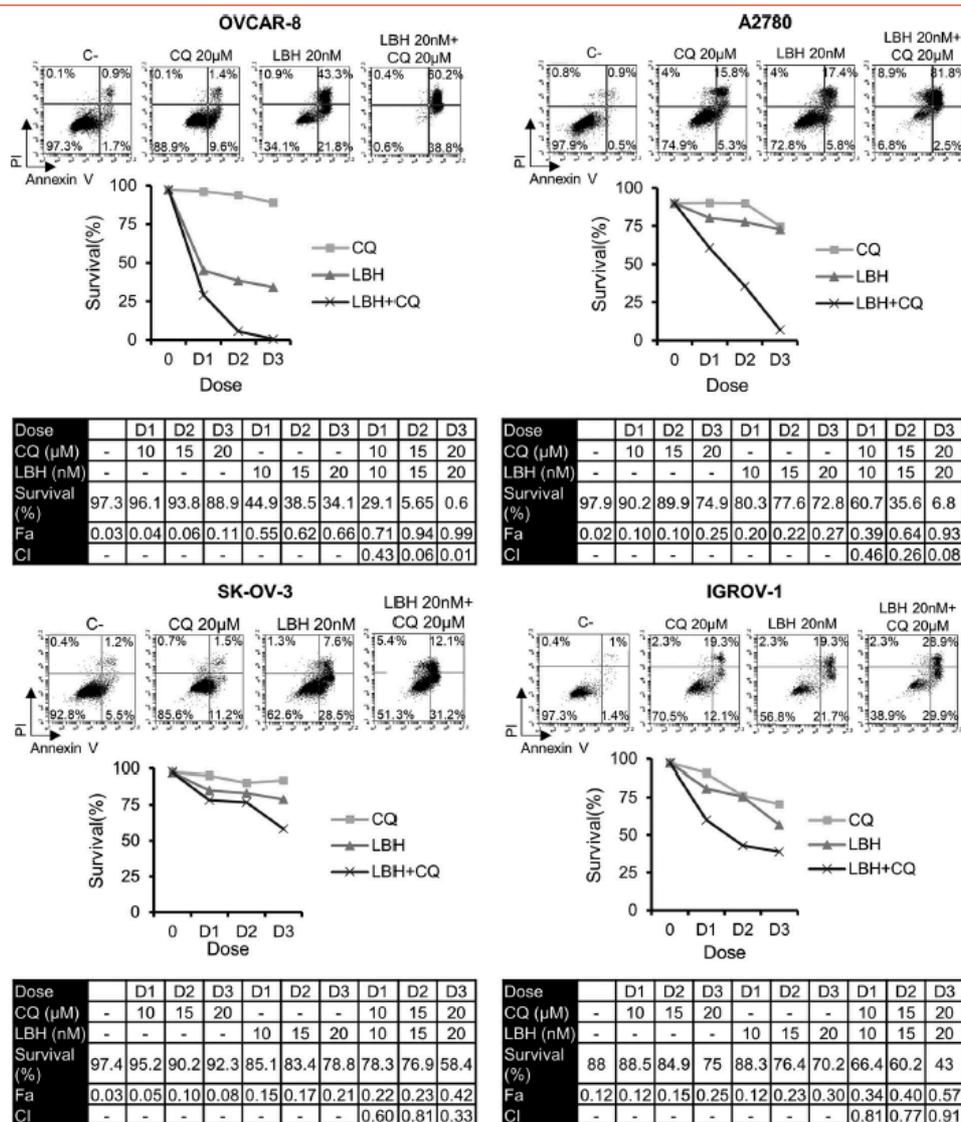


Fig. 3. Synergistic effect of the co-treatment with Panobinostat and chloroquine in OCCLs. Cells were exposed for 72 h to the indicated concentrations of LBH and CQ at a constant ratio and the percentage of apoptotic cells were assessed by flow cytometry (after cell staining with annexin V and propidium iodide). CI values less than 1 indicated a synergistic effect. These values were calculated using Compusyn Software. C-: negative control (untreated cells).

of these drugs for different times, stained with DCFH-DA, and analyzed by flow cytometry. A rapid induction of ROS was observed after treatment with CQ in all the OCCLs, in agreement with previous reports [35] (Fig. 4A). This induction was not observed when cells were cotreated with CQ and the antioxidant NAC. On the other hand, LBH did not increase ROS at short time; therefore, we analyzed its effect at longer treatment. After 24 h of treatment, we found that LBH increased ROS production in all the OCCLs

except for A2780. The combination of CQ and LBH also induced ROS and the effect was stronger than the individual drugs in OVCAR-8 (Fig. 4A).

To analyze the relevance of ROS production in CQ/LBH-induced cell death we compared the viability of ovarian cells that had been incubated with these drugs (alone or in combination) in the presence or absence of the ROS scavenger NAC. Addition of the antioxidant reduced CQ-induced cell death in the most sensitive cell line A2780 but did not significantly decrease

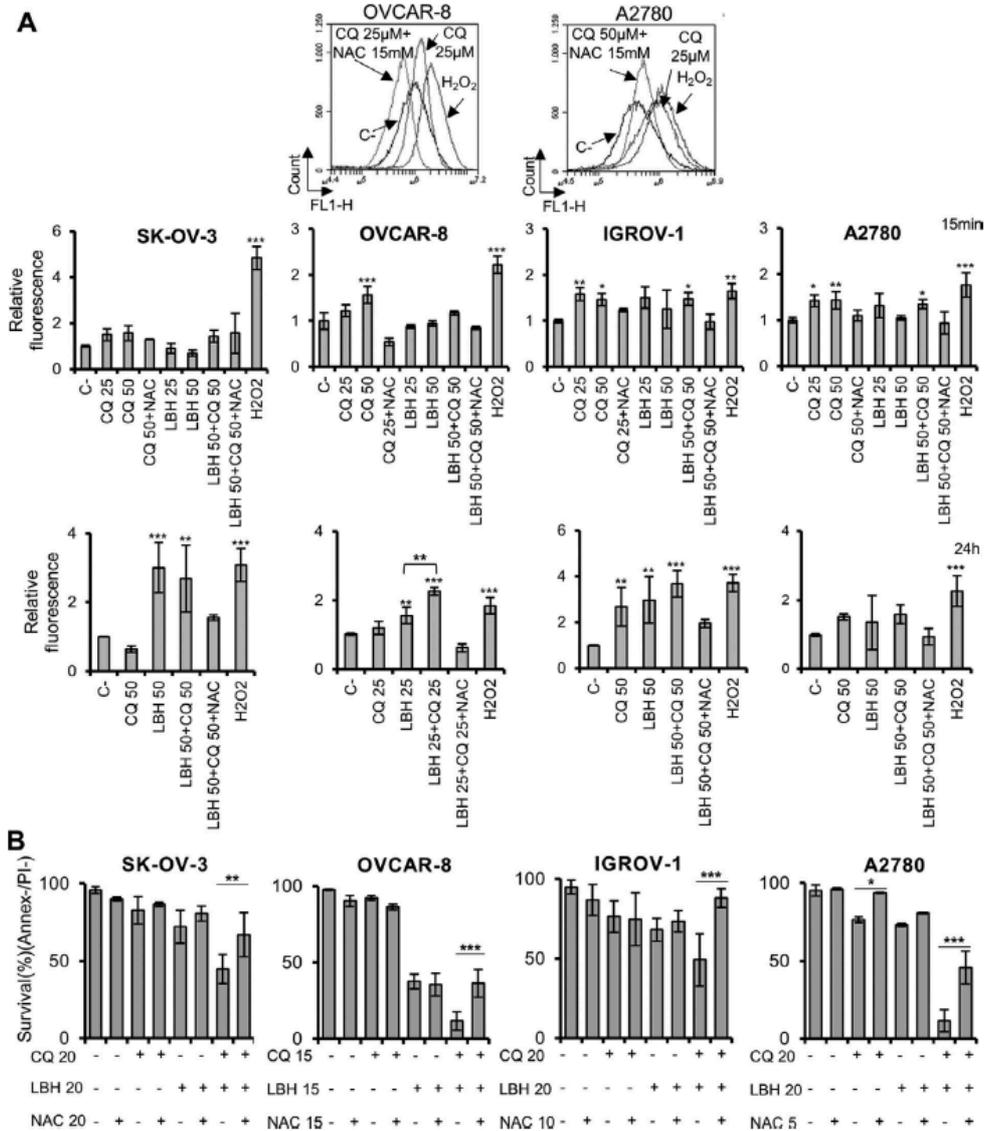


Fig. 4. Induction of ROS after treatment with CQ and LBH in OCCLs and effect in CQ/LBH-induced lethality. (A) Top panel, representative figures of ROS production after 15 min of treatment with the indicated concentrations of CQ (μM). The ROS increase was reverted by the addition of NAC (15 mM). Middle panel, ROS production after 15 min of treatment with the indicated concentrations of CQ (μM), LBH (nM) or NAC (mM). Bottom panel, ROS production after 24 h of treatment with the indicated concentrations of LBH and/or CQ. In all cases, 15 min of H₂O₂ treatment (1 mM) was used as a positive control. Data are the mean of at least 3 independent experiments. Error bars represent the SD (***P* < 0.001, ***P* < 0.01, and **P* < 0.05, compared to C-, unless otherwise specified). (B) Cells were exposed for 72 h to the indicated concentrations of CQ (μM), LBH (nM) and ROS scavenger NAC (mM) and the percentage of apoptotic cells were measured after cell staining with annexin V and propidium iodide by flow cytometry. C-: Negative control (untreated cells). Data are the mean of at least 3 independent experiments. Error bars represent the SD (***P* < 0.001, ***P* < 0.01, and **P* < 0.05).

522 Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. Ovejero-Sánchez, R. González-Sarmiento and A.B. Herrero
Neoplasia Vol. 23, No. 5, 2021

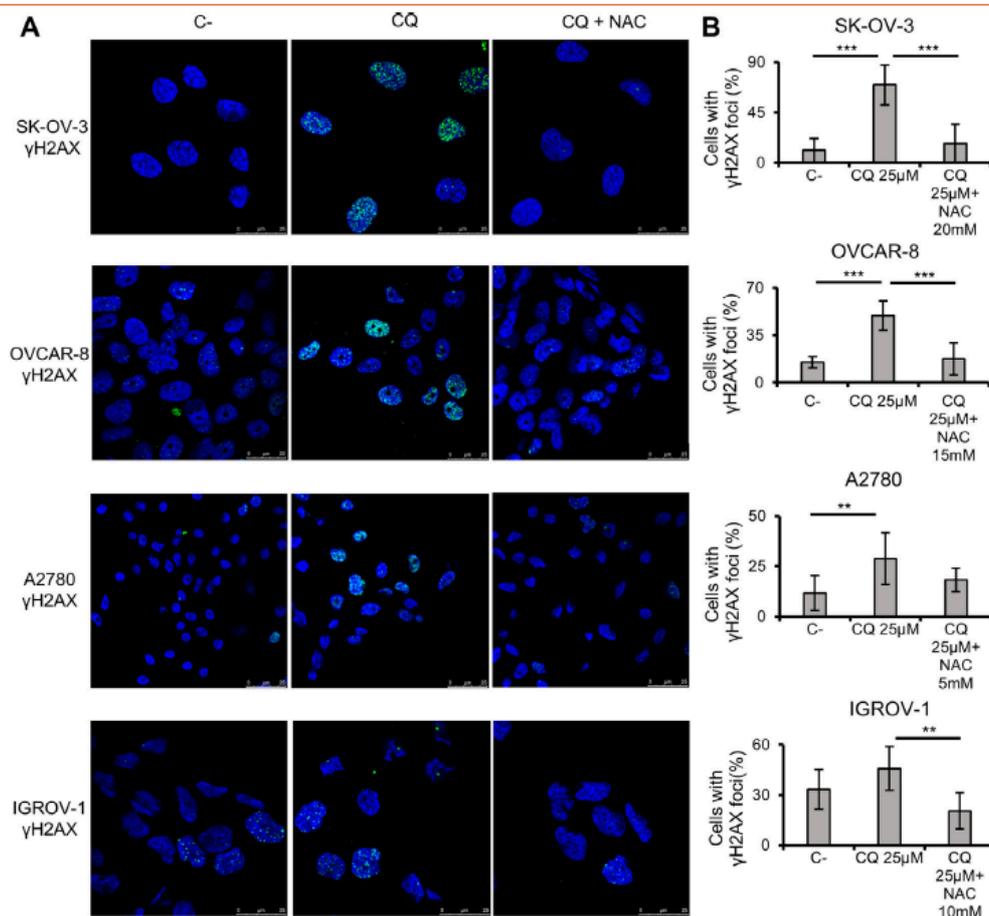


Fig. 5. CQ treatment induces DSBs that can be reverted by the addition of NAC in OCCLs. γ H2AX foci were visualized by confocal microscopy and percentage of cells exhibiting γ H2AX foci (>5 foci/cell) in the presence of CQ, NAC or both were calculated. A2780 and OVCAR-8 were treated for 48 h and IGROV-1 and SK-OV-3 for 72 h. C-: negative control (untreated cells). Data are the mean of the analysis of at least 50 cells per cell line. Error bars represent the SD (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$).

LBH-induced cell death in any of the 4 OCCLs analyzed (Fig. 4B). On the other hand, the presence of NAC clearly reduced the apoptosis induced by the combination of CQ and LBH in all 4 OCCLs.

Chloroquine induces DNA double-strand breaks (DSBs) in OCCLs that can be reverted by the addition of N-Acetylcysteine

ROS is a known generator of endogenous DNA damage, including DSBs, the most lethal of DNA lesions [42,43]. To analyze whether CQ and/or LBH induced DSBs in ovarian cells we monitored the phosphorylation of H2AX (γ H2AX), a sensitive marker of DSBs, by immunofluorescence. CQ was found to induce DSBs in the 4 OCCLs analyzed (Fig. 5A). Addition of NAC decreased the percentage of cells with γ H2AX foci, which clearly indicate that CQ-induced DSBs are caused by ROS (Fig. 5A and 5B). LBH significantly increased the number of cells with γ H2AX foci in SK-OV-3 and

OVCAR-8, but differing from the results obtained with CQ, foci numbers were not reduced in the presence of NAC. We observed that in the presence of LBH γ H2AX foci were bigger than in untreated cells and also than those induced by CQ, especially in SKOV-3 and OVCAR-8 (Fig. 6A). These foci resemble persistent/irreparable DNA damage foci and could represent lesions especially difficult to repair [44].

Panobinostat inhibits homologous recombination repair (HR) in OCCLs

It has been described that some HDACi affect DNA DSB repair by inhibiting homologous recombination (HR) [12,13,16]. This data, together with the LBH-induced γ H2AX foci appearance led us to the hypothesis that this HDAC inhibitor could also affect DSB repair by HR in OCCLs. Moreover, we also hypothesized that the synergy between CQ and LBH could be due to the induction of DSBs by CQ and the inhibition of

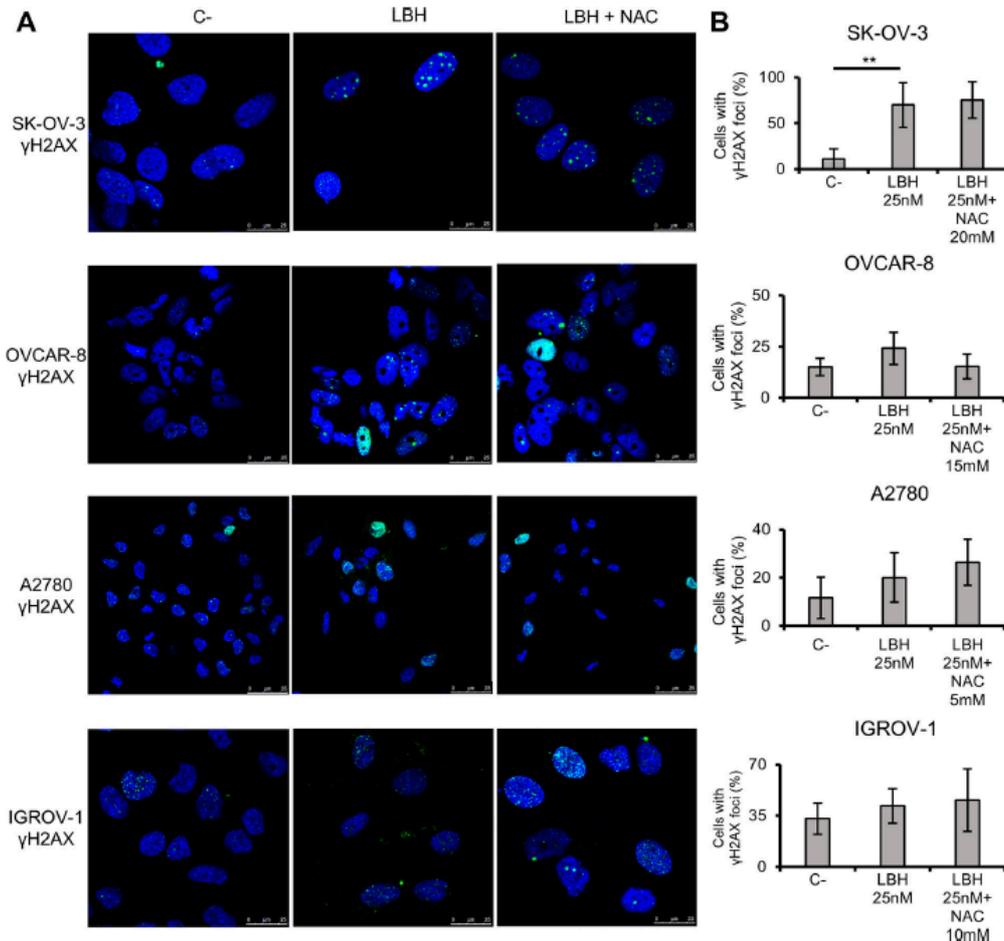


Fig. 6. Panobinostat induces DSBs which cannot be reverted by the addition of NAC in OCCLs. γ H2AX foci were visualized by confocal microscopy and percentage of cells exhibiting γ H2AX foci (>5 foci/cell) in the presence of LBH, NAC or both were calculated. A2780 and OVCAR-8 were treated for 48 h and IGROV-1 and SK-OV-3 for 72 h. C-: negative control (untreated cells). Data are the mean of the analysis of at least 50 cells per cell line. Error bars represent the SD (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$).

their repair by LBH. To test these hypotheses, we measured HR efficiency in the presence of LBH in a multiple myeloma cell line that carries a chromosomally integrated GFP HR reporter cassette (JJN3-HR). This cell line has been proved in previous studies to be an optimal system to measure HR [12,45]. Cells were pretreated with LBH for 24 h, cotransfected with an *I-SceI* endonuclease-expressing plasmid and a pDsRed-N1 plasmid (red), to normalize for transfection efficiency, and incubated again for an additional 48 h. In this system, correct repair by HR of DSBs induced by the endonuclease restored a functional GFP detectable by flow cytometry (green cells). Mirin, an inhibitor of MRN complex (Mre11-Rad51-Nsb1) required for HR, was used as a control [45]. Using this system, we found a significant reduction in the number of HR-proficient cells that had been treated with LBH compared with untreated cells (Fig. 7A). To corroborate these findings in ovarian cells, we then generated an ovarian cancer cell line carrying the HR GFP

reporter cassette (SK-OV-3-HR). We also found a significant reduction in HR efficiency after the treatment with LBH (Fig. 7B).

Panobinostat inhibits the correct recruitment of Rad51 protein to DSBs

We and other researchers have previously shown that some HDAC inhibitors decrease Rad51 levels or affect the recruitment of Rad51 to DSB sites [12–14,46,47]. Therefore, we next analyzed the localization of Rad51 in OCCLs treated with LBH, CQ or both. Cells were also stained with anti- γ H2AX to mark DSB sites. In the SK-OV-3 cell line CQ-treated cells showed γ H2AX that colocalized with Rad51 foci, as expected; however, LBH-treated cells exhibited clear γ H2AX but no Rad51 foci was observed. In the case of OVCAR-8, Rad51 staining after treatment with LBH revealed that the protein was localized in the cytoplasm and in the nucleoli (Fig. 8).

524 Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. Ovejero-Sánchez, R. González-Sarmiento and A.B. Herrero
Neoplasia Vol. 23, No. 5, 2021

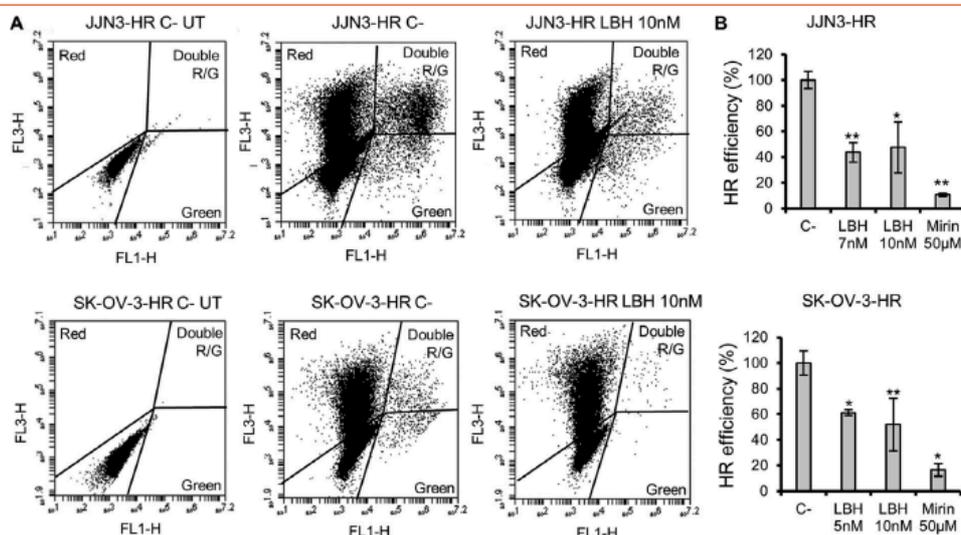


Fig. 7. Panobinostat inhibits DSB repair by homologous recombination. (A) JJJN3-HR and SK-OV-3-HR cells were pre-treated or not (C-) with LBH for 24 h and then co-transfected or not (UT) with 5 μ g of an I-SceI endonuclease-expressing plasmid and 0.5 μ g of pDsRed2-N1 (red cells) and incubated in the presence or absence (C-) of LBH for additional 48 h. Correct HR repair restored GFP gene that was detected as green cells. 15000 DsRed+ are shown in both cell lines. (B) HR efficiency calculated as the ratio of GFP+ to DsRed+ cells. Data are the mean of 3 independent experiments. Error bars represent the SD (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Combination of Mirin and Chloroquine synergistically induces cell death in OCCLs

To further support the hypothesis that the synergy between CQ and LBH could be due to the induction of DSBs by CQ and the inhibition of their repair by LBH, we studied whether treatment with a well-known HR inhibitor, Mirin, together with CQ also produced a synergistic effect. We found that compared to monotherapy treatment, cell viability was lower when the combination of Mirin and CQ was used in the 4 OCCLs (Figure S5A). When the CIs was calculated a synergistic effect between these 2 drugs was found in A2780, SK-OV-3 and IGROV-1 (CI < 1).

Combination of bafilomycin A1 and Panobinostat synergistically induces cell death in OCCLs

It had been previously described that the use of autophagy inhibitors, such as CQ, with drugs that induces autophagy, such as HDACi, enhanced the cytotoxic response of these drugs [18–23,48]. Therefore, we hypothesized that the synergistic effect obtained after CQ/LBH cotreatment could also be due, at least in part, to an inhibition of the prosurvival autophagy pathway. To test this hypothesis, we next studied whether the use of another autophagy inhibitor, bafilomycin A1, could also enhance the LBH cytotoxic effect. We compared the effect of the combination of bafilomycin A1 and LBH with the effect of these agents in monotherapy and found that cell viability was lower when the combination was used in OVCAR-8, SK-OV-3 and IGROV-1 cell lines. To determine a potential synergistic effect, combination indices were calculated. A synergistic effect between these 2 drugs was found in the OVCAR-8, SK-OV-3, and IGROV-1 cell lines (CI < 1). The strongest synergism was found in SK-OV-3 cell line (CI < 0.5) (Figure S5B).

Discussion

The combination of 2 or more therapeutic treatments is a cornerstone of cancer therapy [49]. The idea is to find drug combinations that work in an additive, or better, in a synergistic manner, that is, when the effect of 2 or more agents working in combination is greater than the expected additive effect [50]. These approaches increase the potential to overcome drug resistance by targeting nonoverlapping signaling pathways and allow a lower therapeutic dosage of each individual drug, which reduces toxicity. The development of combinational therapies is especially important for the treatment of cancers with high mortality rate, such as ovarian cancer. Here, we describe for the first time that treatment with an HDACi, LBH, and CQ exerts a strong synergistic effect in ovarian cancer cells and analyzed the causes of the observed synergism. We show that CQ induces the production of ROS causing DNA DSBs, whereas LBH inhibits the repair of these lesions by HR, providing an explanation for the observed synergism.

A previous study has reported a synergistic effect between LBH and CQ in breast cancer cell lines [19]. The authors showed that exposure to LBH increased LC3B-II but reduced the levels of p62, consistent with the degradation of p62 during LBH-induced autophagic flux [51,52]. This data, that was also observed in the present work with OCCLs, led the authors to the hypothesis that LBH-treated cells would be particularly dependent on autophagy for survival, making them more susceptible to inhibition of autophagy by CQ, which inhibits autophagy, thereby increasing levels of p62 and LC3B-II [19,53]. These effects of CQ on p62 and LC3B-II levels were also observed in all the OCCLs analyzed in the present study, as well as a clear accumulation of autophagosomes. Other reports have also shown that CQ enhances the *in vitro* and *in vivo* efficacy of some HDACi; thus, in colon cancer cells, treatment with CQ or knockdown of the essential autophagy gene *ATG7* sensitized cells to vorinostat-induced apoptosis [18] and in chronic myeloid leukemia (CML) cells treatment with drugs that disrupt

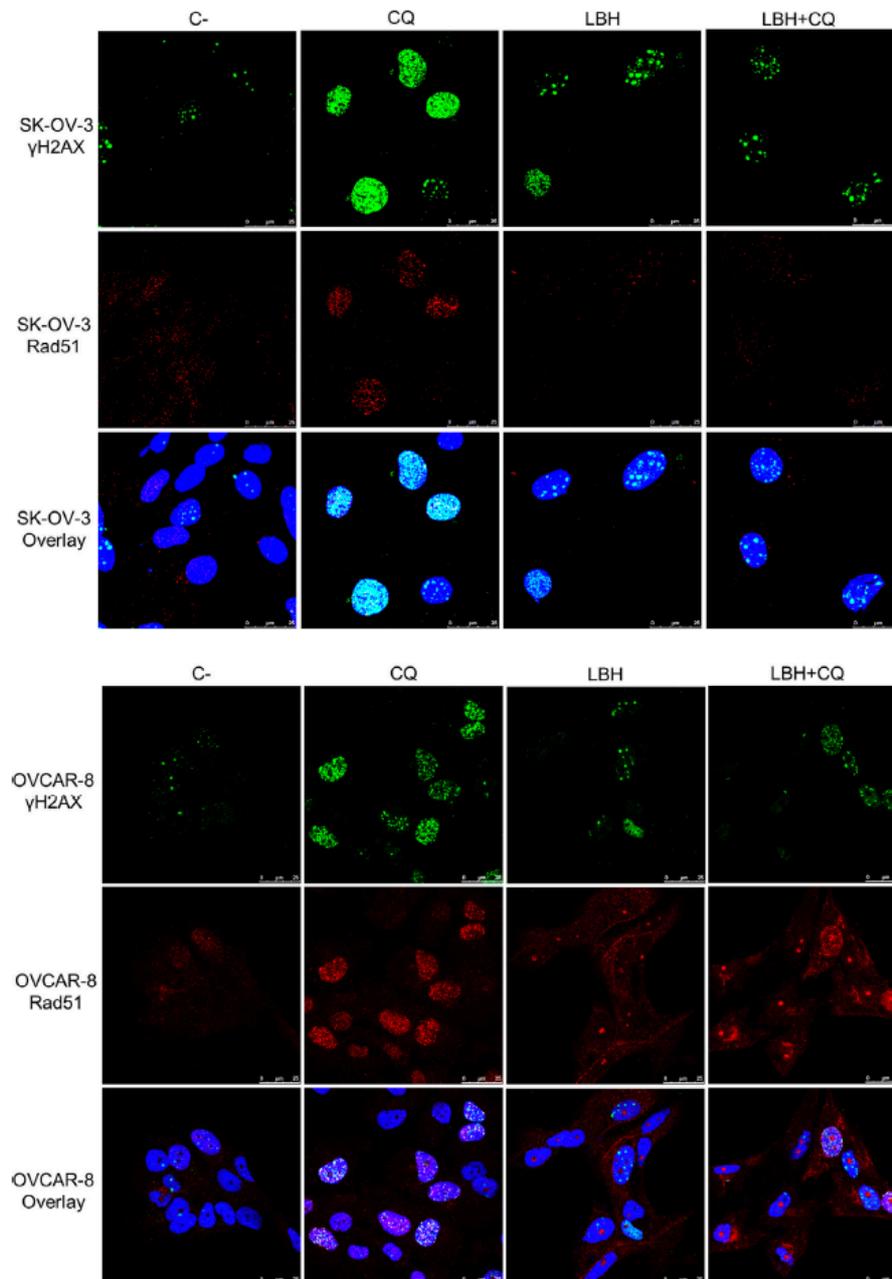


Fig. 8. Effect of Panobinostat treatment in the correct recruitment of Rad51 protein to DSBs. Immunofluorescence of SK-OV-3 and OVCAR-8 cell lines for γ H2AX and Rad51 foci detection after 48 h (OVCAR-8) or 72 h (SK-OV-3) of treatment with 25 μ M of CQ, 25 nM of LBH or both. C-: negative control (untreated cells).

the autophagy pathway dramatically increase the antineoplastic effects of SAHA [20]. However, the fact that HDACi-induced autophagy serves as a survival mechanism that is avoided by CQ or other autophagy inhibitors remains controversial, since other reports have shown the opposite effect. For example, Liu et al described that in hepatocellular carcinoma SAHA-induced cytotoxicity was inhibited by 3-methyladenine or *ATG5* knockout, which inhibits autophagy, indicating that SAHA-induced autophagy led to cell death [32]. Similarly, Yamamoto et al. also described that SAHA-induced cell death could be reverted using 3-methyladenine [54]. It has also been reported that CQ sensitizes some cancer cells to chemotherapy independently of autophagy. Thus, Maycotte et al described that CQ, but not autophagy blockage by knocking out autophagy genes such as *ATG12* and *BECN1* or treatment with the autophagy inhibitor Bafilomycin A1, increased the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy [27]. To try to elucidate if autophagy serves as a survival mechanism in HDACi-treated cells, we decided to investigate the cytotoxic effect of the combination of LBH and another inhibitor of autophagy, Bafilomycin A1. We did observe a synergistic effect in 3 out of 4 OCCLs analyzed, which suggest that the regulation of autophagy may contribute to the efficacy of the combination. In this regard, several reports have previously shown the relevance of autophagy inhibition as a therapeutic option in ovarian carcinoma, since treatment with chemotherapeutic drugs, such as cisplatin or paclitaxel, upregulates autophagy which contributes to chemotherapy resistance [55]. However, we did not find a synergistic effect in A2780 cell line treated with LBH and Bafilomycin A1. This result, and the discrepancies among different reports mentioned above, could be due to differences in cancer cell lines or HDAC inhibitors but reveal that some CQ/HDACi autophagy-independent effects must contribute to the described synergistic interactions. In the case of A2780, induction of autophagy by LBH could be lower than in the rest of the cell lines analyzed, in fact, we did not observe p62 degradation, therefore CQ/LBH synergy may attempt to another mechanism. In this regard, CQ and also HDACi have been described to induce pleiotropic effects on cells [6,10,29,56,11–15,25,27,28].

To investigate the underlying causes of synergism between CQ and LBH we have used 4 different OCCLs representing the most common histopathological OC subtypes (high-grade serous, endometrioid and clear cell ovarian carcinomas). A2780 and IGROV-1 cell lines were derived from ovarian endometrioid adenocarcinomas and represent this subtype of OC; in fact, IGROV-1 cells present a mixed histology harboring molecular alterations typical of clear cells and endometrioid subtypes. OVCAR-8 and SK-OV-3 cell lines were obtained from high-grade serous adenocarcinomas and ascites from a serous cystadenoma, respectively. We first analyzed the individual effect of the drugs under study. We show that CQ inhibited proliferation, in agreement with previous reports [40,57]. However, it did not affect cell cycle profile, as also found Carew et al [20], but in contrast with other authors reporting a G0/G1 arrest [57]. We also found that CQ increases ROS, as previously reported in different cancer cell lines [18,20,35–37,40,57,58], and this effect resulted in the formation of DSBs in ovarian cells, since the presence of the antioxidant NAC completely restored the number of cells with endogenous γ H2AX foci. Our data show that CQ induces ROS in OCCLs as soon as 15 min after treatment. These species were reduced at 24 h in OCCLs with the exception of IGROV-1, in agreement with previous reports [35]. The mechanisms that promote ROS induction and the impact of DNA lesions to induce cell death has not been deeply investigated, but it has been described that autophagy might prevents ROS accumulation through elimination of damaged mitochondria, which are known to be the major source of ROS [41]. Therefore, autophagy blockage induced by CQ might be the cause of increased ROS leading to DNA damage. Alternatively, it has been suggested that the increased permeability of mitochondrial membrane by cathepsins, liberated from lysosome after the lysosomal membrane permeabilization produced by CQ, may be responsible for ROS generation [20,40]. The slight effect of CQ in the induction of apoptosis in OCCLs probably attempts to

an efficient DSB repair in the OCCLs analyzed. On the other hand, we did not detect a significant increase in ROS after the treatment with LBH at short time; however, we detected a significant induction of ROS at longer time (24 h) in 3 of the 4 cell lines analyzed. After 24 h of cotreatment with both agents, an increase in ROS production was detected in the 4 OCCLs compared to untreated cells, and this increase was higher than those obtained after LBH treatment alone in OVCAR-8. These results are consistent with those reported in previous studies in colon cancer cells [18] and hematological tumor cells, where different HDACi were found to induce ROS [59,60]. ROS generation could explain the increase in the percentage of cells with γ H2AX foci after treatment with LBH. However, the percentage of cells with γ H2AX foci was not significantly reduced by the addition of ROS scavenger NAC. These results suggest that LBH could affect some DNA repair pathways, such as HR, that might avoid a correct repair of DSBs. In fact, we found that LBH significantly decreased the efficiency of HR, and this must depend, at least in part, on an improper recruitment of Rad51 recombinase to DSB sites, as revealed the immunofluorescence assays. These results are consistent with previous reports using other HDACi [12–14,46,47]. Other researchers have also described defects in ATM signaling after treatment with HDACi [15], if that is also the case in OCCLs requires further investigation. To further support the hypothesis that CQ induce DSBs and LBH avoids their repair, we analyzed the effect of the combination of CQ and a well-known HR inhibitor, Mirin. We found that this combination also exerted a synergistic effect in 3 out of 4 cell lines analyzed, which again confirms that inhibition of HR enhances the efficacy of the DSB-inducer CQ. Moreover, we found that NAC protects against CQ/LBH-induced cell death, revealing that the cytotoxic effect of the double combination is, at least in part, due to the generation of DSBs by oxidative stress.

Conclusions

Altogether, our results strongly suggest that induction of DNA damage and inhibition of DNA repair play an important role in CQ/LBH-induced cell death and explain, together with the modulation of autophagy, the strong synergy observed after treatment with these 2 drugs.

Interestingly, the combination of LBH and CQ has been shown to reduced tumor formation in breast xenografts *in vivo* with low cytotoxicity [19]. These results, together with our findings in 4 OCCLs that represent different types of ovarian carcinomas, indicate that CQ plus LBH must be considered for the treatment of several cancers and therefore investigated in clinical trials.

Author contributions

Conceptualization, AB.H. and R.G.-S.; methodology, M.O.-S and AB.H.; validation, AB.H. and R.G.-S.; formal analysis, M.O.-S.; investigation, AB.H. and M.O.-S.; resources, R.G.-S.; data curation, M.O.-S.; writing—original draft preparation, M.O.-S, AB.H.; writing—review and editing, M.O.-S, AB.H and R.G.-S.; visualization, M.O.-S, AB.H, R.G.-S.; supervision, AB.H and R.G.-S.; project administration, R.G.-S.; funding acquisition, R.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This study was supported by the health research program of the "Instituto de Salud Carlos III" (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, PI16/01920 and PI20/01569) co-funded with FEDER funds and project CSI264P20 ("Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León"). M.O.-S was supported by a predoctoral research grant from the Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) (IBpredoc17/00010).

Acknowledgments

The authors thank to the Microscopy and Cytometry Unit from the Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer (IBMCC) for their technical assistance.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neo.2021.04.003.

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018 Nov 1;68(6):394–424.
- Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. In: *The Lancet*, Vol. 393. Lancet Publishing Group; 2019. p. 1240–53.
- Giornelli GH. Management of relapsed ovarian cancer: a review. *Springerplus* 2016;5(1197).
- Van Zyl B, Tang D, Bowden NA. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: What can we use to improve treatment. *Endocr Relat Cancer* 2018;25:R303–18.
- Pokhriyal R, Hariprasad R, Kumar L, Hariprasad G. Chemotherapy resistance in advanced ovarian cancer patients. *Biomark Cancer* 2019;11.
- Eckschlager T, Pich J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci* 2017;18(7).
- Suraweera A, O'Byrne KJ, Richard DJ. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: Achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front Oncol* 2018;8.
- Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007;1:19–25.
- Kim TY, Bang YJ, Robertson KW. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics* 2006;1(1):15–24.
- Newbold A, Falkenberg KJ, Prince HM, Johnstone RW. How do tumor cells respond to HDAC inhibition? *FEBS J* 2016;283:4032–46.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:769–84.
- López-Iglesias AA, Herrero AB, Chesí M, San-Segundo L, González-Méndez L, Hernández-García S, Misiewicz-Krzeminska I, Quwaider D, Martín-Sánchez M, Primo D, et al. Preclinical anti-melanoma activity of EDO-S101, a new bendamustine-derived molecule with added HDACi activity, through potent DNA damage induction and impairment of DNA repair. *J Hematol Oncol* 2017;10(1):1–14.
- Wilson AJ, Sarfo-Kantanka K, Barrack T, Steck A, Saskowski J, Crispens MA, Khabele D. Panobinostat sensitizes cyclin E high, homologous recombination-proficient ovarian cancer to olaparib. *Gynecol Oncol* 2016;143(1):143–51.
- Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, Buggy JJ. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:19482–7.
- Thurn KT, Thomas S, Raha P, Qureshi I, Munster PN. Histone deacetylase regulation of ATM-mediated DNA damage signaling. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2078–87.
- de Andrade PV, Andrade AF, de Paula, Queiroz RG, Scrideli CA, Tone LG, Valera ET. The histone deacetylase inhibitor PCI-24781 as a putative radiosensitizer in pediatric glioblastoma cell lines. *Cancer Cell Int* 2016;16(1):31.
- Bishop E, Bradshaw TD. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol* 2018;82:913–22.
- Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, Zhang H, Mita AC, Mita MM, Giles JF, et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* 2010;14:2448–59.
- Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L, et al. Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012;11(4):973–83.
- Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, Zhang H, Yang C, Chung L, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* 2007;110:313–22.
- Gao L, Sun X, Zhang Q, Chen X, Zhao T, Lu L, Zhang J, Hong Y. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A and autophagy inhibitor chloroquine synergistically exert anti-tumor activity in H-ras transformed breast epithelial cells. *Mol Med Rep* 2018;17:4345–50.
- Kommalapati VK, Kumar D, Tangutur AD. Inhibition of JNJ-26481585-mediated autophagy induces apoptosis via ROS activation and mitochondrial membrane potential disruption in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biochem* 2020 Mar 7;468(1–2):21–34.
- Torgersen ML, Engedal N, Bøe SO, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* 2013 Oct 3;122(14):2467–76.
- AA Al-Bari. Chloroquine analogues in drug discovery: New directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J Antimicrob Chemother* 2014;70:1608–21.
- Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 2018;14(8):1435–55.
- Verbaander C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, Agostinis P, Bouche G. Repurposing drugs in oncology (ReDO) - Chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancer-medicalscience* 2017;11:781. PMID: 29225688; PMCID: PMC5718030. doi:10.3332/ecancer.2017.781.
- Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* 2012;8.
- Eng CH, Wang Z, Tkach D, Toral-Barza L, Ugwonalu S, Liu S, Fitzgerald SL, George E, Frías E, Cochran N, et al. Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:182–7.
- Enzenmüller S, Gonzalez P, Debatin KM, Fulda S. Chloroquine overcomes resistance of lung carcinoma cells to the dual PI3K/mTOR inhibitor PI103 by lysosome-mediated apoptosis. *Anticancer Drugs* 2013;24:14–19.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* 2008;7:1765–71.
- Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks PA, Jiang X. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 24;109(17):6561–5.
- Liu YL, Yang PM, Shun CT, Wu MS, Weng JR, Chen CC. Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 2010;6(8):1057–65.
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(52):18030–5.
- Chiu HW, Yeh YL, Ho SY, Wu YH, Wang BJ, Huang WJ, Ho YS, Wang YJ, Chen LC, Tu SH. A new histone deacetylase inhibitor enhances radiation sensitivity through the induction of misfolded protein aggregation and autophagy in triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11(11).
- Pare J, Choi K, Jeong E, Kwon D, Benveniste EN, Choi C. Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia* 2004;47(1):9–20.
- Qu X, Sheng J, Shen L, Su J, Xu Y, Xie Q, Wu Y, Zhang X, Sun L. Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS. *PLoS One* 2017;12(3).
- Ganguli A, Choudhury D, Datta S, Bhattacharya S, Chakrabarti G. Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis. *Biochimie* 2014;107(PB):338–49.

528 Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. Ovejero-Sánchez, R. González-Sarmiento and A.B. Herrero
2021 **Neoplasia Vol. 23, No. 5,**

- [38] Rosato RR, Almenara JA, Maggio SC, Coe S, Atadja P, Dent P, Grant S. Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions. *Mol Cancer Ther* 2008;7(10):3285–97.
- [39] Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10833–8.
- [40] Park D, Lee Y. Biphasic activity of Chloroquine in human colorectal cancer cells. *Dev Reprod* 2014;18:225–31.
- [41] Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol* 2015;4:184–92.
- [42] Scott SP, Pandita TK. The cellular control of DNA double-strand breaks. *J Cell Biochem. NIH Public Access* 2006;99:1463–75.
- [43] Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. *ROS and the DNA damage response in cancer*, Vol. 25. Redox Biology. Elsevier B.V.; 2019.
- [44] Herrero AB, SanMiguel J, Gutiérrez NC. Deregulation of DNA double-strand break repair in multiple myeloma: Implications for genome stability. *PLoS One* 2015 19;10(3).
- [45] Herrero AB, Gutiérrez NC. Targeting ongoing DNA damage in multiple myeloma: Effects of DNA damage response inhibitors on plasma cell survival. *Front Oncol* 2017;7(MAY):98.
- [46] Lai TH, Ewald B, Zecevic A, Liu C, Sulda M, Papaioannou D, Garzon R, Blachly JS, Plunkett W, Sampath D. HDAC Inhibition Induces MicroRNA-182, which Targets RAD51 and Impairs HR repair to sensitize cells to sapacitabine in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2016;22(14):3537–49.
- [47] Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, Kortenhorst MSQ, Wissing MD, Hedayati M, Shabbeer S, Mendonca J, Deangelis J, Marchionni L, et al. Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One* 2010;5(6).
- [48] He G, Wang Y, Pang X, Zhang B. Inhibition of autophagy induced by TSA sensitizes colon cancer cell to radiation. *Tumor Biol* 2014;35:1003–11.
- [49] Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 2017;8:38022–43.
- [50] Greco WR, Faessel H, Levasseur L. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers? *J Natl Cancer Inst* 1996;88:699–700.
- [51] Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009;137:1001–4.
- [52] Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett* 2010;584:1374–8.
- [53] Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011;17:654–66.
- [54] Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, Okada T, Nakamura T, Li Y, Takasaki M, Nakabeppu Y, Iwamoto Y. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines. *Anticancer Res* 2008;28(3A):1585–91.
- [55] Zhan L, Zhang Y, Wang W, Song E, Fan Y, Li J, Wei B. Autophagy as an emerging therapy target for ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(50):83476–87.
- [56] Shukla AM, Shukla AW. Expanding horizons for clinical applications of chloroquine, hydroxychloroquine, and related structural analogues. *Drugs Context* 2019;8.
- [57] Hu T, Li P, Luo Z, Chen X, Zhang J, Wang C, Chen P, Dong Z. Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2016;35:43–9.
- [58] Farombi EO. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: Protective role of free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol* 2006;22:159–67.
- [59] Pei XY, Dai Y, Grant S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2004;10:3839–52.
- [60] Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1. *Cancer Res* 2003;63(13):3637–45.

ANEXO II

International Journal of
Molecular Sciences

Article

Microtubule Destabilizing Sulfonamides as an Alternative to Taxane-Based Chemotherapy

Myriam González ^{1,2,3,†}, María Ovejero-Sánchez ^{2,4,5,†}, Alba Vicente-Blázquez ^{1,2,3}, Raquel Álvarez ^{1,2,3}, Ana B. Herrero ^{2,4,5}, Manuel Medarde ^{1,2,3}, Rogelio González-Sarmiento ^{2,4,5,*} and Rafael Peláez ^{1,2,3,*}

- ¹ Laboratorio de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; mygondi@usal.es (M.G.); avicentebalquez@usal.es (A.V.-B.); raquelalvarez@usal.es (R.Á.); medarde@usal.es (M.M.)
- ² Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; maria.os@usal.es (M.O.-S.); anah@usal.es (A.B.H.)
- ³ Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁴ Unidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁵ Laboratorio de Diagnóstico en Cáncer Hereditario, Laboratorio 14, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, 37007 Salamanca, Spain
- * Correspondence: gonzalez@usal.es (R.G.-S.); pelaez@usal.es (R.P.); Tel.: +34-923-294500 (R.G.-S.); +34-677-554-890 (ext. 1837) (R.P.)
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: González, M.; Ovejero-Sánchez, M.; Vicente-Blázquez, A.; Álvarez, R.; Herrero, A.B.; Medarde, M.; González-Sarmiento, R.; Peláez, R. Microtubule Destabilizing Sulfonamides as an Alternative to Taxane-Based Chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1907. <https://doi.org/10.3390/ijms22041907>

Academic Editor: Peter Van Dam

Received: 12 January 2021

Accepted: 11 February 2021

Published: 14 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Pan-Gyn cancers entail 1 in 5 cancer cases worldwide, breast cancer being the most commonly diagnosed and responsible for most cancer deaths in women. The high incidence and mortality of these malignancies, together with the handicaps of taxanes—first-line treatments—turn the development of alternative therapeutics into an urgency. Taxanes exhibit low water solubility that require formulations that involve side effects. These drugs are often associated with dose-limiting toxicities and with the appearance of multi-drug resistance (MDR). Here, we propose targeting tubulin with compounds directed to the colchicine site, as their smaller size offer pharmacokinetic advantages and make them less prone to MDR efflux. We have prepared 52 new Microtubule Destabilizing Sulfonamides (MDS) that mostly avoid MDR-mediated resistance and with improved aqueous solubility. The most potent compounds, *N*-methyl-*N*-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-methylaminobenzenesulfonamide 38, *N*-methyl-*N*-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-methoxy-3-aminobenzenesulfonamide 42, and *N*-benzyl-*N*-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-methoxy-3-aminobenzenesulfonamide 45 show nanomolar antiproliferative potencies against ovarian, breast, and cervix carcinoma cells, similar or even better than paclitaxel. Compounds behave as tubulin-binding agents, causing an evident disruption of the microtubule network, in vitro Tubulin Polymerization Inhibition (TPI), and mitotic catastrophe followed by apoptosis. Our results suggest that these novel MDS may be promising alternatives to taxane-based chemotherapy in chemoresistant Pan-Gyn cancers.

Keywords: tubulin; sulfonamide; antitumor; taxane; combretastatin A-4; breast cancer; gynecologic cancer

1. Introduction

Gynecologic (i.e., ovarian, uterine, vulva, and vagina) and women breast cancer share relevant similarities at the molecular level that cluster them together (Pan-Gyn) and distinguish them from other tumor types [1,2]. According to GLOBOCAN estimates, Pan-Gyn cancers accounted for 19% of new diagnoses worldwide in 2018 and entailed 40% of new cancer cases among females [3]. 39% of women with Pan-Gyn cancers died from them, representing 30% of all female cancer deaths and 13% of total cancer deaths globally.

The high incidence and mortality of female breast [4,5], ovarian [6,7], and uterine [8,9] cancers and the acquired resistance to first-line treatments highlight the need for new therapeutic alternatives.

Since the FDA approved the use of Taxol[®] for advanced ovarian carcinoma in 1992 and metastatic breast cancer in 1994 [10], taxane-based chemotherapy has become the basis for treating breast and ovarian cancers [11]. First-line chemotherapy involves a platinum-taxane combination for ovarian cancer [12–14], preferably carboplatin/paclitaxel [15], and taxanes sequenced or combined with anthracyclines for advanced and metastatic breast cancer [16–19]. Furthermore, the combination of cisplatin and paclitaxel is considered a standard regimen in the palliative setting for patients with metastatic, recurrent, or persistent uterine cancer [9,20–22].

However, the clinical efficacy of taxanes is limited by an intrinsic low aqueous solubility (<2 µg/mL [23–25]), dose-limiting toxicities, and the development of drug resistance [26]. The low solubility (remaining challenging) requires complex solvent-system formulations that can alter the pharmacokinetic profiles [27,28] and have been associated with toxicity [29,30]. The development of resistance to these drugs is usually ascribed to P-gp-mediated efflux and alterations in tubulin (mutations in the tubulin genes, altered tubulin isotype expression, or aberrant levels of tubulin) [31–33]. Specific resistance to taxane-based chemotherapy has been described for female breast cancer, with an approximately 30% of recurrence [34,35], ovarian cancer, in which 50% of patients relapse with the chemoresistant disease within the first two years post-diagnosis [36,37], and uterine cancer [38].

Taxanes bind to microtubules, stabilizing lateral contacts between protofilaments, thus promoting assembly and inhibiting depolymerization at high concentrations. At lower concentrations, they alter microtubule dynamics and preclude cells from properly completing mitosis [39,40], which leads to cell cycle arrest at G₂/M and, subsequently, to cell death mainly triggered by apoptosis [41,42]. There are other drug binding sites in tubulin that affect microtubule dynamics similarly to taxanes, but whose engagement results in microtubule depolymerization at high concentrations, such as the colchicine, the vinca alkaloids, the maytansine, the pironetin, and the hemisterlin sites [43]. The only approved drugs belong to the vinca alkaloids site binding ligands, which are used against hematological malignancies and solid tumors, including breast cancer. However, they share with taxanes the problems of toxic side effects, difficult pharmacokinetics, and complex hydrophobic structures that make them substrates of drug efflux pumps [44].

The colchicine site offers advantages for drug design since its ligands exhibit simple chemical structures and are synthetically accessible. Colchicine-site ligands display antiproliferative effects (characterized by cell cycle arrest at G₂/M phase followed by the induction of apoptosis [45]) and act as vascular disrupting agents, affording additional odds against solid tumors [46]. Representatives such as the stilbene combretastatin A-4 (CA-4) and the sulfonamide ABT-751 have reached clinical trials [47]. However, the *Z* olefin of combretastatins is chemically unstable and readily isomerizes to the more stable but inactive *E* isomer. The low solubility of CA-4 requires the use of phosphate prodrugs on the phenolic hydroxyl group, which is, in turn, the target for metabolic inactivation by glucuronidation in resistant cells, such as the colon adenocarcinoma HT-29 cell line [48]. ABT-751 is an orally administered sulfonamide with modest potency against human cancer cell lines and xenograft models. Despite its favorable pharmacokinetics, ABT-751 has not found clinical application due to insufficient potency [49].

In this work, we have designed and synthesized a new family of Microtubule Destabilizing Sulfonamides (MDS) hybrids of CA-4 and ABT-751. The effects of replacing the chemically unstable CA-4 olefin with a sulfonamide bridge, the removal or substitution of the phenolic hydroxyl group, and the introduction of several modifications on the aromatic rings and the sulfonamide bridge have been explored while maintaining the 3,4,5-trimethoxyphenyl ring that has been long considered essential for high potency [50,51] (Figure 1). The resulting compounds have been evaluated for tubulin inhibition *in vitro*

and antiproliferative activity against several human tumor cell lines. We have also studied whether MDR1 pumps could compromise their effectiveness by the pharmacological inhibition of Pgp using verapamil. After a comprehensive preliminary evaluation, three promising MDS have been further screened against several representative cancer cell lines representative of the tumor types that are associated with the highest mortalities: breast, ovarian, and uterine, accounting for 51%, 15%, and 32% of cancer deaths in women, respectively. The effect of the compounds on cancer cell proliferation has been studied and compared with paclitaxel, CA-4, and ABT-751. The mechanism of action of these novel MDS has been studied by ascertaining their effect on the microtubule network in vitro. These MDS induce mitotic arrest, followed by apoptotic cell death with differences arising from different genetic backgrounds of the studied cell lines. The favorable pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles compared to reference drugs, including solubility, absence of Pgp-mediated resistance, and improved potency indicate that MDS are promising candidates for the treatment of this kind of malignancies.

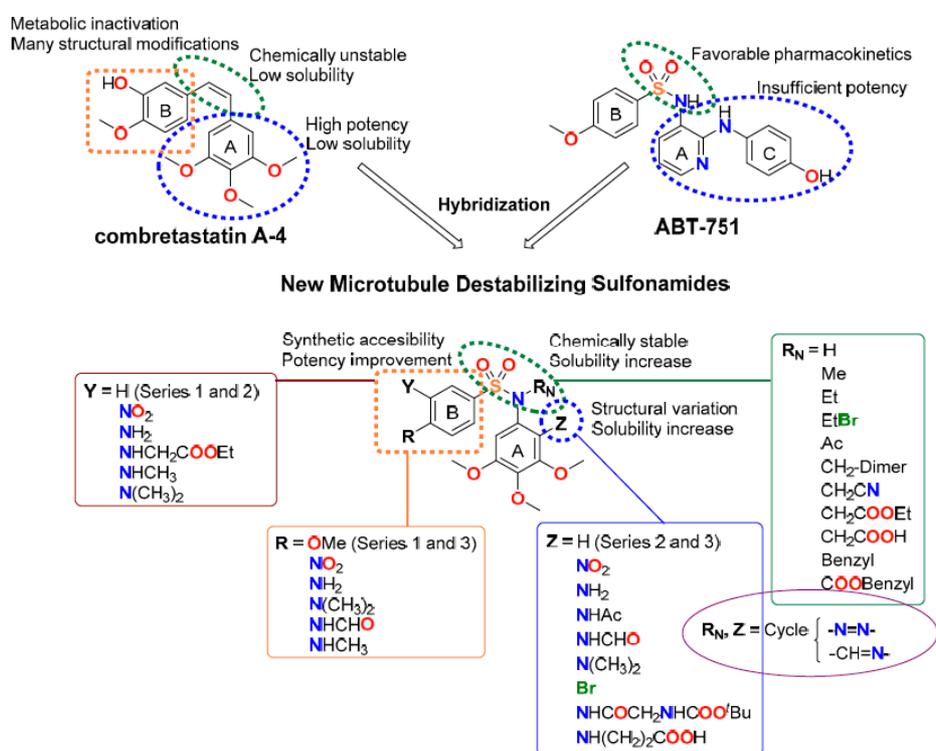


Figure 1. Representative ligands binding at the colchicine site used as a starting point for the rational design of new Microtubule Destabilizing Sulfonamides (MDS). General structure and structure variations of new MDS.

2. Results

2.1. Synthesis of MDS

52 new MDS (Figure 1) were prepared following the synthetic approach shown in Figure 2 (detailed synthetic procedures and NMR spectra can be found in Supplemental Figure S1 and Methods SP1,2). The synthesized compounds were divided into three series according to the substituents on the aromatic B ring (Ar_B): series 1 (compounds 1a-24), series 2 (25-38), and series 3 (39-48b) (Table 1). Sulfonamides were built up by the reaction between 4-methoxy- (series 1), 4-nitro- (series 2), or 4-methoxy-3-nitro- (series 3)

benzenesulfonyl chlorides and 3,4,5-trimethoxyaniline, providing crystalline products in excellent yields (90–96%). Nitro groups were reduced to amines by palladium-catalyzed hydrogenation (82–98% yields). The subsequent amino derivatization by alkylation, acylation, and/or formylation-reduction sequences allowed the introduction of varied Z, R, and Y substituents (Figure 1). Substitutions at the sulfonamide nitrogen were conducted by alkylation reactions with alkyl halides in KOH/CH₃CN (methylations with methyl iodide in 63–98% yields) or K₂CO₃/DMF (ethyl, acetyl, acetonitrile, benzyl, or ethyl acetate substituents in 40–99% yields).

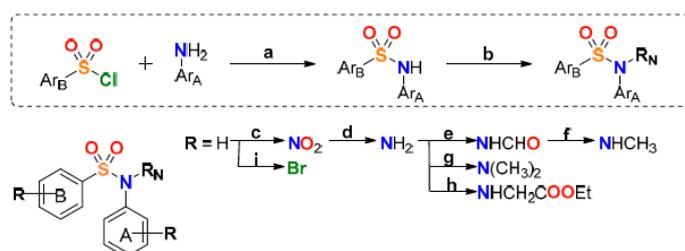
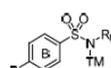
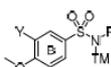


Figure 2. General synthetic approach. Reagents, conditions, and yields: (a) Pyridine, CH₂Cl₂, rt, 4–8 h, 90–96% (b) R_N = CH₃, CH₃I, KOH, CH₃CN, rt, 24 h, 63–98%; R_N = Ac, acetic anhydride, pyridine, CH₂Cl₂, reflux, 8–12 h, 61–83%; R_N ≠ CH₃ and Ac, R_N-halogen, K₂CO₃, dry DMF, rt, 24–48 h, 40–99% (c) *tert*-Butyl nitrite, CH₃CN, 45 °C, 24 h, 60% (d) H₂, Pd/C, EtOAc, rt, 48–72 h, 82–98% (e) Formic acid, CH₂Cl₂, rt, 24–48 h, 62–82% (f) Trichloroacetic acid, NaBH₄, dry THF, 0 °C, 24 h, 97% (g) Paraformaldehyde, NaBH₃CN, AcOH, MeOH, rt, 72–96 h, 95% (h) Ethyl 2-bromoacetate, NaI, acetone/THF 1:1, reflux, 48 h, 19% (i) NBS, CH₂Cl₂, rt, 6 h, 43%.

Table 1. Chemical structure, antiproliferative activity against human tumor cell lines, and Tubulin Polymerization Inhibition (TPI) of novel Microtubule Destabilizing Sulfonamides (MDS). Compounds have been divided into three different series according to the substituents on the aromatic B ring (Ar_B). TM: 3,4,5-trimethoxyphenyl.

Series 1:	Z	R _N	Compound	Antiproliferative Activity IC ₅₀ (nM)		TPI	
				HeLa	MCF7	10 μM	IC ₅₀ (μM)
	H	H	1a	240	375	0	>20
	H	SO ₂ -4-OMePh	1b	>1000	>1000	0	>20
	H	Me	2a	71	127	35	>20
	H	CH ₂ -Dim	2b	>1000	>1000	0	>20
	H	Et	3	99	87	25	>20
	H	EtBr	4	94	340	30	>20
	H	Ac	5	287	270	0	>20
	H	CH ₂ CN	6	143	275	0	>20
	H	CH ₂ COOEt	7	217	335	21	>20
	H	CH ₂ COOH	8	>1000	>1000	0	>20
	H	Benzyl	9	750	830	21	>20
	H	COOBenzyl	10	>1000	>1000	11	>20
	NO ₂	H	11	>1000	>1000	10	>20
	NH ₂	H	12	>1000	>1000	0	>20
	NH ₂	Me	13	>1000	>1000	0	>20
	NH ₂	CH ₂ -Dim	14	>1000	>1000	0	>20
	NHAc	H	15	>1000	>1000	0	>20
	NHAc	Me	16	>1000	>1000	0	>20
	NHCHO	H	17	>1000	>1000	4	>20
	N(CH ₃) ₂	H	18	>1000	>1000	0	>20
	N(CH ₃) ₂	Me	19	>1000	>1000	0	>20
	Br	H	20	>1000	>1000	0	>20
	Gly- <i>t</i> BOC	H	21	>1000	>1000	0	>20

Table 1. Cont.

Succinic	H	22	>1000	>1000	0	>20
-N=N-		23	>1000	>1000	0	>20
-N=CH-		24	>1000	>1000	0	>20
Series 2: 						
			Antiproliferative Activity IC ₅₀ (nM)		TPI	
			TPI %			
R	R_N	Compound	HeLa	MCF7	10 μM	IC₅₀ (μM)
NO ₂	H	25	>1000	>1000	0	>20
NH ₂	H	26	>1000	>1000	0	>20
NH ₂	Me	27	>1000	>1000	0	>20
N(CH ₃) ₂	H	28	230	173	0	>20
N(CH ₃) ₂	Me	29a	63	30	40	>20
N(CH ₃) ₂	CH ₂ -Dim	29b	>1000	>1000	0	>20
N(CH ₃) ₂	Et	30	66	81	45	>20
N(CH ₃) ₂	Ac	31	183	135	38	14
N(CH ₃) ₂	CH ₂ CN	32	55	120	17	>20
N(CH ₃) ₂	CH ₂ COOEt	33	99	91	14	>20
N(CH ₃) ₂	CH ₂ COOH	34	>1000	>1000	6	>20
N(CH ₃) ₂	Benzyl	35a	330	100	72	5.3
N(CH ₃) ₂	COOBenzyl	35b	>1000	>1000	0	>20
NHCHO	H	36	>1000	>1000	0	>20
NHCH ₃	H	37	607	>1000	7	>20
NHCH ₃	Me	38	44	61	47	10
Series 3: 						
			Antiproliferative Activity IC ₅₀ (nM)		TPI	
			TPI %			
Y	R_N	Compound	HeLa	MCF7	10 μM	IC₅₀ (μM)
NO ₂	H	40	>1000	>1000	0	>20
NH ₂	H	41	260	96	15	>20
NH ₂	Me	42	23	26	41	12
NH ₂	Et	43	38	14	37	>20
NH ₂	CH ₂ CN	44	60	8	5	>20
NH ₂	Benzyl	45	25	48	75	3.7
NHCH ₂ COOEt	Me	46	210	48	13	>20
NHCH ₂ COOEt	CH ₂ COOEt	47	>1000	>1000	0	>20
NHCH ₃	Me	48a	440	1190	2	>20
N(CH ₃) ₂	Me	48b	>1000	>1000	0	>20
Paclitaxel [52]			2.6	2.5	n.d. ¹	n.d.
Combretastatin A-4			2	1	100	3
ABT-751			388	180	69	4.4

¹ n.d.: not determined.

2.2. Replacement of CA-4 Olefin by a Sulfonamide Highly Increased Aqueous Solubility

Aqueous solubility of representative compounds was spectrophotometrically measured in pH 7.0 phosphate buffer (Table 2). UV absorbance at three maximum absorbance wavelengths of selected compounds was measured after 48 h shaking and subsequent microfiltration. Replacement of the CA-4 olefinic bridge by a sulfonamide group highly increased aqueous solubility when compared to paclitaxel and to CA-4 (4- up to 1700-fold increase). Similar or even better results were obtained when compared with the orally administered sulfonamide ABT-751 (up to 42-fold increase). The best results were achieved by the introduction of amino acid derivatives at the Z position (compounds 21 and 22).

Table 2. Aqueous solubility in $\mu\text{g/mL}$ of representative compounds.

Compound	Solub ($\mu\text{g/mL}$)	Compound	Solub ($\mu\text{g/mL}$)	Compound	Solub ($\mu\text{g/mL}$)
1a	83	22	1690	37	43
1b	108	23	41	38	16
2a	27	26	28	41	89
3	30	27	25	42	108
5	38	28	15	43	58
6	33	29a	7	44	46
11	88	29b	4	45	14
12	158	30	6	CA-4	1
15	230	31	18	ABT-751	40
20	87	32	8	Paclitaxel	<2
21	357	36	27	[23–25]	–
				–	–

2.3. MDS Inhibit Cell Proliferation in Breast, Cervix, and Ovarian Tumor Cells

The *in vitro* antiproliferative activity of MDS at 1 μM after 72 h treatments was evaluated by a colorimetric method against the human tumor cell lines HeLa (cervix epithelioid carcinoma) and MCF7 (breast adenocarcinoma). Compounds showing more than 40% inhibition at 1 μM in at least three independent assays were evaluated in a range of concentrations between 0.1 nM and 10 μM for the determination of half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) (Table 1). Paclitaxel [52], CA-4, and ABT-751 were used as references.

HeLa and MCF7 cells showed similar sensitivities to MDS, both cell lines displayed less than two-fold changes in IC_{50} values between them in most cases. The most potent compounds (e.g., 29a, 30, 38, 42, 43, 44, and 45) showed IC_{50} values in the double-digit nanomolar range, less potent than paclitaxel and CA-4 but more than ABT-751. Substitutions on the trimethoxyphenyl ring resulted in inactive compounds (11–24). Alkylations of the sulfonamide improved the potency, with methyl groups yielding the lowest IC_{50} values in most cases (e.g., 29a, 30, and 42). Larger substituents gave worse results except for some benzyl (e.g., 45) and cyanomethyl (e.g., 44) derivatives. Replacement of the 4-methoxy group on the B ring in series 1 by an amino substituent (series 2) and introduction of an amino group on position 3 as a primary amine (series 3) gave favorable results. Substituents with a hydrogen bond donor, such as methylamines (38) in series 2, or primary amines in series 3 (42–45), resulted in the most potent MDS. Based on antiproliferative results, we selected 3 out of the 7 most potent compounds (38, 42, and 45) as representative leaders for further investigation.

The *in vitro* antiproliferative activity of compounds 38, 42, and 45 against a panel of five human ovarian carcinoma cell lines (SKOV3, IGROV-1, A2780, OVCAR-8, and OVCAR-3) was evaluated by a colorimetric method (Table 3) and compared with paclitaxel [14]. Paclitaxel and MDS showed a similar comparative behavior against the highly paclitaxel-sensitive A2780 and OVCAR-8 and the less sensitive IGROV-1 cell line, with paclitaxel being one order of magnitude more potent than MDS. Concerning OVCAR-3, paclitaxel is less potent, but MDS maintain their potency range, thus resulting in similar effects of both types of drugs. For SKOV3, the potency reduction observed for paclitaxel together with a sustained or improved (42 with a 7 nM IC_{50} value) potency for MDS results in a more favorable profile of the MDS compared to paclitaxel.

2.4. Lead Compounds Overcome MDR-Mediated Resistance

The antiproliferative activity of MDS against the CA-4-resistant cell line HT-29 (colon adenocarcinoma) in the absence or the presence of 10 μM verapamil, a non-selective Pgp/MDR1 inhibitor, was measured 72 h post-treatment by a colorimetric method (Supplementary Table S1). Verapamil itself did not affect cell proliferation at that concentration. Detecting changes in drug potency when inhibiting MDR-mediated efflux reflect that these transporters reduce the intracellular drug concentration. HT-29 has been

reported to express moderate levels of MDR1, accounting for a resistant phenotype [53]. A comparison of the antiproliferative IC₅₀ values of each MDS in the presence or absence of verapamil provides an estimate of the susceptibility of each compound to efflux pumps. Most of the compounds, including leading derivatives 38, 42, and 45 (Table 4 and Supplementary Table S1), showed no significant differences (up to two-fold change) between pairs of IC₅₀ values, thus suggesting that they are not substrates of MDR pumps. Compounds 3, 29a, and 30 showed higher potencies against HT-29 cells when combined with verapamil (comparables to that of obtained against sensitive HeLa and MCF7 cells), thus validating the assay as positive controls.

Table 3. Antiproliferative activity of the lead compounds and paclitaxel against several human ovarian tumor cell lines.

Compound	Antiproliferative Activity IC ₅₀ (nM)				
	SKOV3	IGROV-1	A2780	OVCAR-8	OVCAR-3
38	46	248	68	74	31
42	7	400	42	37	72
45	48	492	104	48	58
Paclitaxel ¹	81	39	3	6	17

¹ IC₅₀ values against A2780, OVCAR-8, and OVCAR-3 cell lines from Bicaku, E. et al. evaluation [14].

Table 4. Antiproliferative activity against the CA-4 resistant cancer cell line HT-29 and sensitivity of the lead MDS to MDR pumps.

Compound	Antiproliferative Activity IC ₅₀ (nM)	
	HT-29	HT-29 Verapamil 10 μM
38	59	50
42	81	79
45	300	276
CA-4	305	327

2.5. Lead Compounds Induce G₂/M Arrest in Breast, Ovarian and Cervix Tumor Cells

The effect of the lead MDS on the cell cycle of MCF7, SKOV3, and HeLa cells was analyzed in time-course experiments at 24, 48, and 72 h post-treatment by DNA staining and flow cytometry quantification. The working concentration for each compound (600 nM for 38, 50 nM for 42, and 400 nM for 45) was established at the complete inhibition of cell proliferation in view of individually assays run in parallel for each cell line.

For breast adenocarcinoma MCF7 cells (Figure 3a) a pronounced and sustained G₂/M arrest was observed for all the treatments from 24 h (70–80%) to 72 h (60–76%), compared to untreated MCF7 cells, which maintained a 32–40% population at G₂/M throughout the time course. A moderate increase of the percentage of cells at the SubG₀/G₁ region was observed, which slightly increased over time (from 4–6% at 24 h to 6–12% at 72 h) accompanied by the decrease in the G₂/M population.

Compounds 38, 42, and 45 (Figure 3b) arrested ovarian carcinoma SKOV3 cells at the G₂/M phase 24 h post-treatment (44%) compared to untreated cells (30%). The percentage of SubG₀/G₁ treated SKOV3 cells was already elevated at 24 h (20% to 22%) compared to untreated controls (always <14%). Treatments with compounds 38 and 42 increased the percentage of SubG₀/G₁ modestly at 48 h (35% and 34%, respectively), and notably at 72 h (43% and 53%, respectively). This increase presumably occurred at the expense of cells arrested at the G₂/M phase. The effect of compound 45 was notably higher, with 46% of cells at SubG₀/G₁ region 48 h post-treatment and 63% at 72 h.

Treatment of HeLa cells with 38 and 45 (Figure 3c) caused a significant arrest at the G₂/M phase after 24 h (80%) and a more modest one for compound 42 (44%) accompanied by a limited increase in the percentage of cells of the SubG₀/G₁ population (9–16% vs. <4% in untreated controls). At subsequent time points, around 50% of the cells for all three

treatments were allocated to the SubG₀/G₁ region of the cell cycle histogram at the expense of the G₂/M phase.

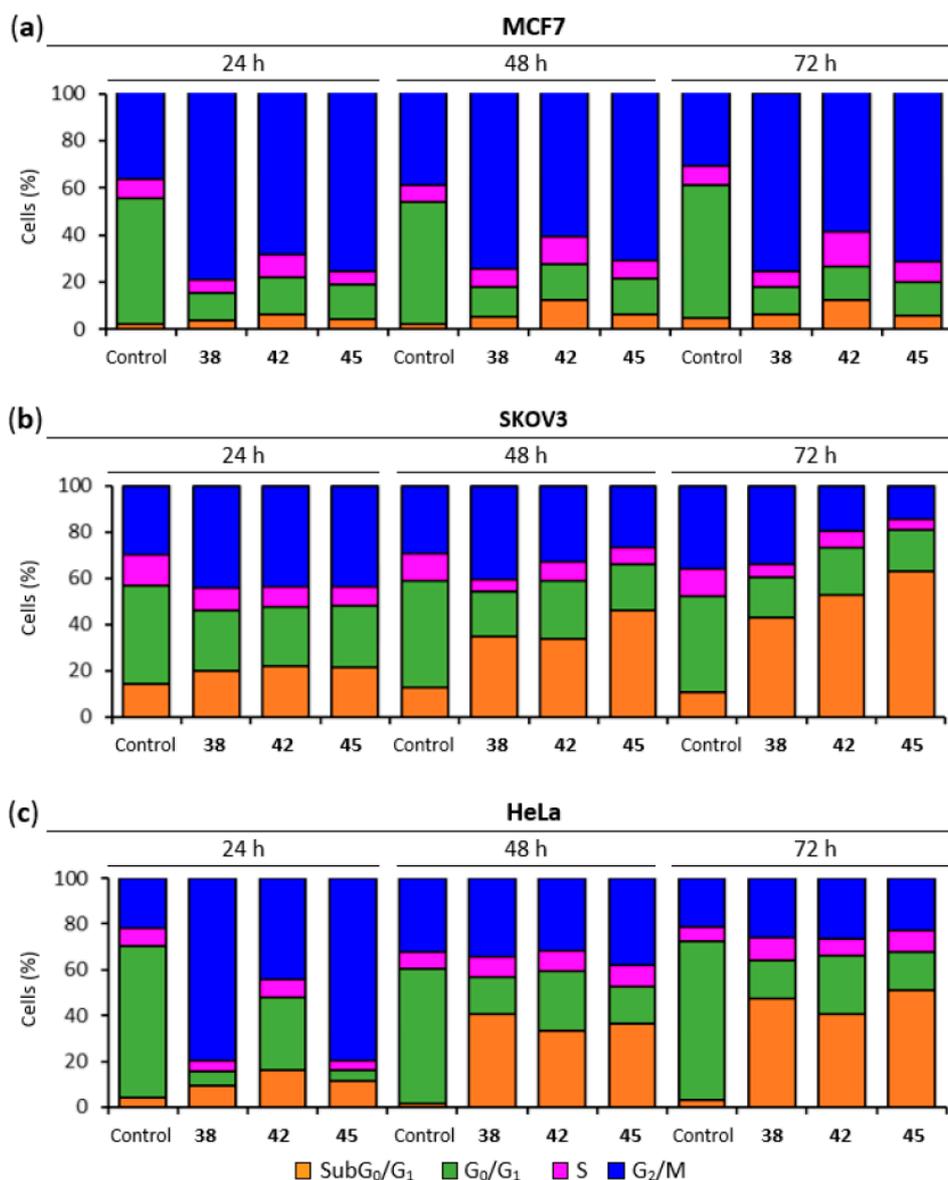


Figure 3. Cell cycle analysis. (a) MCF7 cell cycle distribution. Cells were arrested in G₂/M phase. (b) SKOV3 cell cycle distribution. Cells arrested in G₂/M phase experienced time-dependent cell death (SubG₀/G₁ region). (c) HeLa cell cycle distribution. Cells were arrested in the G₂/M phase followed by cell death (SubG₀/G₁ region). Cells were incubated with the lead compounds at 600 nM (38), 50 nM (42), or 400 nM (45) for 24, 48, and 72 h, stained with propidium iodide (PI) and their DNA content was analyzed by flow cytometry. Untreated samples were analyzed in parallel. The different cell cycle populations were quantified, expressed in percentages, and represented in bar charts. Data shown are representative of three independent experiments.

2.6. Lead Compounds Trigger Apoptotic Cell Death

To determine whether the cytotoxic/antiproliferative effect of the MDS was due to apoptosis induction, cells were treated with variable concentrations of the drug for 72 h or 6 days, stained with Annexin V-FITC (AnV) and propidium iodide (PI), and analyzed by flow cytometry. Double negative cells (AnV⁻/PI⁻) were classified as live cells (L), cells positive for AnV and negative for PI (AnV⁺/PI⁻) were considered in Early Apoptosis (EA), cells negative for AnV and positive for PI (AnV⁻/PI⁺) were considered necrotic (N), and double-positive cells (AnV⁺/PI⁺) as Late Apoptosis (LA). In all cases, the compounds were used at the same concentrations previously used in cell cycle studies (Table 5).

Table 5. Cell death quantification in Annexin V-FITC/PI double staining experiments. MCF7, SKOV3, and HeLa cells were incubated with the lead compounds for 72 h and/or 6 days, stained with Annexin V-FITC (AnV) and PI, and analyzed by flow cytometry. The results are expressed in percentage as the average of three independent experiments. Untreated samples were analyzed in parallel. Cells were classified into double-negatives (live cells), AnV-positive cells (early apoptosis), double-positives (late apoptosis), and PI-positive cells (necrosis).

Compound	Annexin V-FITC/PI 72 h (%)				Annexin V-FITC/PI 6 Days (%)				
	Live	EA ¹	LA ²	Necrosis	Live	EA	LA	Necrosis	
MCF7	38 (600 nM)	60.5	29.0	5.4	5.1	52.0	45.0	2.7	0.3
	42 (50 nM)	87.7	8.5	2.3	1.4	79.1	18.9	1.7	0.3
	45 (400 nM)	70.5	20.1	7.5	1.9	56.7	39.3	3.8	0.3
	CA-4 (50 nM)	58.3	31.7	3.3	6.7	44.5	52.4	2.7	0.4
	Control	93.6	1.8	2.9	1.7	97.4	0.2	0.8	1.6
SKOV3	38 (600 nM)	62.3	30.5	5.4	1.8				
	42 (50 nM)	85.1	12.2	2.0	0.7				
	45 (400 nM)	72.7	23.4	2.6	1.3				
	Paclitaxel (10 nM)	90.7	3.8	3.1	2.4				
	Control	99.2	0.5	0.3	0.1				
HeLa	38 (600 nM)	0.6	1.1	87.6	10.6				
	42 (50 nM)	7.3	1.4	82.0	9.4				
	45 (400 nM)	0.8	1.5	84.9	12.7				
	Control	90.5	1.7	5.5	2.4				

¹ Early Apoptosis (EA). ² Late Apoptosis (LA).

Breast cancer MCF7 cells treated with compound 42 for 72 h were mostly classified as live cells (88%), whereas lower percentages of live cells were found when treated with compounds 38 (60%), 45 (71%) and the reference compound CA-4 (58%). This lower percentage of live cells was accompanied by a higher proportion of EA cells for 38 (29%), 45 (20%), and CA-4 (32%) compared to the treatment with 42 (9%). Longer treatment exposures of 6 days confirmed this trend, with 38, 45, and CA-4 showing significantly lower percentages of live cells (45–57%) and higher EA populations (39–52%) than 42, which showed live-cell percentages of 79% and EA of 19%.

Similar results were found 72 h post-treatment for SKOV3 ovarian tumor cells for MCF7 cells. SKOV3 cells treated with compounds 38 and 45 showed modest percentages of EA cells (31% and 23%, respectively) whereas a lower apoptotic population was found for compound 55 (12%). These percentages of apoptotic cells for compounds 38 and 55 were accompanied by low percentages of live cells (62% and 73%, respectively), with 10 nM paclitaxel showing high percentages of live cells (91%).

Treatment of the cervical cancer HeLa cells with compounds 38, 42, and 45 resulted in a severe reduction of live cells down to less than 7% and an accumulation of LA (82–88%) and necrotic (9–13%) cells after 72 h.

2.7. Lead Compounds Disrupt the Microtubule Network and Inhibit Tubulin Polymerization

The effect of MDS 38 and 45 on the tubulin cytoskeleton was analyzed in MCF7, SKOV3, and HeLa cells after 72-h treatments. The microtubule network was visualized by confocal microscopy staining α -tubulin in green, and cell nuclei were stained in blue with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Figure 4). Compounds 38 and 45 disrupted the microtubule system of MCF7, SKOV3, and HeLa cells (Figure 4a), which loses the hairy appearance of untreated cells and shows up as a diffuse gauze. Treated cells showed multilobulated nuclei resembling bunches of grapes (Figure 4b).

The effect of all the synthesized compounds on the *in vitro* tubulin polymerization was evaluated at 10 μ M. All the compounds that inhibited polymerization more than 30% were also assayed at 20 μ M. IC_{50} values were calculated for those compounds inhibiting tubulin polymerization by at least 50% at 20 μ M (Table 1 and Supplemental Figure S2). Most antiproliferative *N*-alkylated sulfonamides interfere to a greater or lesser extent with tubulin polymerization, with the highest effect shown by compound 45 (IC_{50} = 3.7 μ M), with a benzyl group on the sulfonamide nitrogen, close to CA-4 (IC_{50} = 3 μ M) and better than ABT-751 (IC_{50} = 4.4 μ M). Compounds 38 and 42 showed moderate to good IC_{50} values of 10 and 12 μ M, respectively.

The binding mode of the active compounds at the colchicine site of tubulin was studied by flexible docking studies. The protein conformational variability was represented by using 55 protein structures with different binding sites, as previously described [54,55]. Two frequently used docking programs with different scoring functions were used for the flexible docking of the ligands in the binding sites. Several thousand poses were generated for each ligand which were automatically classified according to their occupation of the subsites of the colchicine domain, and the poses with the best consensus scores were selected (Figure 5). The selected ligands bind in similar dispositions to combretastatin A-4, with a good overlap of the trimethoxyphenyl ring, which is inserted edgewise towards the surface of sheets S8 and S9 between the sidechains of Ala316 β , Val318 β , Ala354 β , and covered by helices H7 and H8 and the H7-H8 loop and interacting with Cys241 β , Leu242 β , Leu248 β , Ala250 β , and Leu255 β . The sulfonamide bridges are placed close to the olefin binding zone of CA-4, with the other aromatic ring behind helix H8 and above the sidechains of Ala316 β and the methylenes of Lys352 β , with the substituents on the sulfonamide nitrogen projecting towards a hydrophobic region of the interdimer interface, thus explaining the preference for small hydrophobic substituents such as methyl or cyanomethyl groups.

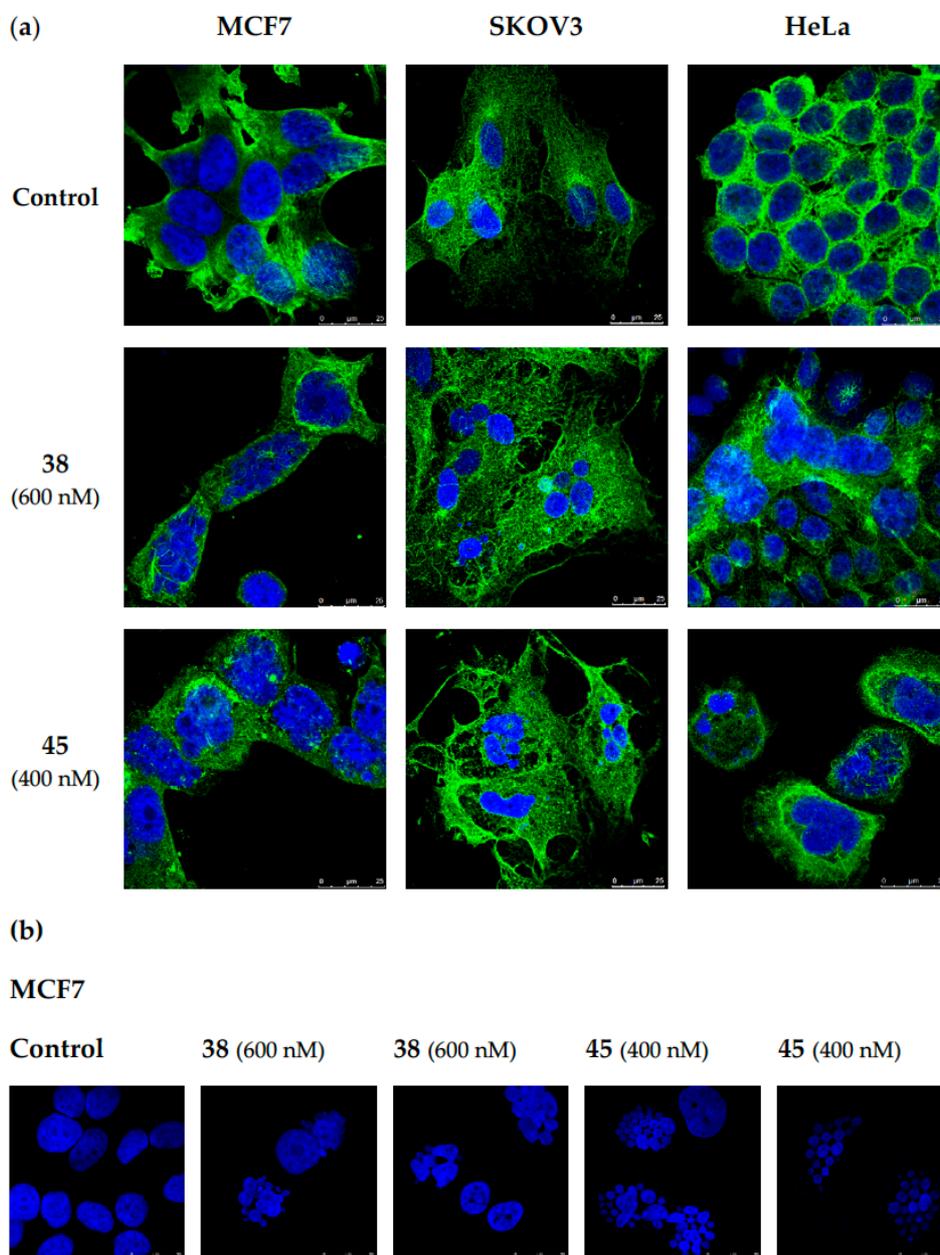


Figure 4. Confocal microscopy experiments in MCF7, SKOV3, and HeLa cells. Cells were incubated in the absence (Control) or the presence of 38 (600 nM) and 45 (400 nM) for 72 h. (a) Visualization of the microtubule network. α -Tubulin was stained in green, and nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence). (b) Multilobulated nuclei (blue) resembling bunches of grapes in MCF7 cells. Photomicrographs are representative of three independent experiments. Scale bar: 25 μ m.

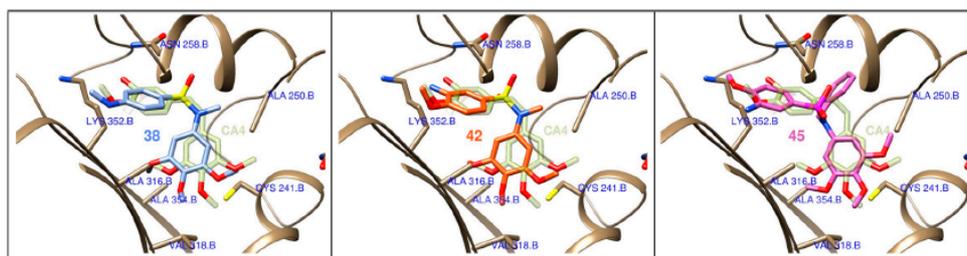


Figure 5. Docking poses for compounds 38, 42, and 45 at the colchicine site of tubulin. Combretastatin A-4 (CA-4) is shown in diffuse green as a reference.

3. Discussion

Taxanes—usually paclitaxel alone or in combination regimens—entail the first-line chemotherapy for breast and gynecological cancers [9,13,18,20]. However, limitations related to toxicity, pharmacokinetic problems, and the appearance of resistance [31] prompt the search for new treatments. This work has yielded a new family of tubulin inhibitors with a sulfonamide scaffold as hybrids of combretastatin A-4 and ABT-751, two colchicine site ligands in clinical trials that present shortcomings of opposite nature whose hybridization might alleviate (Figure 1).

Therefore, a focused library of sulfonamides was designed, and 52 representatives were synthesized following a synthetic methodology that involves first the assembly of the sulfonamide followed by functional group manipulations at different points of the main scaffold. A breadth of substituents was thus introduced to explore the chemical space for optimal pharmacokinetic and pharmacodynamic properties (Figure 1). One of the main drawbacks of taxanes and CA-4 is their low water solubility, making necessary drug administration as formulations with several associated adverse effects [27,28,47]. New sulfonamide derivatives show moderate to good solubilities (Table 2). Improvements up to 1700 times in solubility were found when compared with reference drugs paclitaxel and CA-4 and even surpass the solubility of the orally administered ABT-751 up to 42 times.

The antiproliferative activity of the synthesized compounds was evaluated against two Pan-Gyn representative human tumor cell lines (HeLa and MCF7) (Table 1). Many compounds showed growth inhibitory activities at submicromolar concentrations, thus validating the adequacy of the selected diarylsulfonamide scaffold. Most potent derivatives inhibited cell proliferation at very low drug concentrations, with IC_{50} values in the low to medium nanomolar range. Compounds 2a, 29a, 30, 32, 38, and 42–45 display antiproliferative IC_{50} values comparable to those of paclitaxel and CA-4 and better than ABT-751, a tubulin colchicine-site inhibiting sulfonamide in clinical trials used as a reference [49]. Alkylation of the sulfonamide nitrogen significantly increases potency compared to the unsubstituted sulfonamides, probably due to a combination of a favoring of the *cisoid* disposition of both aromatic rings, an essential requirement for colchicine-site-binding drugs, with a more favorable interaction with the target [56]. Small alkyl groups, such as methyl or ethyl (e.g., 2a, 29a, 38, or 42), are usually preferred over longer chains such as carboxylic acid derivatives. All the modifications attempted on the trimethoxyphenyl ring abolished the activity, whereas the introduction of hydrogen bond donor amines on the B ring translated into more potent analogs, such as the secondary amines in the *para* position of the sulfonamide group (38) and the primary amines *ortho* to the methoxy group of B ring (42–45). Both modifications improve the polarity and aqueous solubility. The potency improvement suggests favorable hydrogen bonding with the target. Thus, B-ring amines improve both the pharmacokinetics and the pharmacodynamics.

The antiproliferative IC_{50} values of each compound against HeLa and MCF7 cell lines were quite similar, whereas the CA-4-resistant HT-29 cell line was less or at best equally sensitive to MDS (Supplementary Table S1). When differences in antiproliferative potencies

occur, they are not due to multidrug-resistance by the described moderate expression of MDR1 or MDR3 proteins in HT-29 colon carcinoma cell line [48,53,57], as only a handful of compounds experienced a potency increase in the presence of the Ppg/MDR1 inhibitor, verapamil [58]. Therefore, none of our lead compounds (38, 42, and 45) seemed to be MDR substrates and even compounds 38 and 42 overcame the resistance shown by CA-4 in the HT-29 cell line (IC_{50} = 59, 81, and 305 nM, respectively) (Table 4).

The microtubule disruption caused by the lead compounds in MCF7 cells wended up in the accumulation of cells in the G_2/M region (Figure 3a), as previously reported for CA-4 and ABT-751, used as references [59,60]. This sustained mitotic arrest lasted at least 72 h with percentages of cells showing DNA fragmentation below 12%. The mild response regarding this apoptotic marker is in line with the results observed in AnV/PI staining experiments (Table 5). Compounds 38 and 45 triggered phosphatidylserine exposure in 28–34% of MCF7 cells; 11% in the case of 42. The lack of PI staining within the apoptotic population reveals the integrity of the plasma membrane in most Annexin V-positive cells. This slight apoptotic response might be related to the expression levels of caspase 3, the hub effector of the apoptotic machinery. MCF7 cells have been reported to be deficient in caspase 3 [61,62]. Despite MCF7 cells suffer a weak apoptotic response upon treatment with the lead compounds for 72 h, the percentage of early apoptotic cells increases after 6-day treatments, still preserving the integrity of the plasma membrane. This slow build-up of the apoptotic response in MCF7 cells may putatively rely on the other two effector caspases 6 and 7, as described for DNA damaging agents [11,63,64].

Lead compounds 38, 42, and 45 were then assayed against a panel of human ovarian tumor cell lines. Ovarian serous adenocarcinoma cell lines (SKOV3, OVCAR-8, and OVCAR-3), the most common type of ovarian cancer, were more sensitive than endometrioid cell lines (IGROV-1 and A2780). The metastatic cell line SKOV3 was found quite resistant to paclitaxel and CA-4 (IC_{50} of 81 and 380 nM [65], respectively) but was sensitive to MDS (Table 3). Time-course analysis of the cell cycle distribution (Figure 3b) showed a strong mitotic arrest for 42, 38, and 45 24 h after treatment. The mitotic arrest readily triggered apoptosis 48 h after treatment. Compound 45 elicits a higher $SubG_0/G_1$ population than 38 and 42 at 72 h. Dual staining experiments confirm the apoptotic response with Annexin V-positive cells at 72 h ranging from 14–36%, notably higher when compared with paclitaxel (7%).

Studies on the mechanism of action of MDS on the cervical cancer cell line HeLa were also performed (Figure 3c). After the common mitotic arrest at G_2/M phase 24 h after treatment (more pronounced for 38 and 45 than for 42) HeLa cells exhibited strikingly high percentages of $SubG_0/G_1$ cells (around 50%) from 48 h after drug exposure. AnV/PI staining experiments revealed a strong and advanced apoptotic response with rates of double-positives cells above 82%, indicating the permeabilization of the plasma membrane.

At this point, we wished to verify if the observed effect was due to the disruption of microtubule assembly. Tubulin immunofluorescence analysis of cells treated with compounds 38 and 45 revealed a clear disruption in the microtubule network (Figure 4a). Furthermore, as interference with microtubule dynamics is expected to affect chromatin organization, cell nuclei were stained with DAPI. Accumulation of multiple micronuclei characteristic of mitotic catastrophe was observed, widely linked to tubulin-binding drugs [66,67]. In vitro tubulin polymerization inhibition experiments confirmed the effect of the compounds on tubulin, and molecular docking experiments suggest a similar binding mode to that of CA-4 to the colchicine site of tubulin (Figure 5). However, no correlation was observed between TPI and antiproliferative IC_{50} values, as has previously been found for many tubulin polymerization inhibitors [68]. This discrepancy can be explained by an antiproliferative effect dependent on the alteration of microtubule dynamics and not on polymer mass, as measured in TPI assays.

In conclusion, a new family of MDS has been designed and synthesized. MDS antiproliferative effects against several representative cell lines of Pan-Gyn cancers have been studied. The effects of the compounds vary depending on the structural modifi-

cations, the most potent derivatives being those with a small alkyl substituent on the sulfonamide nitrogen. The molecular mechanism of action studies revealed a pronounced G₂/M arrest mainly followed by a SubG₀/G₁ increase over time. The different behavior between MCF7, SKOV3 and HeLa cells seems to be related to the rate at which each cell line builds up its apoptotic response to the initial unsolved mitotic arrest. Inhibition of tubulin polymerization in vitro was observed for most potent MDS, as well as disruption of microtubule network by immunofluorescence, probably by binding similarly to CA-4 to the colchicine site of tubulin. The improved aqueous solubility, lack of Pgp-mediated resistance, and antiproliferative potencies comparable to paclitaxel—first-line treatment of Pan-Gyn cancers—make MDS interesting for future application as antitumor agents.

4. Materials and Methods

4.1. Chemistry

4.1.1. Chemical Synthesis

Detailed synthetic procedures and characterization of compounds can be found in Supplemental methods SP1 and SP2.

4.1.2. Chemical Characterization of Lead MDS 38, 42, and 45

MDS 38. M.p.: 147–150 °C (CH₂Cl₂/Hexane). IR (KBr): 3390, 1599, 1502, 835 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.83 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.71 (6H, s), 3.80 (3H, s), 6.28 (2H, s), 6.51 (2H, d, J = 8.8), 7.35 (2H, d, J = 8.8). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 30.0 (CH₃), 38.4 (CH₃), 56.1 (2CH₃), 60.8 (CH₃), 104.6 (2CH), 110.8 (2CH), 122.6 (C), 130.0 (2CH), 137.2 (C), 137.8 (C), 152.7 (C), 152.8 (2C). HRMS (C₁₇H₂₂N₂O₅S + H⁺): calcd 367.1322 (M + H⁺), found 367.1325.

MDS 42. M.p.: 124–126 °C (MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.11 (3H, s), 3.73 (6H, s), 3.83 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.94 (2H, s), 6.30 (2H, s), 6.78 (1H, d, J = 8.8), 6.90 (1H, d, J = 2.4), 6.99 (1H, dd, J = 8.8 and 2.4). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 38.5 (CH₃), 55.7 (CH₃), 56.0 (2CH₃), 60.8 (CH₃), 104.6 (2CH), 109.1 (CH), 113.2 (CH), 118.8 (CH), 128.0 (C), 136.5 (C), 137.3 (C), 137.7 (C), 150.2 (C), 152.8 (2C). HRMS (C₁₇H₂₂N₂O₆S + H⁺): calcd 383.1271 (M + H⁺), found 383.1263.

MDS 45. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.63 (6H, s), 3.78 (3H, s), 3.93 (3H, s), 4.63 (2H, s), 6.14 (2H, s), 6.83 (1H, d, J = 8.4), 7.02 (1H, d, J = 2), 7.11 (1H, dd, J = 8.4 and 2), 7.23 (5H, bs). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 55.3 (CH₂), 55.8 (CH₃), 55.9 (2CH₃), 60.8 (CH₃), 106.7 (2CH), 109.3 (CH), 113.1 (CH), 118.8 (CH), 127.6 (CH), 128.3 (2CH), 128.7 (2CH), 130.5 (C), 134.9 (C), 136.2 (C), 136.6 (C), 137.6 (C), 150.3 (C), 152.7 (2C). HRMS (C₂₃H₂₆N₂O₆S + H⁺): calcd 459.1584 (M + H⁺), found 459.1589.

4.1.3. Aqueous Solubility

The aqueous solubility of the sulfonamides was determined using an approach based on the saturation shake-flask method. Tested compounds (1–2 mg) were stirred in pH 7.0 phosphate buffer (300 µL) for 48 h at room temperature. The resulting suspension was filtered over a 45 µm filter to discard insoluble residues, and the concentration in the supernatant was measured by UV absorbance. To determine the concentration, a scan between 270 and 400 nm was performed in a Helios-α UV-320 Spectrophotometer (Thermo-Spectronic, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) for each tested compound. Then, three maximum wavelengths of absorbance per compound were selected from the previous scan and calibration curves were performed at these three wavelengths. Solubility results are given as the average of the three measurements.

4.2. Biological Evaluation

4.2.1. Cell Lines and Cell Culture Conditions

MCF7 (human breast carcinoma), SKOV-3 (human ovarian carcinoma), OVCAR-3 (human ovarian carcinoma), OVCAR-8 (human ovarian carcinoma), and HeLa (human cervical carcinoma) cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

(Gibco, Thermo Fischer Scientific) containing 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum (HIFBS) (Lonza-Cambrex, Karlskoga, Sweden), 2 mM L-glutamine (Lonza-Cambrex, Karlskoga, Sweden), 100 µg/mL streptomycin, and 100 IU/mL penicillin (Lonza-Cambrex) at 37 °C in humidified 95% air and 5% CO₂. HT-29 (human colon carcinoma), IGROV-1 (human ovarian carcinoma), and A2780 (human ovarian carcinoma) cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fischer Scientific) supplemented with 10% HIFBS, 100 µg/mL streptomycin, and 100 IU/mL penicillin at 37 °C in humidified 95% air and 5% CO₂ atmosphere. The presence of mycoplasma was routinely checked with MycoAlert kit (Lonza-Cambrex) and only mycoplasma-free cells were used in the experiments. Ovarian tumor cell lines were originally acquired from Dr Atanasio Pandiella from Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca, Spain. HeLa, HT-29 and MCF7 tumor cell lines were provided by Dr Faustino Mollinedo from Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid, Spain.

4.2.2. Cell Proliferation Assay

MCF7, HeLa, and HT-29 cell proliferation, when treated with the corresponding compounds, were determined using the XTT (sodium 3'-[1(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzenesulfonic acid hydrate) cell proliferation kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). A freshly prepared mixture of XTT labeling reagent with 0.02% (*v/v*) PMS (*N*-methyl-dibenzopyrazine methyl sulfate) electron coupling reagent was added to cells (50 µL/well in 96-well plates, total volume of 160 µL/well). Cells were incubated under standard culture conditions for 4 h (MCF7 and HeLa) or 6 h (HT-29). The absorbance of the formazan product generated was measured at 450 nm using a multi-well plate reader. SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-8, IGROV-1, A-2780 cell proliferation, when treated with the corresponding compound, were determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). MTT in Phosphate Buffer Saline (PBS) (5 mg/ml) was added to cells (110 µL/well in 24-well plates, total volume of 1110 µL/well). After 1 hour of incubation, the medium was aspirated, and formazan violet crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (500 µL/well). Absorbance was measured at 570 nm in a plate reader (Ultra Evolution, Tecan, Männedorf, Suiza). To determine cell viability, cells in exponential growth phase were seeded (100 µL/well in 96-well plates and 1000 µL/well in 24-well plates) with appropriate cell line concentration (1.5·10⁴ cells/mL for MCF7 and HeLa, 3·10⁴ cells/mL for HT-29, and 1·10⁴ cells/mL for SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-8, IGROV-1, and A-2780) in complete RPMI 1640 or DMEM medium at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. After 24 h incubation, to allow cells to attach to the plates, all compounds were added at 1 µM concentration and the effect on the proliferation was evaluated 72 h post-treatment. Compounds showing antiproliferative effects at tested concentration were selected for IC₅₀ calculation (50% inhibitory concentration with respect to the untreated controls) from 10⁻⁵ to 10⁻¹⁰ M concentration. Non-linear curves fitting the experimental data were carried out for each compound. Compounds were dissolved in DMSO and the final solvent concentrations never exceeded 0.5% (*v/v*). The control wells included treated cells with 0.5% (*v/v*) DMSO and the positive control. 10 µM verapamil was included as a control for the HT-29 cell line. Measurements were performed in triplicate, and each experiment was repeated three times.

4.2.3. Cell Cycle Analysis

Cell cycle analysis was performed in MCF7, SKOV-3, and HeLa cells by quantifying the DNA content by flow cytometry. Cells in the exponential growth phase at 2·10⁴ cells/mL were seeded in 24-well plates (1 mL/well). After 24 h incubation, cells were treated with different concentrations of the selected compounds and the effect of treated and untreated cells was measured 24, 48, and 72 h post-treatment. Live and dead cells were collected and fixed in ice-cold ethanol/PBS (7:3) and stored at 4 °C for later use. Cells were rehydrated with PBS, treated with 100 µg/mL RNase A (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and

stained overnight in darkness at room temperature with 50 µg/mL PI (Sigma-Aldrich Co.). Cell cycle profiles were then analyzed by flow cytometry using BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences, San José, CA, USA). Data were analyzed with BD Accuri™ C6 Software (version 1.0.264.21, BD Biosciences, San José, CA, USA) and compared to control cells. Compounds were dissolved in DMSO and the final solvent concentration never exceeded 0.5% (*v/v*). Control wells included cells with 0.5% (*v/v*) DMSO.

4.2.4. Apoptotic Cell Death Quantification

MCF7, SKOV-3, and HeLa apoptotic cells were quantified using an Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit (Immunostep, Salamanca, Spain) according to the manufacturer's guidelines. 1.5 mL/well of cells in the exponential growth phase at $2 \cdot 10^4$ cells/mL were seeded onto 12-well plates and left to attach overnight. After 24 h incubation, cells were treated with selected compounds. After 72 h (MCF7, SKOV-3, and HeLa) and 6 days (MCF7) post-treatment, attached and floating cells of treated and untreated wells were collected, centrifuged, resuspended in Annexin V binding buffer, and stained with Annexin V-FITC/PI. Cells were then incubated in darkness at room temperature for 15 min and a total of 30,000 cells were acquired and analyzed using the BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer and Software (version 1.0.264.21, BD Biosciences, San José, CA, USA), respectively. Compounds were dissolved in DMSO and the final solvent concentration never exceeded 0.5% (*v/v*). Control wells included cells with 0.5% (*v/v*) DMSO.

4.2.5. Immunofluorescence

MCF7, SKOV-3, and HeLa cells were grown on glass coverslips coated with poly-L-lysine (12 mm diameter). To reach appropriate cell confluence, coverslips were manipulated in 6-well plates (3 coverslips/well) seeding 3 mL/well of cells in the exponential growth phase at 2×10^4 cells/mL. After 24 h incubation, cells were treated with selected compounds and incubated for 72 h. Cells were washed with PBS, fixed with 4% formaldehyde in PBS for 10 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Boehringer Mannheim, Ingelheim am Rhein, Germany) in PBS for 10 min and blocked with 10% BSA in PBS for 30 min. Microtubule detection was performed by incubation with anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (1:200 in 3% BSA/PBS) (Sigma-Aldrich) for 1.5 h. After PBS washing, coverslips were incubated with fluorescent secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:400 in 1% BSA/PBS) (Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) for 1 h in darkness. After being washed with PBS, cell nuclei were stained with DAPI (dihydrochloride of 4',6-diamidino-2-phenylindole) (diluted 1:10,000 in mq H₂O) (Roche, Basel, Switzerland) for 5 min in darkness. DAPI excess was removed by washing with PBS. Mowiol reagent (Calbiochem, Sigma-Aldrich) was used to mount preparations on slides. Cells were analyzed by confocal microscopy using a LEICA SP5 microscope DMI-6000V model coupled to a LEICA LAS AF software computer.

4.2.6. Tubulin Isolation

Microtubular protein was isolated from calf brain according to the modified Shelanski method [69,70] by two cycles of temperature-dependent assembly/disassembly and stored at -80 °C. Before each use, protein concentration was determined by the Bradford method [71] taking BSA as standard.

4.2.7. Tubulin Polymerization Inhibition (TPI) Assay

Tubulin polymerization was monitored using a Helios α spectrophotometer by measuring the increase in turbidity at 450 nm, caused by a shift from 4 °C to 37 °C, which allows the *in vitro* microtubular protein to depolymerize and polymerize, respectively. The assay was carried out in quartz cuvettes containing 1.5 mg/mL microtubular protein and the ligand (except for control cuvette with only DMSO at the same concentration) in a mixture of 0.1 M MES buffer, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM β -ME, and 1.5 mM GTP at pH 6.7 (final volume 500 µL). Cuvettes were preincubated at 20 °C for 30 min, to allow

ligand binding to tubulin, and subsequently cooled on ice for 10 min. Then, the experiment starts at 4 °C to establish the initial baseline. The assembly process was initiated by a temperature shift to 37 °C and the turbidity produced by tubulin polymerization can be measured by an absorbance increase. After reaching a stable plateau, the temperature was switched back to 4 °C to return to the initial absorption values (to confirm the reversible nature of the monitored process and to determine whether or not the microtubular tubular protein has stabilized). The difference in amplitude between the stable plateau and the initial baseline of the curves was taken as the degree of tubulin polymerization for each experiment. Comparison with control curves under identical conditions but without ligands yielded TPI as a percentage value. All compounds were tested at 10 µM concentration. Compounds that inhibited tubulin polymerization by at least 30% at 10 µM were tested at 20 µM. IC₅₀ values were calculated for compounds that inhibit tubulin polymerization by more than 50% at 20 µM. Compounds were dissolved in DMSO, and the final solvent concentration never exceeded 4% (v/v), which has been reported not to interfere with the assembly process. All the measurements were carried out in at least two independent experiments using microtubular protein from different preparations.

4.3. Computational Studies

Docking studies were carried out as previously described [45]. Briefly, dockings were performed in parallel with PLANTS [72] with default settings and 10 runs per ligand and with AutoDock 4.2 [73] runs applying the Lamarckian genetic algorithm (LGA) 100–300 times for a maximum of 2.5×10^6 energy evaluations, 150 individuals, and 27,000 generations maximum. The retrieved poses were automatically assigned to the colchicine subzones using in-house KNIME pipelines [74]. The programs' docking scores were converted into Z-scores and the poses with best consensus scores were selected as the docking results. Docked poses were analyzed with Chimera [75], Marvin [76], OpenEye [77], and JADOPPT [78].

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1907/s1>, Figure S1: Synthetic procedures of new Microtubule Destabilizing Sulfonamides, Table S1: Antiproliferative activity against HT-29 and sensitivity to MDR pumps, Figure S2: Tubulin Polymerization Assay data. IC₅₀ calculation, Methods SP1: Chemistry. General chemical techniques and chemical synthesis, Methods SP2: ¹H NMR and ¹³C NMR spectra

Author Contributions: Conceptualization, M.G. and R.P.; Data curation, M.G. and R.P.; Formal analysis, M.G., M.O.-S., A.V.-B. and A.B.H.; Funding acquisition, R.G.-S. and R.P. Investigation, R.Á., M.M., R.G.-S. and R.P.; Methodology, M.G. and M.O.-S.; Project administration, R.G.-S. and R.P.; Resources, R.G.-S. and R.P.; Software, R.P.; Supervision, R.G.-S. and R.P.; Validation, M.M., R.G.-S. and R.P.; Visualization, M.G. and M.O.-S.; Writing—original draft, M.G.; Writing—review and editing, A.V.-B., A.B.H., M.M., R.G.-S. and R.P.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (SA030U16, SA262P18 and SA116P20), co-funded by the EU's European Regional Development Fund-FEDER, the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (RTI2018-099474-BI00) and the health research program of the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, PI16/01920 and PI20/01569) co-funded with FEDER funds.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank the people at Frigoríficos Salamanca S.A slaughterhouse for providing us with the calf brains, "Servicio General de NMR" and "Servicio General de Espectrofotometría de Masas" of the University of Salamanca for equipment. M.G. acknowledges a predoctoral fellowship from the Junta de Castilla y León (ORDEN EDU/529/2017 de 26 de junio). M.O.-S. acknowledges

a predoctoral fellowship from the IBSAL (IBpredoc17/00010). A.V.-B. acknowledges a predoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU15/02457).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Berger, A.C.; Korkut, A.; Kanchi, R.S.; Hegde, A.M.; Lenoir, W.; Liu, W.; Liu, Y.; Fan, H.; Shen, H.; Ravikumar, V.; et al. A Comprehensive Pan-Cancer Molecular Study of Gynecologic and Breast Cancers. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 690–705.e9. [CrossRef] [PubMed]
- Hoadley, K.A.; Yau, C.; Hinoue, T.; Wolf, D.M.; Lazar, A.J.; Drill, E.; Shen, R.; Taylor, A.M.; Cherniack, A.D.; Thorsson, V.; et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **2018**, *173*, 291–304.e6. [CrossRef] [PubMed]
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [CrossRef]
- Rivera, E.; Gomez, H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: The evolving role of ixabepilone. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, S2. [CrossRef] [PubMed]
- Gonzalez-Angulo, A.M.; Morales-Vasquez, F.; Hortobagyi, G.N. Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer. In *Breast Cancer Chemosensitivity*; Madame Curie Biosci. Database; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013.
- Agarwal, R.; Kaye, S.B. Ovarian cancer: Strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 502–516. [CrossRef] [PubMed]
- Pokhriyal, R.; Hariprasad, R.; Kumar, L.; Hariprasad, G. Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients. *Biomark. Cancer* **2019**, *11*, 1179299X1986081. [CrossRef] [PubMed]
- Chaudhry, P.; Asselin, E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2009**, *16*, 363–380. [CrossRef] [PubMed]
- Moxley, K.M.; McMeekin, D.S. Endometrial Carcinoma: A Review of Chemotherapy, Drug Resistance, and the Search for New Agents. *Oncologist* **2010**, *15*, 1026–1033. [CrossRef]
- U.S. Food and Drug Administration. Available online: <https://www.fda.gov/> (accessed on 27 May 2020).
- Ofir, R.; Seidman, R.; Rabinski, T.; Krup, M.; Yavelsky, V.; Weinstein, Y.; Wolfson, M. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 636–642. [CrossRef]
- Jayson, G.C.; Kohn, E.C.; Kitchener, H.C.; Ledermann, J.A. Ovarian cancer. *Lancet* **2014**, *384*, 1376–1388. [CrossRef]
- McGuire, W.P.; Markman, M. Primary ovarian cancer chemotherapy: Current standards of care. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, S3–S8. [CrossRef]
- Bicaku, E.; Xiong, Y.; Marchion, D.C.; Chon, H.S.; Stickles, X.B.; Chen, N.; Judson, P.L.; Hakam, A.; Gonzalez-Bosquet, J.; Wenham, R.M.; et al. In vitro analysis of ovarian cancer response to cisplatin, carboplatin, and paclitaxel identifies common pathways that are also associated with overall patient survival. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 1967–1975. [CrossRef] [PubMed]
- Ozols, R.F.; Bundy, B.N.; Greer, B.E.; Fowler, J.M.; Clarke-Pearson, D.; Burger, R.A.; Mannel, R.S.; DeGeest, K.; Hartenbach, E.M.; Baergen, R.; et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 3194–3200. [CrossRef] [PubMed]
- Ghersi, D.; Wilcken, N.; Simes, R.J. A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]
- Friedrichs, K.; Hölzel, F.; Jänicke, F. Combination of taxanes and anthracyclines in first-line chemotherapy of metastatic breast cancer: An interim report. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 1730–1738. [CrossRef]
- Telli, M.L.; Carlson, R.W. First-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **2009**, *9*, S66–S72. [CrossRef] [PubMed]
- Piccatt-Gebhart, M.J.; Burzykowski, T.; Buyse, M.; Sledge, G.; Carmichael, J.; Lück, H.J.; Mackey, J.R.; Nabholz, J.M.; Paridaens, R.; Biganzoli, L.; et al. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 1980–1986. [CrossRef] [PubMed]
- Pectasides, D.; Pectasides, E.; Economopoulos, T. Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, *33*, 177–190. [CrossRef] [PubMed]
- Serkies, K.; Jassem, J. Systemic therapy for cervical carcinoma—Current status. *Chin. J. Cancer Res.* **2018**, *30*, 209–221. [CrossRef]
- Boussios, S.; Seraj, E.; Zarkavelis, G.; Petrakis, D.; Kollas, A.; Kafantari, A.; Assi, A.; Tatsi, K.; Pavlidis, N.; Pentheroudakis, G. Management of patients with recurrent/advanced cervical cancer beyond first line platinum regimens: Where do we stand? A literature review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *108*, 164–174. [CrossRef] [PubMed]
- Konno, T.; Watanabe, J.; Ishihara, K. Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *65*, 209–214. [CrossRef]
- Hamada, H.; Ishihara, K.; Masuoka, N.; Mikuni, K.; Nakajima, N. Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *102*, 369–371. [CrossRef] [PubMed]
- Yang, T.; Cui, F.-D.; Choi, M.-K.; Lin, H.; Chung, S.-J.; Shim, C.-K.; Kim, D.-D. Liposome Formulation of Paclitaxel with Enhanced Solubility and Stability. *Drug Deliv.* **2007**, *14*, 301–308. [CrossRef] [PubMed]
- Eric, K.; Rowinsky, M.D.; Ross, C.; Donehower, M.D. Paclitaxel (Taxol®). *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1004–1014. [CrossRef]

27. Hennenfent, K.L.; Govindan, R. Review Novel formulations of taxanes: A review. Old wine in a new bottle? *Ann. Oncol.* **2006**, *17*, 735–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ten Tije, A.J.; Verweij, J.; Loos, W.J.; Sparreboom, A. Pharmacological effects of formulation vehicles: Implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 665–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Weiss, R.B. Hypersensitivity reactions from taxol. *J. Clin. Oncol.* **1990**, *8*, 1263–1268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gligorov, J.; Lotz, J.P. Preclinical Pharmacology of the Taxanes: Implications of the Differences. *Oncologist* **2004**, *9*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Orr, G.A.; Verdier-Pinard, P.; McDauid, H.; Horwitz, S.B. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **2003**, *22*, 7280–7295. [[CrossRef](#)]
32. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 194–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yusuf, R.; Duan, Z.; Lamendola, D.; Penson, R.; Seiden, M. Paclitaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Pharmacologic Manipulation. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Murray, S.; Briasoulis, E.; Linardou, H.; Bafaloukos, D.; Papadimitriou, C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 890–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tommasi, S.; Mangia, A.; Lacalamita, R.; Bellizzi, A.; Fedele, V.; Chiriatti, A.; Thomssen, C.; Kendzierski, N.; Latorre, A.; Lorusso, V.; et al. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 2078–2085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chong, T.; Sarac, A.; Yao, C.Q.; Liao, L.; Lyttle, N.; Boutros, P.C.; Bartlett, J.M.S.; Spears, M. Deregulation of the spindle assembly checkpoint is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **2018**, *11*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kavallaris, M.; Kuo, D.Y.S.; Burkhart, C.A.; Regl, D.L.; Norris, M.D.; Haber, M.; Horwitz, S.B. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific β -tubulin isoforms. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 1282–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Peng, X.; Gong, F.; Chen, Y.; Jiang, Y.; Liu, J.; Yu, M.; Zhang, S.; Wang, M.; Xiao, G.; Liao, H. Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: Involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1- α -mediated signaling. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, 1–11. [[CrossRef](#)]
39. Horwitz, S.B.; Lothstein, L.; Manfredi, J.J.; Mellado, W.; Parness, J.; Roy, S.N.; Schiff, P.B.; Sorbara, L.; Zeheb, R. Taxol: Mechanisms of Action and Resistance. *Ann. New York Acad. Sci.* **1986**, *466*, 733–744. [[CrossRef](#)]
40. Schiff, P.B.; Fant, J.; Horwitz, S.B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **1979**, *277*, 665–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Dumontet, C.; Jordan, M.A. Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 790–803. [[CrossRef](#)]
42. Mollinedo, F.; Gajate, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **2003**, *8*, 413–450. [[CrossRef](#)]
43. Vicente-Blázquez, A.; González, M.; Álvarez, R.; del Mazo, S.; Medarde, M.; Peláez, R. Antitubulin sulfonamides: The successful combination of an established drug class and a multifaceted target. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 775–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lee, C.-T.; Huang, Y.-W.; Yang, C.-H.; Huang, K.-S. Drug Delivery Systems and Combination Therapy by Using Vinca Alkaloids. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1491–1500. [[CrossRef](#)]
45. Álvarez, R.; Aramburu, L.; Gajate, C.; Vicente-Blázquez, A.; Mollinedo, F.; Medarde, M.; Peláez, R. Potent colchicine-site ligands with improved intrinsic solubility by replacement of the 3,4,5-trimethoxyphenyl ring with a 2-methylsulfanyl-6-methoxypyridine ring. *Bioorg. Chem.* **2020**, *98*, 103755. [[CrossRef](#)]
46. Lee, R.M.; Gewirtz, D.A. Colchicine site inhibitors of microtubule integrity as vascular disrupting agents. *Drug Dev. Res.* **2008**, *69*, 352–358. [[CrossRef](#)]
47. Tron, G.C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A.A. Medicinal chemistry of combretastatin A4: Present and future directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033–3044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cummings, J.; Zelcer, N.; Allen, J.D.; Yao, D.; Boyd, G.; Maliepaard, M.; Friedberg, T.H.; Smyth, J.E.; Jodrell, D.I. Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: Contribution of drug transport proteins. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. ABT-751 ClinicalTrials.gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/> (accessed on 21 May 2020).
50. Seddigi, Z.S.; Malik, M.S.; Saraswati, A.P.; Ahmed, S.A.; Babalghith, A.O.; Lamfon, H.A.; Kamal, A. Recent advances in combretastatin based derivatives and prodrugs as antimetabolic agents. *Medchemcomm* **2017**, *8*, 1592–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Chaudhary, A.; Pandeya, S.; Kumar, P.; Sharma, P.; Gupta, S.; Soni, N.; Verma, K.; Bhardwaj, G. Combretastatin A-4 Analogs as Anticancer Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1186–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Liebmann, J.E.; Cook, J.A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchell, J.B. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol[®]) in human tumour cell lines. *Br. J. Cancer* **1993**, *68*, 1104–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Naret, T.; Khelifi, I.; Provot, O.; Bignon, J.; Levaïque, H.; Dubois, J.; Souce, M.; Kasselouri, A.; Deroussent, A.; Paci, A.; et al. 1,1-Diheterocyclic Ethylenes Derived from Quinaldine and Carbazole as New Tubulin-Polymerization Inhibitors: Synthesis, Metabolism, and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1902–1916. [[CrossRef](#)]
54. Alvarez, R.; Medarde, M.; Peláez, R. New Ligands of the Tubulin Colchicine Site Based on X-Ray Structures. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2231–2252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Goodsell, D.S.; Zardecki, C.; Di Costanzo, L.; Duarte, J.M.; Hudson, B.P.; Persikova, I.; Segura, J.; Shao, C.; Voigt, M.; Westbrook, J.D.; et al. RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *Protein Sci.* **2020**, *29*, 52–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Nguyen, T.L.; McGrath, C.; Hermone, A.R.; Burnett, J.C.; Zaharevitz, D.W.; Day, B.W.; Wipf, P.; Hamel, E.; Gussio, R. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107–6116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Schobert, R.; Effenberger-Neidnicht, K.; Biersack, B. Stable combretastatin A-4 analogues with sub-nanomolar efficacy against chemoresistant HT-29 cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *49*, 71–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Sharom, F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* **2011**, *50*, 161–178. [[CrossRef](#)]
59. Wei, R.J.; Lin, S.S.; Wu, W.R.; Chen, L.R.; Li, C.F.; De Chen, H.; Chou, C.T.; Chen, Y.C.; Liang, S.S.; Chien, S.T.; et al. A microtubule inhibitor, ABT-751, induces autophagy and delays apoptosis in Huh-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *311*, 88–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kanthou, C.; Greco, O.; Stratford, A.; Cook, I.; Knight, R.; Benzakour, O.; Tozer, G. The tubulin-binding agent combretastatin A-4-phosphate arrests endothelial cells in mitosis and induces mitotic cell death. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1401–1411. [[CrossRef](#)]
61. Jänicke, R.U.; Sprengart, M.L.; Wati, M.R.; Porter, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9357–9360. [[CrossRef](#)]
62. Yang, X.H.; Sladek, T.L.; Liu, X.; Butler, B.R.; Froelich, C.J.; Thor, A.D. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 348–354. [[PubMed](#)]
63. Walker, P.R.; Leblanc, J.; Carson, C.; Ribocco, M.; Sikorska, M. Neither Caspase-3 nor DNA Fragmentation Factor Is Required for High Molecular Weight DNA Degradation in Apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *887*, 48–59. [[CrossRef](#)]
64. Kagawa, S.; Gu, J.; Honda, T.; McDonnell, T.J.; Swisher, S.G.; Roth, J.A.; Fang, B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1474–1480. [[PubMed](#)]
65. Stefański, T.; Mikstaka, R.; Kurczab, R.; Dutkiewicz, Z.; Kucińska, M.; Murias, M.; Zielińska-Przyjemka, M.; Cichocki, M.; Teubert, A.; Kaczmarek, M.; et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel combretastatin A-4 thio derivatives as microtubule targeting agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 797–816. [[CrossRef](#)]
66. Vakifahmetoglu, H.; Olsson, M.; Zhivotovsky, B. Death through a tragedy: Mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1153–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Castedo, M.; Perfettini, J.L.; Roumier, T.; Andreau, K.; Medema, R.; Kroemer, G. Cell death by mitotic catastrophe: A molecular definition. *Oncogene* **2004**, *23*, 2825–2837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. González, M.; Ellahioui, Y.; Álvarez, R.; Gallego-Yerga, L.; Caballero, E.; Vicente-Blázquez, A.; Ramudo, L.; Marín, M.; Sanz, C.; Medarde, M.; et al. The Masked Polar Group Incorporation (MPGI) Strategy in Drug Design: Effects of Nitrogen Substitutions on Combretastatin and Isocombretastatin Tubulin Inhibitors. *Molecules* **2019**, *24*, 4319. [[CrossRef](#)]
69. Shelanski, M.L.; Gaskin, F.; Cantor, C.R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 765–768. [[CrossRef](#)]
70. Dumortier, C.; Gorbunoff, M.J.; Andreu, J.M.; Engelborghs, Y. Different Kinetic Pathways of the Binding of Two Biphenyl Analogues of Colchicine to Tubulin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4387–4395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
72. Korb, O.; Stützel, T.; Exner, T.E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 84–96. [[CrossRef](#)]
73. Forli, S.; Huey, R.; Pique, M.E.; Sanner, M.F.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 905–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Berthold, M.R.; Cebon, N.; Dill, F.; Gabriel, T.R.; Kötter, T.; Meinl, T.; Ohl, P.; Sieb, C.; Thiel, K.; Wiswedel, B. KNIME: The Konstanz Information Miner. In *Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp. 319–326.
75. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Marvin 17.8 ChemAxon. Available online: <https://www.chemaxon.com> (accessed on 2 May 2020).
77. OpenEye Scientific Software, Inc. Santa Fe. Available online: <https://www.eyesopen.com/> (accessed on 2 May 2020).
78. Garcia-Perez, C.; Pelaez, R.; Theron, R.; Luis Lopez-Perez, J. JADOPPT: Java based AutoDock preparing and processing tool. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 583–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]