

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Silenciamiento del gen *rad50* en líneas celulares de cáncer de mama y análisis de su efecto en la respuesta al tratamiento con las combinaciones *cis*-platino/paclitaxel y *cis*-platino/doxorubicina.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

QFB. José Ali Flores Pérez

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

MÉXICO, D.F. Julio 2011

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas. Laboratorio de

Oncogenómica y Proteómica del cáncer

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES:

Dra. Elena Arechaga Ocampo.

Laboratorio de Oncología Experimental

Instituto Nacional de Cancerología.

Dra. Laurence A. Marchat.

Escuela nacional de Medicina y Homeopatía

Instituto Politécnico Nacional

Dra. Mavil López Casamichana

Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto forma parte de la línea de investigación “Importancia de las proteínas de reparación del DNA en cáncer de mama” el cual es apoyado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico concedido al proyecto mediante la beca otorgada en el periodo que va del 01 de agosto del 2009 a 31 de Julio del 2011. Asimismo, agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico brindado para la realización de la presente tesis.

El trabajo se realizó en el laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del cáncer del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección del Dr. Mario César López-Camarillo al cual agradezco el apoyo y la confianza que me brindo así como su acertada guía a lo largo de este proyecto.

Igualmente quiero agradecer a la Dra Elena Arechaga Ocampo por el apoyo académico, moral y en especie brindados incondicionalmente para el desarrollo de este trabajo y a su indudable calidad humana. A la Dra Mavil Lopez Casamichana por su asesoría para llevar a buen término este proyecto a la Dra. Laurence A. Marchat por las observaciones realizadas para mejorar y llevar a buen término este proyecto.

También quiero agradecer a la M. en C. Olga Hernández de la Cruz, a la M. en C. Itzel López Rosas, al M en C Miguel Ángel Fonseca y a Marcos A. Muñiz, por el compañerismo, por las enseñanzas y el apoyo ofrecido

A mis compañeros de generación Alma, Miguel, Marcos, Diana, Roberto, Berenice, Daniel y José Luis por su amistad y el apoyo brindado que facilitaron el trabajo vertido en este proyecto

Dedicatorias:

A mis padres por darme la vida y apoyarme en todos los proyectos que me he propuesto y enseñarme a nunca rendirme ante nada y que nada en esta vida es imposible.

A mis hermanos Tavo, Bety y Monica por creer en mí y darle ese sabor divertido a mi vida.

A Nícte-Ha por ser la luz de mi vida e instarme siempre a continuar por ser mi fuerza cuando siento que ya no puedo más y por todo el amor que me brinda día con día.

INDICE.

	Pag
Abreviaturas	i
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	x
Resumen	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes generales del tema	1
1.1 Cáncer de mama (CM)	1
1.2 Tratamiento del cáncer de mama	4
1.3 El <i>cis</i> -platino como agente quimioterapéutico	6
1.4 Eficacia clínica del <i>cis</i> -platino en el tratamiento del cáncer	7
1.5 Resistencia clínica al tratamiento con <i>cis</i> -platino	10
1.6 Las combinaciones de quimioterapéuticos incrementan la eficiencia en el tratamiento del cáncer de mama	11
1.7 Mecanismos de reparación del daño al DNA inducido por el <i>cis</i> -platino	13

2.	ESTADO DEL ARTE	14
2.1	El complejo MRN en la reparación del daño al DNA	14
3.	ANTECEDENTES PARTICULARES	17
3.1	Polimorfismos en genes del complejo MRN en cáncer	17
3.2	Inhibición de las vías de reparación del DNA como un blanco terapéutico en cáncer	18
3.3	La proteína RAD50, elemento clave en la función complejo MRN	20
4.	IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL ESTUDIO DEL TEMA	21
II.	HIPÓTESIS	23
III.	OBJETIVOS	24
1.	Objetivo general	24
2.	Objetivos Específicos	24
IV.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
V.	METODOLOGIA	26
1.	Mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7	26
1.1	Condiciones de cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama	26

1.2	Subcultivo de líneas celulares	26
1.3	Congelamiento y descongelamiento de las líneas celulares de cáncer de mama	27
2.	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RAD50 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA	28
2.1	Preparación de los extractos proteicos	28
2.2	Determinación de la concentración de proteínas	28
2.3	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	29
2.4	Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	29
2.5	Ensayos de Western blot	29
3.	SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>rad50</i> EN LINEAS CELULARES DE CANCER DE MAMA	30
3.1	Silenciamiento de la expresión del gen <i>rad50</i> mediante interferencia del RNA (RNAi)	30
3.2	Elección de las secuencia blanco del gen <i>rad50</i>	31
3.3	Ligación de los insertos siRNA en el vector pSilencer 5.1	31
3.4	Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> DH5 α	33
3.5	Extracción de plásmidos por lisis alcalina (Miniprep)	34

3.6	Liberación de insertos con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	35
3.7	Transfección de las construcciones psilencer-Rad50.1, psilencer-Rad50.2, psilencer-Rad50.3, psilencer-Rad50.4, psilencer-Rad50.6. en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7	35
3.8	Análisis de la expresión del RNAm del gen <i>rad50</i>	37
3.9	Síntesis del ADN complementario (cDNA)	38
3.10	Amplificación del gen <i>rad50</i> mediante PCR a partir de DNA complementario	38
3.12	Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
4.	Evaluación de la quimio sensibilidad al tratamiento con <i>cis</i> -platino y las combinaciones <i>cis</i> -platino/doxorubicina y <i>cis</i> -platino/paclitaxel de la línea celular de de cáncer de mama MCF-7	40
4.1	Evaluación de la quimiosensibilidad al <i>cis</i> -platino (ensayo de exclusión por azul de tripano)	41
5.	Determinación del daño a DNA en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con quimioterapéuticos y silenciadas para el gen <i>rad50</i> .	42
5.1	Determinación del estado fosforilado de la histona H2AX	42

5.2	Evaluación de la fragmentación del DNA mediante ensayo de TUNEL	43
VI	RESULTADOS	44
1	Diseño de secuencias shRNA contra 2 blancos diferentes para el gen <i>rad50</i> y clonación en el vector pSilencer-U6-retro	44
2.	Silenciamiento de la expresión del gen <i>rad50</i> en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 mediante la transfección de las construcciones pSilencerRAD50.1 y RAD50.2	45
3	Evaluación del efecto del silenciamiento de <i>rad50</i> en el crecimiento de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con las combinaciones <i>cis</i> -platino/paclitaxel y <i>cis</i> -platino/doxorubicina	66
4.	Análisis de la presencia de rompimientos de la doble cadena del DNA (DSB) en células silenciadas para el gen <i>rad50</i> posterior al tratamiento combinado quimioterapéuticos.	77
VII	DISCUSIÓN	85
VIII	CONCLUSIONES	96
IX	REFERENCIAS	102
X	Apéndice de soluciones	114

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DNAc	Ácido desoxirribonucleíco complementario
RNA	Ácido ribonucleíco
RNAm	ARN mensajero
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATLD	Desorden similar a ataxia telangiectasia
ATR	Proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y RAD3
BASC	Complejo de vigilancia genómica asociado a BRCA1
BLM	Proteína de susceptibilidad al síndrome de Bloom
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de calcio

CaCu	Cáncer cérvico uterino
CDDP	Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II)
CM	Cáncer de mama
CME	Cáncer de mama esporádico
CMH	Cáncer de mama hereditario
CO ₂	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxilo terminal
D.O.	Densidad óptica
DAB	3,3-Diaminobencidina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAsa I	Desoxirribonucleasa I
dNTP's	Desoxi nucleótidos trifosfatados
DL50	Dosis letal 50
DSB	Rupturas de la doble cadena del DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EN	Extracto nuclear
ET	Extracto total
FA	Anemia de Fanconi
GFP	Proteína verde fluorescente
h/hrs	Hora/ horas
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSP	Heat shock protein
kDa	Kilodaltones
kpb	kilopares de bases
l	Litros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertoni
mA	Miliamperios
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitros
MMR	Sistema de reparación de apareamientos erróneos

AcMo	Anticuerpo monoclonal
MRE11	Proteína de recombinación meiotica 11
MRN	Complejo MRE11-RAD50-NBS1
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-. 2,5 difenil bromuro de tetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NBS	Proteína que confiere susceptibilidad al Síndrome de Nijmegen
NBS1	Proteína nibrin 1
NER	Reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide excision repair)
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nt	Nucleótidos
N-terminal	Amino-terminal
°C	Grado centígrado
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PISt	Penicilina-estreptomicina
poAc	Anticuerpo policlonal
RAD50	Proteína de reparación de ADN RAD50
RbCl	Cloruro de rubidio
RH	Recombinación homóloga
RNAi	Interferencia del ARN
RPA	Proteína de replicación A
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
s	Segundo
s/d	Sin digerir
SDS	Dodecil sulfato de amonio
Ser	Serina

SFB	Suero fetal bovino
shRNA	Short hairpin RNA
TA	Temperatura ambiente
Ta	Temperatura de alineamiento
TBE	Tampón de Tris, borato y EDTA
µg	Microgramo
µl	Microlitros
UV	Ultravioleta
U	Unidades
Wb	Western blot
γH2AX	Estado fosforilado de la histona H2AX

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Tendencia de la mortalidad y número de casos por cáncer de mama en México, 1955 – 2007.	3
Figura 2. Interacción del <i>cis</i> -platino con el DNA.	8
Figura 3. Arquitectura del complejo MRN y su interacción con la ruptura de la doble cadena del DNA	16
Figura 4. Análisis de los plásmidos pSilencer candidatos para verificar la clonación de los insertos Rad50.1 y Rad50.2	48
Figura 5. Electroferogramas y secuencias obtenidas de las clonas pSilencer-Rad50.1 y pSilencer-Rad50.2.	49
Figura 6. Análisis de la expresión de la proteína RAD50 por inmunodetección en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1	52
Figura 7. Análisis de la expresión de proteína RAD50 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 transfectadas con los plásmidos pSilencer-Rad50.1 y pSilencer-Rad50.2.	55

Figura 15.	Ensayo dosis respuesta de las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 tratadas con <i>cis</i> -platino.	70
Figura 16.	Determinación de la DL50 de doxorubicina en células MCF-7.	72
Figura 17.	Ensayo dosis respuesta de las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 tratadas con la combinación <i>cis</i> -platino/doxorubicina.	73
Figura 18.	Ensayo dosis respuesta de las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 tratadas con la combinación <i>cis</i> -platino/taxol.	76
Figura 19.	Detección <i>in situ</i> de la histona H2AX.	82
Figura 20.	Detección de la γ H2AX mediante Western Blot.	83
Figura 21.	Análisis mediante ensayo de TUNEL de la presencia de rompimientos de la doble cadena del DNA (DSB) en células MCF-7 silenciadas para el gen <i>rad50</i> posterior al tratamiento con <i>cis</i> -platino.	84

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Secuencias blanco utilizadas para el silenciamiento del gen <i>rad50</i> en distintos tipos de cáncer	46
Tabla 1.2	Secuencia de los oligonucleótidos que se emplearon para silenciar el gen <i>rad50</i>	47
Tabla 2.1	Características de los anticuerpos empleados para la inmunodetección de la proteína RAD50.	51
Tabla 2.2	Secuencias blanco utilizadas para el silenciamiento del gen <i>rad50</i>	58

RESUMEN

El cáncer de mama (CM) es una neoplasia maligna que tiene su origen en los tejidos de la mama, principalmente en los ductos y en los lobulillos. En México el CM es la primera causa de muerte por tumores maligno entre mujeres. En el 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas por CM y sabe que cada 2 horas muere una mujer por cáncer de mama en México. El CM es representa una importante causa de muertes prematuras entre mujeres jóvenes (30-59 años) lo cual representa una importante pérdida económica y carga social en nuestro país.

Existen diferentes tipos de terapia para tratar el CM principalmente se utilizan 5: radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida, intervención quirúrgica, y terapia hormonal. El tratamiento de CM se define en base al grado y clasificación, estado del tumor en el paciente y este puede ser muy variado normalmente incluye intervención quirúrgica, radioterapia y la administración de la combinación de fármacos o compuestos (quimioterapia). Dentro de los quimioterapéuticos más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama se encuentran el *cis*-platino, la doxorubicina, el taxol, y la ciclofosfamida, los cuales pueden administrarse solo o combinados. El *cis*-platino es uno de los quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento no solo del cáncer de mama sino de diferentes tipos de cáncer como son cáncer de pulmón, cabeza y cuello, ovario etc. Este fármaco a demostrado tener un poderoso efecto antitumoral, sin embargo resulta ser muy tóxico después de tratamiento largos además de que cada vez es más común la presencia de

resistencia a la terapia con *cis*-platino por lo que se ha optado por la combinación del *cis*-platino, con otros agentes antitumorales como son la doxorubicina y el paclitaxel para incrementar la tasa de respuesta al tratamiento basado en *cis*-platino así como reducir la reincidencia. Sin embargo las dosis administradas siguen siendo altas al igual que los efectos secundarios y toxicidad causados por este tipo de agentes antitumorales.

Las vías de reparación del DNA pueden permitir que las células tumorales sobrevivan al daño inducido en las moléculas de DNA por quimioterapéuticos como el *cis*-platino, por lo que, inhibidores específicos de las vías de reparación del DNA podrían resultar eficaces cuando se utilizan en combinación con dichos fármacos que dañan el DNA. Además, alteraciones de las vías de reparación del DNA que se producen durante el desarrollo de tumores pueden hacer que algunas células neoplásicas dependan, para su supervivencia, de un conjunto reducido de vías de reparación del DNA. Existen evidencias de que fármacos inhibidores de una de estas vías en estos tumores pueden ser útiles como agentes terapéuticos únicos, con la ventaja potencial de que este enfoque podría ser selectivo de las células tumorales y con menos efectos secundarios

El complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) juega papel importante en la reparación del daño a DNA en particular de las rupturas a la doble hebra del DNA(DSBs) generados por el *cis*-platino y otros agentes quimioterapéuticos, funcionando como sensor de daño a DNA y como molécula efectora, este complejo tiene su mayor

actividad en la ruta de reparación a DNA por recombinación homologa es la principal via de reparación de DSBs.

Previamente en nuestro laboratorio se analizó el efecto del silenciamiento de la proteína MRE11 en líneas celulares de CM objetivo de sensibilizar a líneas celulares de CM al tratamiento con *cis*-platino. Sin embargo el silenciamiento de esta proteína resulto no tener ningún efecto sobre la sensibilidad de las líneas celulares de CM al tratamiento con *cis*-platino por lo que se decidió analizar el efecto de silenciar a RAD50 que es integrante del complejo MRN, en la línea celular de CM en el presente trabajo se encontró que al silenciar a *rad50* se logra sensibilizar a la línea celular MCF-7 al tratamiento con *cis*-platino así como con las combinaciones *cis*-platino/doxorubicina y *cis*-platino/paclitaxel obteniendo niveles elevados de muerte celular a las 12 h de tratamiento. También se logro determinar que el silenciamiento de *rad50* puede afectar la proliferación celular además de retrasar las cascadas de señalización involucradas en la reparación de daño a DNA como la que incluye la fosforilacion de la histona H2AX.

I. Introducción

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es una neoplasia maligna que tiene su origen en los tejidos de la mama, por lo general, en los ductos que llevan leche al pezón y en los lobulillos que representan las glándulas donde se produce la leche (1). La mayoría de los casos de cáncer de mama se presentan en los ductos (80%) y el resto son lobulillares. Entre el 15 al 30% corresponden a carcinomas *in situ* y el resto son infiltrantes (2). No sólo las mujeres desarrollan cáncer de mama, también lo llegan a desarrollar individuos de sexo masculino, pero en una incidencia muy baja (1%). En todo el mundo, el cáncer de mama es la neoplasia más común de cáncer en las mujeres, ya que representa uno de cada diez casos nuevos diagnosticados y casi uno de cada cuatro neoplasias en mujeres. Cada año, el cáncer de mama es diagnosticado en 1.1 millones de mujeres en todo el mundo (3,4).

En México, desde del 2006 el CM es la primera causa de muerte por tumores malignos entre las mujeres. En el 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas por cáncer de mama, lo cual implica un fallecimiento cada 2 horas. El número de muertes y de casos nuevos de cáncer cérvicouterino (CaCu) ha ido

descendiendo a partir de 1990. No así la tasa por cáncer de mama, la cual aumentó 2.5 veces de 1992 al 2006, de tal forma que a partir del 2006 la tasa de mortalidad de cáncer de mama fue superior a la de cáncer cervicouterino. El CM representa una fuerte carga social y económica en México. Se ha estimado que el número de años de vida productiva perdidos (AVPP) en mujeres con CM es de 21 años. De estos datos se traduce que el costo global para el país por los AVPP es de unos \$2,748,732.00 pesos. Además, se estima que existen alrededor de 15.4 millones de mujeres mayores de 35 años, es decir, en riesgo para desarrollar CM. De ellas 1.78 millones son habitantes de la Ciudad de México.

El CM representa una importante causa de muertes prematuras, ya que 60% de las mujeres que fallece oscila entre 30 y 59 años de edad. También existe cierta evidencia de que la edad promedio de inicio de la enfermedad es menor en las mujeres de países en desarrollo en comparación con las mujeres de países más desarrollados (5). Por estudios epidemiológicos se han identificado una serie de factores que aumentan el riesgo de padecer CM. Dentro de estos factores se encuentra la edad, la cual aumenta el riesgo a desarrollar CM a medida que se envejece (6), el género y la raza; además de los factores hormonales y reproductivos que determinan el tiempo de exposición a hormonas esteroideas. Otros factores de riesgo a padecer CM son menarca temprana, infertilidad, primer embarazo en la edad adulta, nuliparidad y como factor protector la lactancia. Los factores ambientales incluyen la exposición a radiación ionizante y a hidrocarburos poliaromáticos.

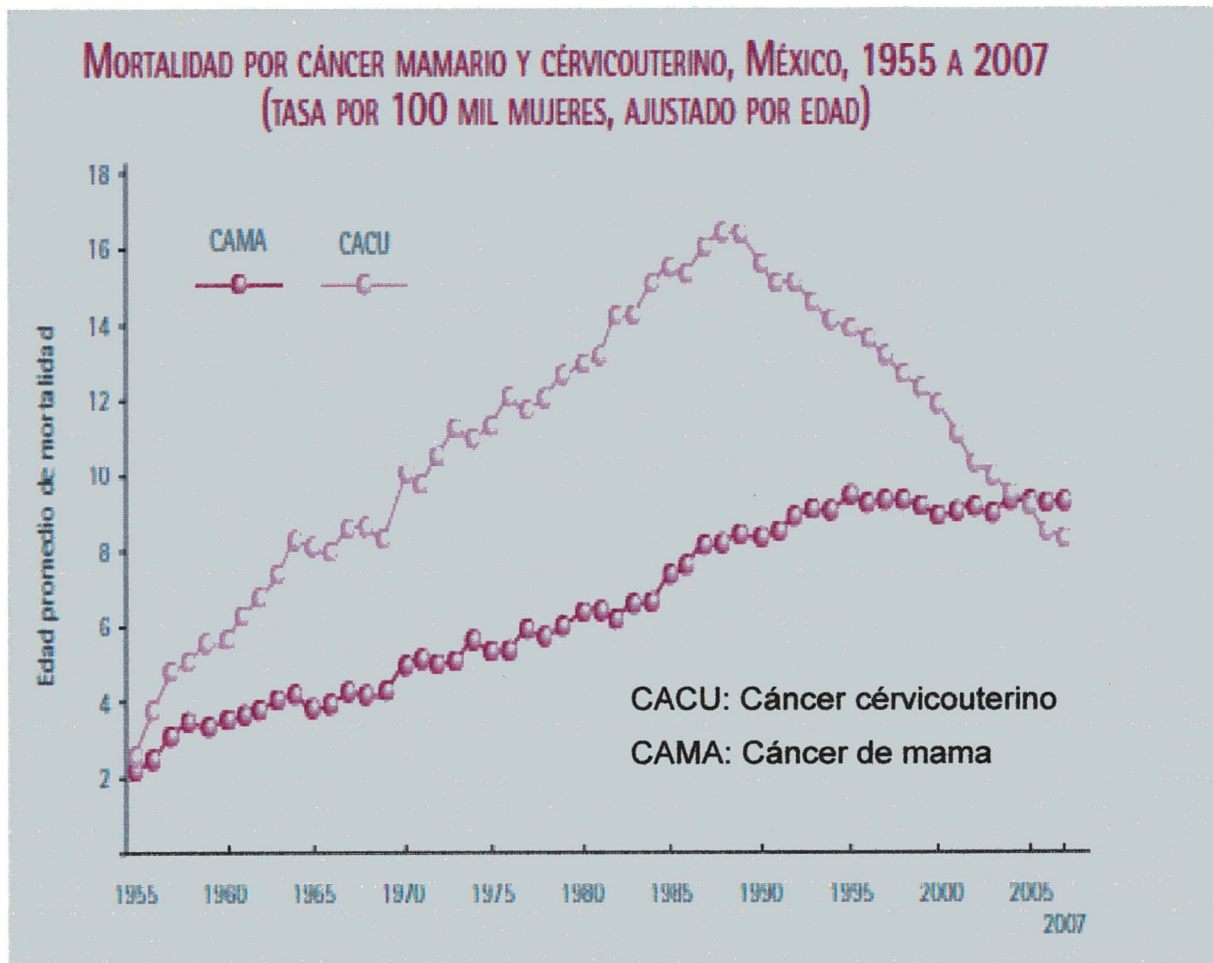


Figura 1. Tasa de mortalidad x cada 100,000 mujeres con cáncer de mama y cáncer cérvicouterino en México. Tomado de Knaul S. Salud pública de México (2009)

También, se ha asociado un mayor riesgo de padecer CM en países con una dieta rica en grasas y como factor protector el tener una dieta rica en frutas y vegetales. Por otro lado se ha observado que la actividad física actúa como factor protector (7). También se ha observado que poseer historia familiar de CM es un factor de riesgo significativo para esta enfermedad. Los genes afectados en el CM hereditario son a menudo los mismos que están mutados en CM esporádico (8).

1.2 Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento de CM se define en base al grado y clasificación, estado del tumor en el paciente y este puede ser muy variado normalmente incluye intervención quirúrgica, radioterapia y la administración de la combinación de fármacos o compuestos y el tipo de terapia podría dividirse principalmente en tres tipos: neoadyuvante, adyuvante y paliativa.

La **terapia neoadyuvante** está indicada a pacientes que aun no han sido intervenidos quirúrgicamente y principalmente se enfoca a reducir el tamaño del tumor lo cual permite mayor éxito de cirugía conservadora. El tratamiento neoadyuvante está basado en el uso de antraciclinas y se ha observado el aumento en la eficacia de la terapia neoadyuvante al agregar taxanos como docetaxel o paclitaxel (taxol) lo cual ha incrementado número de cirugías conservadoras.

La **terapia adyuvante** está indicada a pacientes que ya han sido intervenidos quirúrgicamente, en aquellas pacientes que presenten metástasis a los ganglios axilares en la pieza quirúrgica y en aquellas con ganglios positivos.

Este tipo de terapia está enfocada a la eliminación de células cancerígenas remanentes, evitar enfermedad micro-metastásica, disminuir el riesgo de recurrencia e incrementar la supervivencia. Los consensos internacionales recomiendan la utilización de tratamiento adyuvante cuando exista al menos uno de los siguientes factores: i) tumor mayor a 1 cm; ii) receptores hormonales negativos; iii) en pacientes menores a 35 años; iv) en pacientes que sobreexpresan el oncogen *HER2* y v) tumores con invasión vascular o linfática. El tratamiento adyuvante debe administrarse 1 a 4 semanas después de la intervención quirúrgica. Los esquemas de quimioterapia recomendados deberán incluir antraciclinas y se consideran esquemas combinatorios efectivos aquellos que incluyen FAC (5 fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida) o FEC (5 fluororacilo, epirulicina y ciclofosfamida). Estudios recientes demuestran el beneficio de agregar taxanos (docetaxel o paclitaxel) particularmente, en pacientes con ganglios positivos, ya sea junto con el antracíclico, como el esquema TAC (docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida) o de manera secuencial como adriamicina y ciclofosfamida (AC) x 4 ciclos, seguido de docetaxel x 4 ciclos o paclitaxel x 12 ciclos.

La **terapia paliativa** se utiliza en pacientes con una enfermedad diseminada o con recaída y está indicada de primera línea ante tumores que presentan receptores

hormonales negativos, enfermedad visceral, corto intervalo desde la cirugía o sintomatología relacionada con la recaída o la metástasis. Básicamente se administra para reducción de síntomas, incrementar la esperanza y calidad de vida

1.3. El *cis*-platino como agente quimioterapéutico.

El *cis*-platino (*cis*-diaminodicloroplatino) es empleado en el tratamiento de tumores que incluyen mama, testículos, vejiga, pulmón, estómago, esófago y ovarios. Sin embargo, a pesar de su efectividad, se le ha asociado con una alta toxicidad causante de diferentes efectos secundarios como náusea, vómito, daño renal o hepático, neuropatía periférica, pérdida auditiva y del apetito y pérdida de cabello, por lo que su uso clínico está restringido. El principal blanco del *cis*-platino es el DNA ya que es capaz de formar enlaces covalentes con las guaninas y adeninas. El *cis*-platino es un agente bifuncional ya que puede formar enlaces intracadena e intercadena en las hebras del DNA; asimismo produce lesiones replicativas que generan como intermediarios DSB (Figura 2). A nivel celular el *cis*-platino provoca la inhibición de la replicación y la transcripción así como el arresto del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis.

El *cis*-platino puede causar muerte celular no solo por la formación indirecta de DSBs, sino que también puede estar involucrado en un gran número de vías de señalización y rutas metabólicas las cuales derivan en muerte celular por ejemplo, la activación de apoptosis mitocondrial, en la cual el *cis*-platino interactúa con la proteína pro-apoptótica bax y provoca la liberación de citocromo C, promoviendo

su interacción con apaf-1 y formación del apoptosoma, otros mecanismos estudiados es la inducción de señalización tiempo-dosis-dependiente donde el *cis*-platino genera estrés oxidativo (el *cis*-platino a concentraciones de 500 nM incrementa significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno) y activa vías de señalización de respuesta a estrés especialmente las cascadas de MAPK, ERK (11).

1.4. Eficacia clínica del *cis*-platino en el tratamiento del cáncer

El *cis*-platino es uno de los agentes antitumorales más potentes conocidos ya que ha demostrado actividad contra una amplia variedad de tumores sólidos y esta descrito como primera línea en el tratamiento de cáncer de pulmón, ovarios, mama, cabeza y cuello. En CM el primer reporte que evidencia la eficacia del *cis*-platino es el realizado por Kolaric y Roth (28). En su estudio trataron a 35 pacientes con CM metastásico sin previa quimioterapia, utilizando dosis de *cis*-platino de 30 mg/m² encontrando que la tasa de respuesta fue del 52%. De igual manera, Sledge y cols. (27) encontraron una tasa de respuesta del 40% al tratar 29 mujeres con CM a metastásico sin terapia previa. Estos datos muestran una actividad antitumoral aceptable del *cis*-platino en CM metastásico, aunque la alta

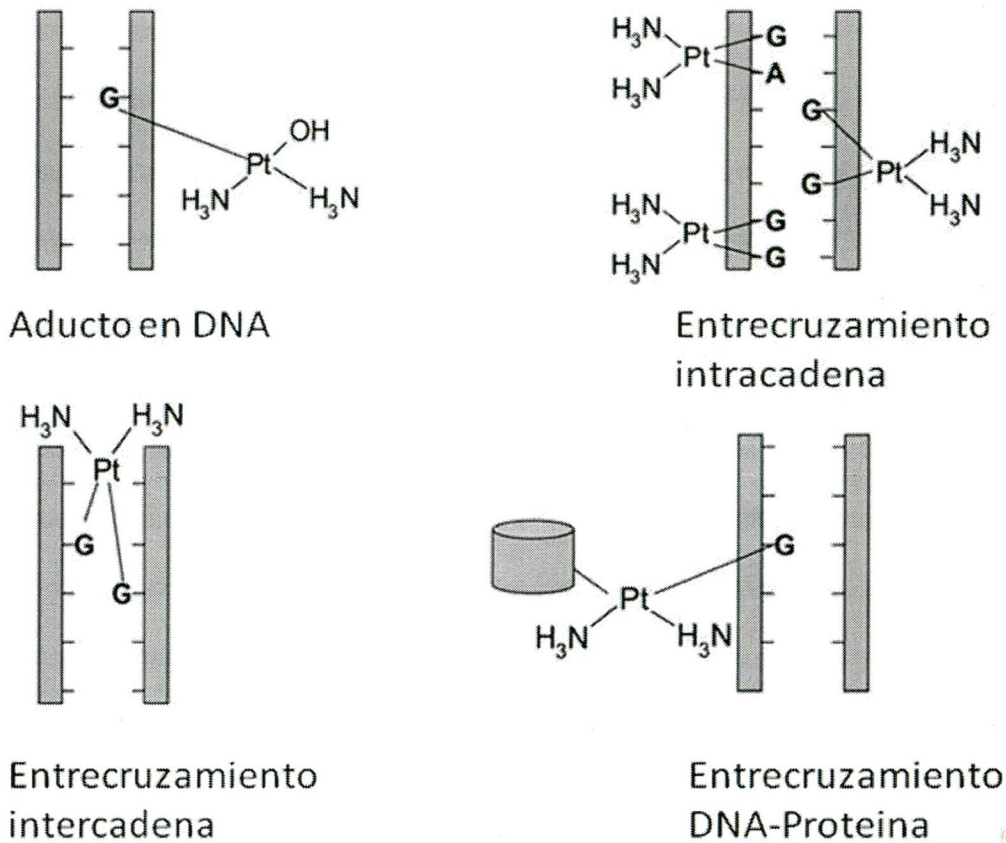


Figura 2. Las sales de platino forman aductos en el DNA. Los agentes platinantes son capaces de interactuar con el DNA para formar monoadductos, entrecruzamientos intracatenarios (1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpXpGp) e intercatenarios (G-G), así como entrecruzamientos DNA-proteína. Tomado y modificado de Boulikas T (2007).

toxicidad del fármaco y la complejidad clínica de su manejo lo convierten en poco atractivo para su combinación con otros quimioterapéuticos.

Si bien el *cis*-platino es uno de los quimioterapéuticos más utilizados, no siempre presenta una buena tasa de efectividad. En el tratamiento de carcinoma hepatocelular la terapia con *cis*-platino demostró tener una respuesta del 17% (30), mientras que en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello la eficacia solo fue del 20-30%. Para el tratamiento de cáncer ovárico el *cis*-platino mostró una respuesta del 70% al tratamiento inicial, pero la sobrevida a 5 años fue solo del 25%.

Debido a la gran variedad en las respuestas clínicas observadas posterior al tratamiento con *cis*-platino en diversos tipos de cáncer, se han tratado de desarrollar nuevos esquemas quimioterapéuticos utilizando combinaciones de *cis*-platino con otros fármacos con la finalidad de incrementar su eficacia. En el 2006, Park y cols. administraron una combinación de doxorubicina/*cis*-platino y capecitabina a pacientes con carcinoma hepatocelular metastásico, obteniendo un ligero aumento en la tasa de respuesta de un 17% (solo *cis*-platino) a un 24% con la combinación de los 3 fármacos. En el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello se ha utilizado una combinación de *cis*-platino y 5-fluoruracilo (5'-FU) obteniendo una tasa de respuesta del 23-40%, donde el tratamiento único con *cis*-platino alcanza una tasa del 17-30%. Otra combinación interesante es la de sales de platino con taxanos, como lo es *cis*-platino/paclitaxel el cual obtuvo en este mismo tipo de cáncer una tasa de respuesta del 30-50% (31,53). Por otra parte, una

combinación *cis*-platino/paclitaxel produjo una tasa de respuesta del 25-28% (31,32), en el tratamiento del cáncer del pulmón de células no pequeñas.

Estos datos nos muestran claramente que la efectividad del *cis*-platino en el tratamiento de diversos tipos de cáncer es diversa y que de manera importante puede ser mejorada a través de la combinación con fármacos que actúen interrumpiendo otros procesos celulares diferentes a la reparación del daño del DNA.

1.5. Resistencia clínica al tratamiento con *cis*-platino

Aunque el *cis*-platino es un potente inductor de apoptosis, se ha observado el desarrollo de resistencia clínica a este fármaco. La resistencia puede ser adquirida a través de una exposición crónica al fármaco, o puede presentarse así misma como un fenómeno celular intrínseco de los tumores. En general, la resistencia a *cis*-platino puede ser sustancialmente grande, esto definido a partir de estudios realizados sobre líneas celulares resistentes obtenidos en la clínica donde se observó que estas células podrían soportar dosis 50-100 veces mayores que la usada en tumores sensibles al fármaco (120 mg/cm^2) (12).

Los mecanismos moleculares por los cuales se presenta la resistencia clínica al *cis*-platino aun no están bien definidos, sin embargo ya se han descrito algunas de las rutas y moléculas que están relacionadas con la resistencia. Stewart (2007) clasifica los mecanismos de resistencia en dos grupos principales: mecanismos clásicos de resistencia y nuevos mecanismos moleculares relacionados con la

resistencia al *cis*-platino. Dentro de la primera categoría se agrupan mecanismos de distribución del fármaco por el torrente sanguíneo, inactivación del fármaco, detoxificación, bombeo de fármaco (reducción de la concentración del fármaco intracelular), incremento de los mecanismos de reparación del DNA, respuesta apoptótica reducida y activación de inhibidores de la apoptosis, entre otros. Dentro de la segunda categoría se encuentran diversos procesos como la respuesta mediada por proteínas de choque térmico (HSP, del inglés heat shock protein) y la activación de rutas de señalización que incluye proteínas tales como PTEN, PI3k, AKT, Ras, *c-Myc*, *c-Fos*, *c-Jun*, NF-kappaB y MAPK cinasas.

1.6. Las combinaciones de quimioterapéuticos incrementan la eficiencia en el tratamiento del cáncer de mama

Como ya se ha visto el *cis*-platino resulta ser un agente antineoplásico muy poderoso y útil en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, sin embargo se ha observado que la tasa de respuesta del cáncer al tratamiento con *cis*-platino es buena sin embargo no es la mejor, por lo cual en la clínica se ha optado por la combinación de quimioterapéuticos, con el objetivo de lograr un efecto sinérgico e incrementar la respuesta y eficiencia al tratar diferentes tipos de cáncer.

Una de las combinaciones más utilizadas en la clínica para el tratamiento de cáncer es *cis*-platino/doxorubicina. La doxorubicina es una antraciclina que también se utiliza de forma individual para el tratamiento de cáncer pulmonar, cabeza, cuello y cáncer de mama. Este fármaco es capaz de generar daño a las

células por tres vías principalmente: 1) puede unirse directamente a DNA y promover la formación de intermediarios para rupturas de una sola hebra del DNA (SSB) y la ruptura de las dos hebras del DNA (DSB). 2) puede unirse a la topoisomerasa tipo II e inhibir su función promoviendo la ruptura al DNA causado por la misma topoisomerasa II la cual va a realizar cortes a una sola cadena del DNA. La doxorubicina se une a la topoisomerasa inhibiendo su función y evitando el cierre de la cadena cortada provocando SSB e intermediarios de DSB. 3) promueve la formación de radicales libres. Para la combinación *cis-platino*/doxorubicina se ha reportado una tasa de respuesta de hasta el 50% para el tratamiento de cáncer de mama metastásico (30). Esto representa un 10% más que la reportada para el tratamiento del mismo tipo de cáncer con únicamente *cis-platino* (31, 27.)

Otro tipo de fármacos que han mostrado ser efectivos en el tratamiento del cáncer son los taxanos, de los cuales los compuestos más representativos de este tipo de quimioterápicos son el taxol y el docetaxel. Este tipo de quimioterápicos a diferencia del *cis-platino* y la doxorubicina no causan daño directo a DNA. El paclitaxel o taxol es capaz de unirse a los microtúbulos celulares e inhibir su despolimerización lo cual genera muerte celular al no poder dividirse la célula deteniéndose el ciclo celular e induciendo muerte por apoptosis, debido a ello este compuesto es más selectivo para aquellas células que están en constante actividad y que se están replicando constantemente. Estos compuestos han sido administrados solos y en combinación con el *cis-platino* para el tratamiento de

diversos tipos de cáncer. Cabe destacar que para el tratamiento de cáncer de mama se ha visto una tasa de respuesta de entre 30-50% para la combinación *cis*-platino/taxol (31,32) y 31% para el tratamiento de cáncer de mama metastásico con la combinación *cis*-platino/docetaxel (30)

1.7. Mecanismos de reparación del daño al DNA inducido por el *cis*-platino

En la reparación de las lesiones del DNA producidas por el *cis*-platino participan numerosas vías de reparación. En la reparación de lesiones intracadena actúa principalmente el mecanismo de reparación por escisión de nucleótido (NER), el cual escinde un fragmento de 23-30 pb de DNA donde se encuentra la lesión. La reparación por el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) es necesaria para que el *cis*-platino sea tóxico generando rupturas de la doble cadena del DNA. La recombinación homóloga (RH) tiene un papel central en la reparación de la mayoría de la reparación de las lesiones replicativas inducidas por fármacos usados contra el cáncer.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. El complejo MRN en la reparación del daño al DNA

El complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) participa en la reparación de los DSBs que pueden causar la muerte celular y alteraciones genéticas incluyendo deleciones, pérdida de heterocigosidad, translocaciones y pérdidas cromosómicas (14, 15). Se ha propuesto que este complejo es un actor central en respuesta al daño por DSB, incluyendo la reparación por recombinación homologa (RH), la recombinación no homologa, el mantenimiento de los telómeros y la activación de puntos de control del ciclo celular. Este complejo está formado por las proteínas MRE1, RAD50 y NBS1. En la figura 3 se muestra un esquema de la arquitectura del complejo MRN. La proteína MRE11 posee actividad exonucleasa con capacidad de procesar extremos heterogéneos y largas colas de dobles hélices en el DNA. RAD50 emplea sus dominios ATPasa ABC, Zn-hook y doble alfa hélice para actuar como puente en la unión de rupturas doble cadena y facilitar el procesamiento de los extremos del DNA por MRE11. La exonucleasa MRE11 se une directamente al DNA y a las proteínas RAD50 y NBS1. NBS1 contribuye a la función reguladora del complejo; tiene dominios N-terminales de interacción con fosfopéptidos (FHA y BRCT), así como un extremo C-terminal con dominios de interacción con la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) y con MRE11 (16).

Se ha observado que la presencia de mutaciones hipomórficas en los genes *rad50* y *nbs1* causan el síndrome de Nijmegen breakage (NBS). Mutaciones

hipomórficas en el gen *mre11* causan un desorden similar a ataxia telangiectasia (ATLD). Ambos desórdenes están relacionados al síndrome de ataxia telangiectasia (AT), causado por mutaciones en el gen *atm* y donde los pacientes presentan disfunción motora, atrofia tímica y gonadal y predisposición a cáncer. Las células con AT son hipersensibles a agentes causantes de DSB y se caracterizan por inestabilidad cromosómica y síntesis de DNA radio-resistente. Los pacientes con ATLD y NBS presentan fenotipos similares a nivel celular sugiriendo que el complejo MRN pudiera tener un papel importante en la activación de ATM en respuesta al daño por DSB y alteraciones en los componentes del mismo pudieran predisponer al desarrollo de cáncer (17).

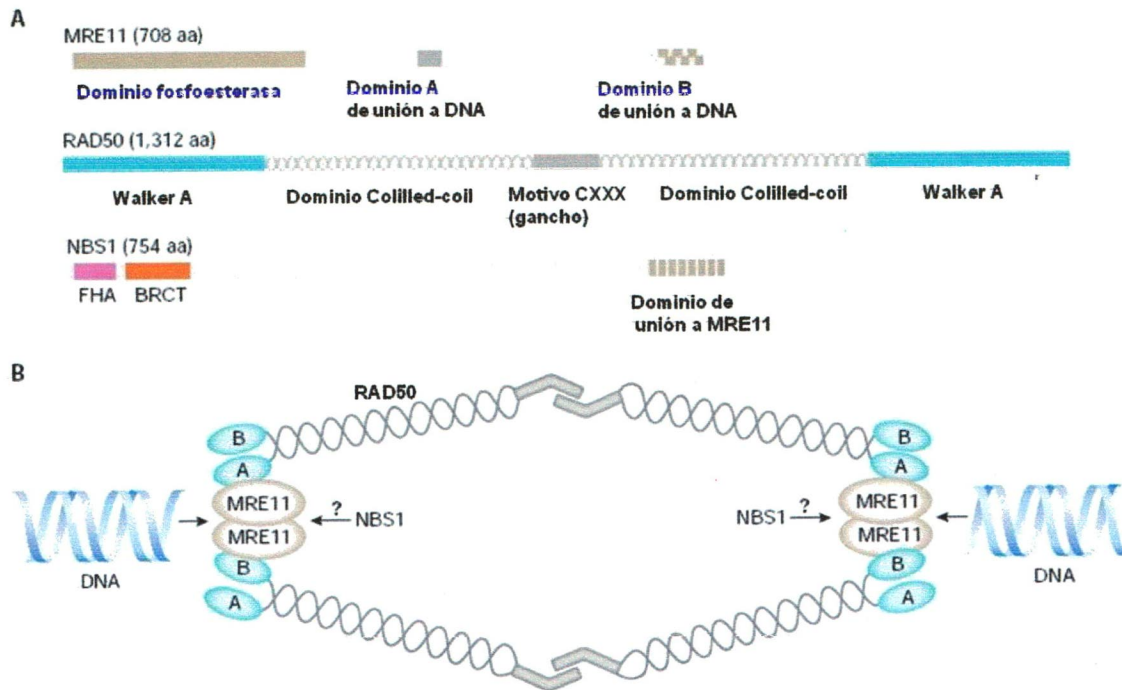


Figura 3. Arquitectura del complejo MRN y su interacción con la ruptura de la doble cadena del DNA. Esquema del complejo MRN A) Esquema de las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 donde se muestran los dominios funcionales. B) Se muestra la arquitectura modular del núcleo hetero-tetramérico MRE11-RAD50 (MR) que divide el complejo en regiones microscópicamente discernibles, incluyendo dominios de cabeza globular de unión al DNA, dominios coiled-coil y dominios hook. No hay información estructural actualmente disponible para NBS1 eucarionta. Esquema del complejo MRN, tomado y modificado de Van den Bosch et al ; 2003

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

3.1. Polimorfismos en genes del complejo MRN en cáncer

Se han encontrado diversas asociaciones entre mutaciones o polimorfismos en los genes del complejo MRN y la riesgo de desarrollar cáncer de mama. Por ejemplo en una población del norte de Finlandia se encontró asociación entre el cáncer de mama hereditario (CMH) y la presencia de tres mutaciones en *rad50*. Los datos, sugieren un efecto de la haploinsuficiencia de *rad50* y *nbs1* sobre la integridad genómica y la susceptibilidad al cáncer (18). En otro estudio se observó que la expresión de MRE11, RAD50, y NBS1 se redujo en una gran proporción de los tumores de CM temprano lo que podría indicar que la represión o pérdida de estas proteínas de reparación del DNA es un evento temprano o inicial frecuente en el CM en la población Finlandesa (19). Los genes *rad50*, *mre11* y *nbs1* son esenciales en vertebrados y el trabajo experimental con éstos es limitado. Se han generado algunas líneas celulares humanas en las cuales se ha silenciado alguna de las proteínas del complejo MRN para estudiar diversas funciones del complejo. Dentro de las líneas celulares utilizadas se encuentran las de carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello osteosarcoma epitelial, carcinoma de pulmón, cáncer de cervix y fibrosarcomas, sin embargo no existen reportes de estudios con células de cáncer de mama. De manera interesante, se ha silenciado por separado la expresión de los genes del complejo MRN, observándose que al reducir los niveles de RAD50, por silenciamiento, se produce un descenso de los

niveles de la proteína MRE11, RAD50 y NBS1. En contraste, el silenciamiento del gen *nbs1* no induce cambios en los niveles proteicos de MRE11 y RAD50, por lo que RAD50 y MRE11 son esenciales para el mantenimiento y la estabilidad del complejo MRN. En conclusión, la pérdida de RAD50 o MRE11 desencadena la desestabilización de todo el complejo MRN y la degradación de sus componentes (20, 21).

3.2. Inhibición de las vías de reparación del DNA como un blanco terapéutico en cáncer.

Las vías de reparación del DNA pueden permitir que las células tumorales sobrevivan al daño inducido en las moléculas de DNA por tratamientos quimioterapéuticos, por lo que, inhibidores específicos de las vías de reparación del DNA podrían resultar eficaces cuando se utilizan en combinación con dichos fármacos que dañan el DNA. Además, alteraciones de las vías de reparación del DNA que se producen durante el desarrollo de tumores pueden hacer que algunas células neoplásicas dependan, para su supervivencia, de un conjunto reducido de vías de reparación del DNA. Existen evidencias de que fármacos inhibidores de una de estas vías en estos tumores pueden ser útiles como agentes terapéuticos únicos, con la ventaja potencial de que este enfoque podría ser selectivo de las células tumorales y con menos efectos secundarios (23).

En el tratamiento con el *cis*-platino, la resistencia a la reparación de los enlaces cruzados del DNA es una limitación importante para el éxito en el tratamiento de varios tumores sólidos (24). Una estrategia aplicada para resolver esta resistencia en cáncer de ovario fue silenciar la expresión de ERCC1, implicado en la reparación por NER, causando una importante potenciación de la toxicidad del *cis*-platino (33). En líneas celulares de cáncer de ovario resistentes y sensibles al *cis*-platino, se ha reportado un efecto de sinergia entre el *cis*-platino y la gemcitabina, (análogo de nucleósido). Este sinergismo puede deberse a que la gemcitabina media la inhibición de la reparación de los aductos intracadena y enlaces cruzados intercadena (25). Por otra parte, inhibidores de la proteína RPA heterotrimérica han sido desarrollados para potenciar la toxicidad del *cis*-platino. Recientemente se reportó que el compuesto 17DMAG, un inhibidor de Hsp90 y potenciador de la radiosensibilidad de las células tumorales, reduce la habilidad del complejo MRN de formar *foci* nucleares en respuesta a la irradiación. Por otra parte, la exposición a 17DMAG reduce la interacción entre NBS1 y ATM. Estos resultados sugieren que la disminución de la activación de ATM inducida por radiación en células tratadas con 17DMAG fue el resultado de inhibir el funcionamiento correcto del complejo MRN (26). Otra estrategia que emplea el bloqueo de la actividad de MRN se ha reportado para potenciar el tratamiento con *cis*-platino en tumores escamosos de cabeza y cuello. En este estudio, se usó un adenovirus que expresa una mutante negativa de NBS1 y se evaluó el efecto de impedir la función del complejo MRN, observándose que la expresión de NBS1 truncada aumenta

significativamente los DSBs y la citotoxicidad inducida por el *cis*-platino. El incremento en DSBs correlaciona con el nivel de citotoxicidad en los diferentes grupos de tratamiento y sugiere que la quimiosensibilización del tumor se produce a través de la permanencia de los DSBs.

3.3. La proteína RAD50, elemento clave en el complejo MRN

La proteína RAD50 como ya se mencionó, es un componente importante en el complejo MRN, puesto que le da estabilidad al mismo y se considera que es esencial para el mecanismo de reparación de daño a DNA. Esta proteína posee tres dominios principales, los “walkers” AB (dominios ATP asa), los sitios de interacción con MRE11 y un gancho de zinc, también posee una estructura coiled-coil interpuesta entre las dos partes del dominio ABC (Walkers). Se ha demostrado que estos dominios poseen tanto la actividad adenilato cinasa como ATPasa y que son esenciales para todos los procesos conocidos del complejo MRN. La unión del ATP a los dominios Walker induce un cambio conformacional en RAD50 promoviendo la unión de los dominios Walker formando un surco cargado positivamente (34).

Esto incrementa la afinidad de este sitio de unión a DNA. Es decir, el ATP modula la unión del complejo al DNA a través del cambio conformacional de RAD50. En todos los organismos estudiados hasta el momento MRE11 y RAD50 se unen para formar un complejo altamente estable, el sitio de interacción entre MRE11 y RAD50 se encuentra altamente conservado y se ha delimitado en

aproximadamente 40 aminoácidos adyacentes a los dominios ABC. En el centro de la estructura coliled-coil se encuentra un domino conocido como gancho de zinc, este domino es muy importante para la interacción de RAD50 con otras moléculas de RAD50 y posee una secuencia altamente conservada Cys-X-X-Cys (CXXC) La cual es esencial para la inmovilización entre cromátides hermanas en el proceso de reparación por RH. La perdida de este dominio resulta en una desestabilización del complejo MRN y en consecuencia se ha observado que produce inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a la quimioterapia y radioterapia en diversos modelos de cáncer.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL ESTUDIO DEL TEMA

Como hemos revisado en los antecedentes, las proteínas que participan en las vías de reparación del DNA constituyen un excelente blanco terapéutico contra el cáncer. La reparación exacerbada del DNA puede permitir que las células tumorales sobrevivan al daño genotóxico inducido por los tratamientos, por lo que inhibidores específicos de las rutas de reparación del DNA podrían resultar eficaces cuando se utilizan en combinación con fármacos que tienen como blanco al DNA.

El interés concreto de nuestro grupo de investigación, se centra en la idea de mejorar la eficacia de los tratamientos anti-cancerígenos existentes y reducir su citotoxicidad generalizada, mediante un enfoque molecular que tiene como blanco

principal la inhibición de la ruta de reparación del DNA por RH y el aumento de la sensibilidad al *cis*-platino. Por otra parte, la implementación de un sistema de inhibición de la expresión de genes mediante la generación de “short hairping RNAs” (shRNAs) específicos, nos permitirá visualizar el potencial que tiene el bloqueo de las rutas de reparación de DNA en CM. El alcance de los resultados del presente proyecto es importante debido a que al definir cuales genes están implicados en la sensibilización a los fármacos que se usan en el tratamiento del CM, contribuirá a entender la diversidad de respuestas frente a un tratamiento y decidir qué tipo de estrategias moleculares coadyuvantes se pueden aplicar a casos particulares. Así mismo podría ayudarnos a sugerir nuevos blancos terapéuticos que nos guíen en la búsqueda de inhibidores específicos. En la presente propuesta hemos decidido inhibir la expresión del gen *rad50* buscando lograr de esta manera la sensibilización de las células tumorales al tratamiento con combinaciones *cis*-platino/paclitaxel y *cis*-platino/doxorubicina.

II. HIPÓTESIS

Al silenciar el gen *rad50* disminuirán los procesos de reparación a DNA en los cuales esta involucrado el complejo MRN resultando en una sensibilización de las líneas celulares de cáncer de mama al tratamiento con quimioterapéuticos

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto del silenciamiento del gen *rad50* en líneas celulares de cáncer de mama en respuesta al tratamiento con las combinaciones *cis*-platino/paclitaxel y *cis*-platino/doxorubicina.

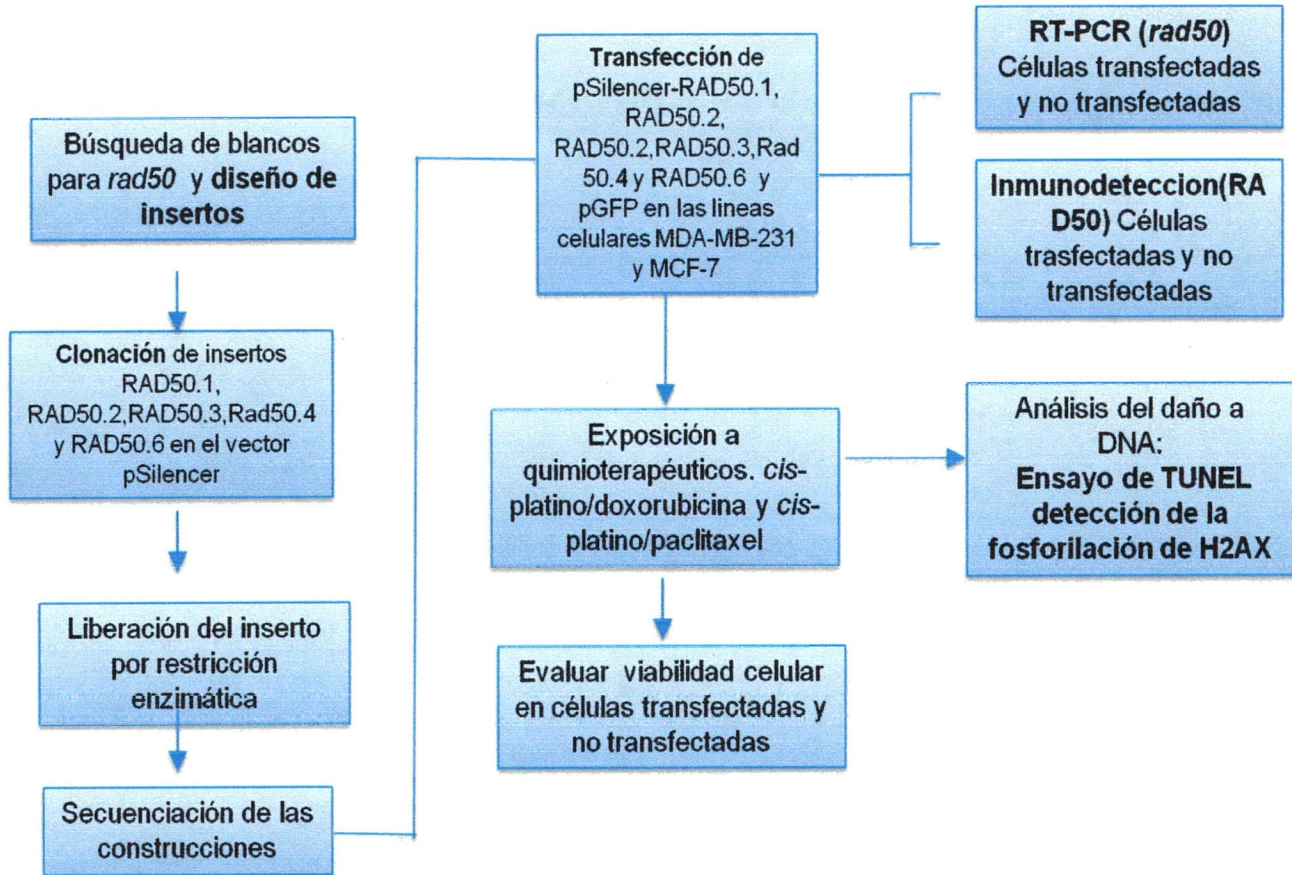
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Silenciar la expresión del gen *rad50* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

2. Analizar la presencia de rompimientos de la doble cadena del DNA en las células transfectadas en respuesta al tratamiento con *cis*-platino

3. Evaluar el efecto del silenciamiento de *rad50* en el crecimiento de la línea celular MCF-7 posterior al tratamiento con las combinaciones *cis*-platino/paclitaxel y *cis*-platino/doxorubicina.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



V. METODOLOGÍA

1. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

1.1 Condiciones de cultivo de las líneas celulares

Las líneas celulares MCF-7 (ATCC#: HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC#: HTB 26) se cultivaron en medio Gluta-MAX-I, DMEM, bajo en glucosa y glutamina (Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Invitrogen), penicilina y estreptomina. Se incubaron con aireación a 37°C y con una atmósfera de 5% CO₂.

1.2 Subcultivo de líneas celulares

Para el mantenimiento de líneas celulares, primero se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con Buffer fosfato salino (PBS) 1x a pH 7.0. Posteriormente se retiró el PBS y se agregó PBS 1x pH 7.0-EDTA 6.8 mM. Luego se añadió tripsina 0.25 % (Gibco), se distribuyó homogéneamente con movimientos suaves oscilatorios e incubaron durante 5 min a 37°C. A la par se agregó medio de cultivo fresco a un frasco nuevo y se rotuló apuntando el nombre de línea celular, número de pasaje, día y responsable. Una vez transcurridos los 5 min de incubación con tripsina se visualizaron en microscopio para observar si se despegaron las células y se dio un pequeño golpe a la caja para separar por completo las células. Posteriormente se agregó PBS 1x-BSA 1% y se mezcló por

pipeteo sobre toda la superficie, se transfirieron las células despegadas a un tubo falcón de 15 ml y centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco, distribuyendose en frascos nuevos y estériles.

1.3 Congelamiento de las líneas celulares

En general, por criotubo se emplearon aproximadamente 2×10^6 células que se procesaron de manera similar a cuando se realiza un subcultivo pero en vez de resuspenderlas en 1 ml de medio fresco, se agregó 1 ml de medio de congelamiento (500 μ l de SFB, 400 μ l de medio de cultivo completo y 100 μ l de DMSO). A continuación se cerró herméticamente el criotubo y se colocó en hielo durante aproximadamente 10 min, los tubos se guardaron a -80°C, hasta su uso.

1.4 Descongelamiento de las líneas celulares

Se retiró el criotubo del Revco, se limpió con benzal y rápidamente se colocó en baño a 37°C hasta que se descongelara el medio. Una vez que el medio se descongeló, se pasó a un tubo falcón y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a 4°C, posteriormente se descartó el medio de congelamiento y se resuspendieron las células en medio DMEM suplementado fresco previamente templado a 37°C

2. DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEINA RAD50 EN LÍNEAS CELULARES DE CM

2.1 Preparación de los extractos proteicos

Para preparar extractos proteicos totales se lavaron tres veces los cultivos celulares con PBS 1x frío, luego se incubaron con buffer de lisis TNTE frío (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA) suplementado con cóctel de inhibidores de serínproteasas, cisteínproteasas y metaloproteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a 4°C durante 15 min en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se alicuotó y almacenó a -80°C.

2.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos se utilizó el método de Bradford. La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA (1 mg/ml). Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y los resultados se obtuvieron sustituyendo los valores de absorbancia de las muestras en la ecuación de la recta elaborada a partir de los valores de la curva estándar. La ecuación es: $y = m x + b$, donde y es la absorbancia 595 nm, m es la pendiente, x es la concentración de proteínas y b es la ordenada al origen.

2.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó a una concentración de acrilamida del 10% % ó 12 en el gel separador y al 5% en el gel concentrador. Para correr el gel se empleó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

2.4 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD). Los geles, las membranas, papeles whatman y esponjas se incubaron 15 min en solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y 20 % de metanol). Posteriormente, se armó el cassette, se sumergió en la solución de transferencia y se transfirió 400 mA durante 1 h en hielo ó a 40 mA durante toda la noche a 4°C. Para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana se utilizó tinción con rojo Ponceu, posteriormente se lavó la membrana con PBS 1x pH 7.4.

2.5 Ensayos de inmunodetección

Las membranas conteniendo las proteínas transferidas se incubaron en solución bloqueadora (5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4) durante 1 h a TA ó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween20 (0.05%) durante 5 min, tres veces, y posteriormente se agregaron el

anticuerpo primario diluido(1:400) en PBS 1x-Tween20 0.05%, y se incubaron durante 1 h a TA ó toda la noche a 4°C, en agitación. Después de la incubación con anticuerpo primario las membranas se lavaron tres veces en PBS 1x-Tween20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido (1:5000) en PBS 1x-tween 20 al 0.05% y se incubó durante 1 h a TA en agitación. Posterior a la incubación del anticuerpo secundario las membranas se lavaron tres veces durante 10 min con PBS 1x y se revelaron por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 5 min con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Para detectar las proteínas las membranas se expusieron a placas autoradiográficas y la señal se visualizó al revelar la placa con solución reveladora.

3. SILENCIAMIENTO DEL GEN *rad50* EN LÍNEAS CELULARES DE CM

3.1 Silenciamiento de la expresión del gen *rad50* mediante interferencia del RNA

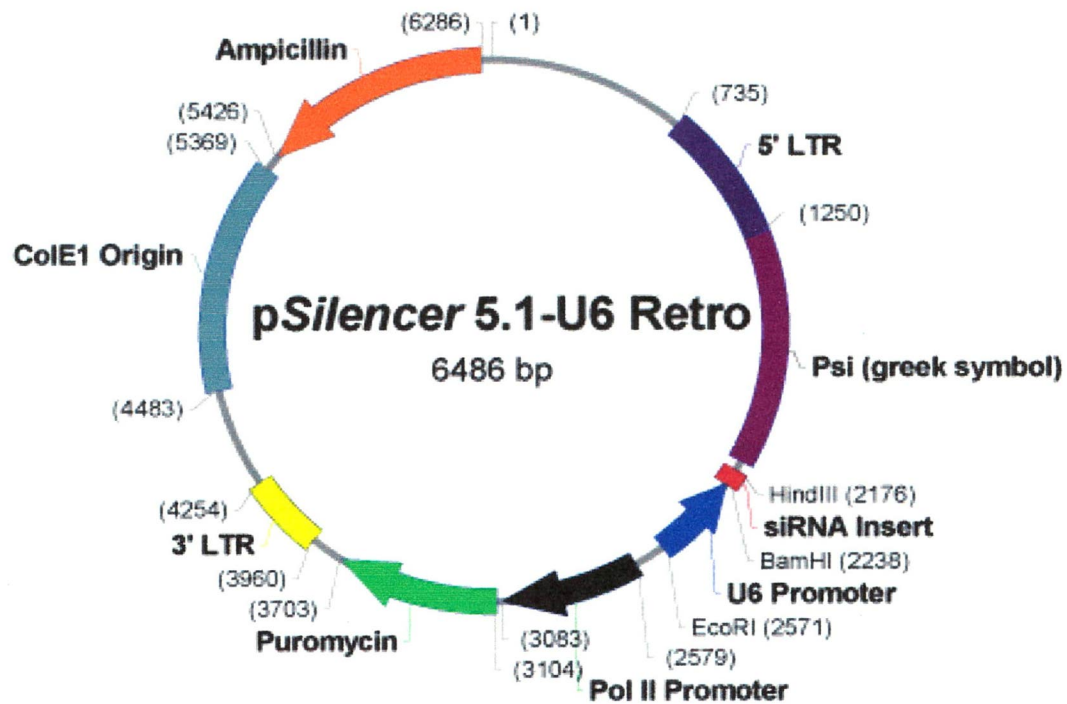
Para el silenciamiento del gen *rad50* se utilizó un método basado en una construcción plasmídica que expresa el transcrito de interés que forma una estructura de horquilla (short hairpin RNA), conocida como shRNA. El shRNA es procesado por la célula y tiene como blanco un RNAm que es degradado a través del proceso celular denominado interferencia del RNA (RNAi). Usando estos vectores de expresión de siRNA se puede reducir la expresión de genes blanco.

3.2 Elección de la secuencia blanco

Se seleccionaron seis secuencias blanco ubicadas en diferentes regiones del gen *Rad50* y para las cuales primero se realizó una extensa búsqueda y revisión bibliográfica, de la cual resultaron 2 secuencias que fueron RAD50.1(10) y RAD50.2 (11), adicional a esto se diseñaron 4 secuencias nuevas dirigidas contra distintas regiones del gen *rad50*. Una vez diseñados los oligonucleótidos para formar el inserto se clonaron en el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion). Se hibridaron volúmenes iguales (2 μ l) de cada uno de los oligonucleótidos, sentido y antisentido, (1 μ g / μ l) en solución de hibridación. Se incubó a 90°C durante 3 min para evitar que los oligonucleótidos no se plegaran sobre sí mismos y posteriormente a 37°C durante 1 h. Se prepararon alícuotas de oligonucleótidos hibridados a una concentración de 8 ng /ml y se almacenaron a -20°C hasta la ligación.

3.3 Ligación de los insertos siRNA dentro de pSilencer 5.1 U6 Retro

Para realizar la ligación del inserto generado al hibridar los oligonucleótidos sentido y antisentido se diluyó a una concentración final de 8 ng/ μ l (5 μ l del inserto en 45 μ l de agua libre de nucleasas). Posteriormente se preparó la reacción de ligación (1 μ l del inserto siRNA diluido, 6 μ l de agua libre de nucleasas, 1 μ l de buffer de ligasa T4 10x, 1 μ l del vector pSilencer 5.1 Retro y 1 μ l de T4 DNA ligasa



U6 Promoter 2245-2578
siRNA Insert 2181-2244
Pol II Promoter 2579-3083
Puromycin 3104-3703
ColE1 Origin 4483-5369
Ampicillin 5426-6286
5' LTR 735-1250
3' LTR 3960-4254
Psi (greek symbol) 1251-2140

Figura 3. Mapa del vector plasmidico p-Silencer U6 Retro. Mapa y características del vector plasmidico utilizado para silenciar el gen *rad50* en la imagen marcado en rojo se encuentra el sitio único de clonación donde se insertaran las secuencias interferentes.

(5 U/ μ l). Como control negativo se preparó una reacción de ligación sin el inserto (el inserto se sustituyó con 1 μ l de solución de hibridación de DNA 1x). Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 16°C. Los productos de las reacciones de ligación son empleados para transformar células *E. coli* DH5 α competentes obteniendo así las construcciones psilencer-Rad50.1, psilencer-Rad50.2, psilencer-Rad50.3, psilencer-Rad50.4, psilencer-Rad50.5, psilencer-Rad50.6.

3.4 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Para realizar la transformación se descongelaron en hielo alícuotas de células competentes *E. coli* DH5 α y luego se añadió la mezcla de ligación (3.0 μ l) mezclando suavemente. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min a 37°C, luego se dio un choque térmico a 42°C durante 90 seg y se volvió a incubar en hielo durante 3 min, teniendo cuidado de no mezclar o agitar la mezcla. A continuación se añadieron 200 μ l de medio Luria sin ampicilina e incubo a 37°C durante 45 min a 225 rpm. Finalmente se crecieron las bacterias transformadas en una placa con medio Luria-agar con ampicilina a 37°C durante toda la noche. Para determinar que clonas contienen el inserto se obtuvo ADN plasmídico y se liberó el fragmento de 63 pb mediante restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III.

3.5 Extracción del plásmido por lisis alcalina (Miniprep)

Para propagar las clonas se eligieron de 10-20 colonias aisladas y se inocularon en alícuotas de 3 ml de medio Luria con 100 µg de ampicilina. Se incubaron a 37°C en agitación durante 16 h. Luego, se tomaron 1.5 ml y se sedimentaron las células por centrifugación a 8000 rpm durante 3 min y se retiró el sobrenadante. A la pastilla se le extrajo el plásmido por lisis alcalina (minipreps). La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución I fría [(glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM)] y se agitó fuertemente en vórtex. Después se adicionaron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min para lisar las bacterias. Posteriormente, se agregaron 150 µl de solución III fría (acetato de potasio 3 M, pH 5.2), se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,000 xg durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y se centrifugaron a 12,000 xg durante 5 min. Se eliminaron los sobrenadantes y las pastillas (ADN plasmídico y ARN) se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 a 15 min. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua estéril y el ARN se degradó mediante incubación con 1 µl de RNasa A (10 mg/ml) durante 30 min a 37°C.

3.6 Liberación del inserto mediante digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III

Previo a la liberación del inserto mediante digestión enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III se cuantificó el ADN plasmídico y se visualizó en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (BrEt). Posteriormente se digirió 1 ug del ADN plasmídico con 10 unidades de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III durante 3 h a 37°C. El producto de la digestión se analizó en geles de acrilamida 6% teñidos con BrEt.

Posteriormente se seleccionó una clona de cada construcción y se secuenció en un secuenciador automático ABI-PRISM (applied Biosystem) empleando el oligonucleótido 5'-TTGTACACCCTAAGCCTC -3' el cual se alinea con el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion) desde el nt 2016 al 2035; 125 pb antes del primer nucleótido correspondiente al inserto. Mediante el resultado de secuenciación se descartó la construcción psilencer-Rad50.5 al no contener la secuencia correcta.

3.7 Transfección de las construcciones psilencer-Rad50.1, psilencer-Rad50.2, psilencer-Rad50.3, psilencer-Rad50.4, psilencer-Rad50.6. en la línea celular MDA-MB-231 y MCF-7.

Para realizar las transfecciones se expandieron las clonas seleccionadas, se purificaron los plásmidos empleando el kit de Promega Wizard Plus SV Minipreps ó el kit de QIAGEN Plasmid Midi y se cuantificó por espectrofotometría y

en gel de agarosa 1% teñido con BrEt. Las transfecciones se efectuaron empleando lipofectamina 2000. En una placa de 6 pozos se cultivaron en cada pozo 2.5×10^5 células MDA-MB-231 y 3.5×10^5 , al día siguiente se mezclaron 5 μ g ADN con 250 μ l de Opti-MEM y en otro tubo 8 μ l de lipofectamina 2000 con 250 μ l de Opti-MEM. Ambas mezclas se incubaron 5 minutos para luego combinar el ADN con la lipofectamina, Se homogenizo suavemente y se incubó unos 20-30 min a TA. Mientras se formaban los complejos se lavaron las células con 250 μ l de Opti-MEM, dos veces, posteriormente se retiró el Opti-MEM y se adicionaron 250 μ l de opti-MEM fresco. Posteriormente se agregaron los complejos a cada pozo mezclando suavemente balanceando la placa durante 1-2 min, y se incubaron las celulas a 37°C durante 5 h. Finalmente se retiró el medio, y se agregó DMEM-Glutamax con SFB 10% y se incubó a 37° C durante 48 h. Para evaluar si el método de transfección empleado era eficaz se transfectó el plásmido pEGFP-C2 (Clontech) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Para ello se transformaron bacterias *E.coli* DH5 α con el plásmido y se expandió el mismo para luego purificarlo empleando kit Wizard miniprep (Promega). Se cuantificó el ADNp y se transfectó en células MDA-MB-231 y MCF-7 utilizando diferentes volúmenes de lipofectamina y células en distinto número de pases para comparar. La evaluación de la transfeccion se realizó en un citómetro de flujo a 488 nm.

3.8 Análisis de la expresión del RNAm del gen *rad50*

Para evaluar los ensayos de transfección se realizó un ensayo de RT-PCR como se describe a continuación. El aislamiento del ARN total se realizó por extracción con una mezcla de fenol - isotiocianato de guanidina utilizando el reactivo TRIzol (Gibco BRL). La extracción del ARN se realizó según el protocolo sugerido por el proveedor con modificaciones en los volúmenes empleados. Brevemente, la pastilla celular se lisó con 200 μ l de TRIzol, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se le agregaron 40 μ l de cloroformo. Después de mezclar vigorosamente para homogenizar, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min para obtener en la fase acuosa el RNA, el cual se precipitó con 100 μ l de isopropanol y se incubó durante 10 min a TA. Se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%. Nuevamente se centrifugó a 12000 xg por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla de ARN se secó durante 5 a 10 min a TA y se resuspendió en agua libre de ribonucleasas (agua tratada con dietilpirocarbonato). El RNA se disolvió y cuantificó en un espectrofotómetro (BioMate3, Thermo spectronic) y se visualizó en un gel de agarosa 1% teñido con BrEt. Dado que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 44 μ g/ml de ARN de cadena sencilla, la concentración de RNA se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación: $[\text{ARN } \mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 44.19 \times$ factor de dilución.

3.9 Síntesis del DNA complementario

Para sintetizar el DNA complementario (cDNA) primero se incubó 1 µg de ARN total con 10 unidades de DNasa libre de RNasas (Roche) durante 10 min a 37 °C y así se eliminó el ADN contaminante que pudiera haber quedado en el ARN total después de su extracción. Posteriormente, se inactivó la DNasa I adicionando 1 µl de EDTA 25 mM a cada tubo de reacción y se incubó a 65 °C durante 15 min. Este último paso es muy importante debido a que esta mezcla de RNA total se utilizó en los pasos siguientes para la síntesis del cDNA y del amplificado de DNA durante la reacción de PCR. A continuación se le agregó una mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 2 mM de c/u, 100 ng de oligonucleótido dT, buffer de reacción para la enzima Superscript II™ de Invitrogen (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 1mM), DTT 10 mM y 40 unidades del inhibidor de RNasa RNASEOUT (Invitrogen) y se incubó a 27 °C durante 3 min. Posteriormente, se agregaron 200 U de enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) y la mezcla se incubó a 42 °C durante 90 min para permitir que la retrotranscriptasa sintetizara el ADNc. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.10 Amplificación del gen *rad50* mediante PCR

Una vez diseñados los oligonucleótidos específicos que amplificaron un fragmento de *rad50* se efectuó la cuantificación. Para ello se realizó su corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X y se tiñó con

BrEt para su visualización bajo la exposición a luz UV. Dada la existencia de una relación lineal entre la concentración de los oligonucleótidos en solución y su $A_{260\text{nm}}$, se determinó la concentración de éstos mediante espectrofotometría. Se ha determinado que 1 unidad de $A_{260\text{nm}}$ de oligonucleótidos de cadena sencilla corresponde a 33 μg , por lo tanto, la concentración puede determinarse bajo la siguiente ecuación:

$$[\text{Oligonucleótidos } \mu\text{g/ml}] = (A_{260\text{nm}}) \times (33) \times (\text{factor de dilución de los oligonucleótidos})$$

Se realizó la PCR con DNA genómico de la línea celular MCF-7 extraído con el kit de Promega Wizard Genomic DNA Purification para establecer las condiciones de la amplificación por PCR. La mezcla de reacción consistió en buffer de PCR 1x (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, Invitrogen), dNTPs 2 mM de c/u, 1.5 mM MgCl_2 (Invitrogen), 1U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 100 ng de DNA genómico, agua, 0.4 μM de cada oligonucleótido. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C/ 3 min de desnaturalización inicial, luego 35 ciclos de 94°C/45 seg, 48°C/30 seg y 72°C/30 seg y el paso de extensión final de 72°C/7min.

3.11 Amplificación del gen *rad50* mediante PCR a partir de DNA complementario

Para las reacciones de PCR, se tomaron 1/3 del volumen de la reacción anterior (que contiene el cDNA) y se añadieron dNTPs a una concentración final de 1 mM, 2 unidad de Taq DNA polimerasa (Fermentas), 0.4 μM de cada

oligonucleótido para *rad50*, 2.7 mM MgCl₂ (Invitrogen) y agua. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C/ 3 min de desnaturalización inicial, luego 35 ciclos de 94°C/30 seg, 48°C/30 seg y 72°C/30 seg y el paso de extensión final de 72°C/7 min. Cada reacción de RT- PCR, para *rad50*, fue acompañada de una reacción que sirve como control negativo, denominado RT-, que consistió en la reacción de PCR tal cual se explicó anteriormente, excepto que se le adicionó el RNA total en lugar del DNAC, esto con el fin de detectar contaminación por DNA.

3.12 Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Los productos amplificados correspondientes al gen *rad50*, así como sus correspondientes controles - (RT-) que se resolvieron mediante PAGE al 6% en amortiguador TBE 1X. El gel posteriormente se tiñó con BrEt y visualizó en un transiluminador de luz UV. La intensidad de las bandas resultantes se cuantificaron mediante análisis densitométrico utilizando el programa Multigauge (Fujifilm).

4. Evaluación de quimiosensibilidad al tratamiento con *cis*-platino y las combinaciones *cis*-platino/doxorubicina y *cis*-platino/paclitaxel de las líneas celulares de CM

4.1 Evaluación de quimiosensibilidad al *cis*-platino (ensayo de exclusión por azul de tripano)

Para realizar este ensayo, un día previo a la transfección se cultivaron las células (3.5×10^5 células/pocillo en placas de 6 pozos). Al día siguiente se realizó la transfección como se describió en el inciso. Posteriormente, se incubó durante 48 hrs para que se exprese el transcrito. Transcurrido dicho periodo se agregó el *cis*-platino (CDDP) a una concentración letal (DL50) 50 de $25.86 \mu\text{M}$ (determinada a 24 hrs) y se incubó durante 12, 24, 36 y 48 h. Una vez transcurrido el periodo indicado de incubación se retiró el CDDP y se agregó medio fresco para que se recuperen las células o se analizó la viabilidad directamente. Para analizar la viabilidad celular luego del tratamiento con CDDP se retiró el medio y se lavaron las células con PBS x pH 7 posteriormente se añadieron 1.5 ml de PBS-EDTA 6.8 mM y 64 μl de tripsina (0.25%), se incubaron las células 5 min a 37°C . Posteriormente se centrifugó la suspensión de células a 1500 rpm a 4°C durante 5 min. Una vez obtenido el paquete celular se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS, se mezclaron 10 μl de suspensión de células con 10 μl de azul de tripano y se incubaron 2 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la viabilidad contando las células vivas en el equipo TC10 automated cell counter (Bio Rad)

4.2 Determinación de daño a DNA en las líneas celulares de CM después del tratamiento con quimioterapéuticos y silenciadas para el gen *rad50* .

Determinación del estado fosforilado de la histona H2AX

Se obtuvieron extractos totales de células transfectadas y no transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad tratadas y no tratadas con *cis*-plano a los tiempos 30 min, 3 hrs. y 12 hrs, se corrieron 50 µg de extractos totales en un gel de acrilamida al 15%, se transfirió en membrana de nitrocelulosa, se bloqueó la membrana con PBS-Tween.05%-BSA 5%, 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, se realizaron 3 lavados en PBS de 10 min. Se incubó el anticuerpo primario 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno, se incubó el anticuerpo secundario 1 hrs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno se y reveló la membrana por quimioluminiscencia con ECL y autoradiografía.

Evaluación de la fragmentación del DNA mediante ensayo de TUNEL

Se sembraron 350,000 células por pozo en placas de 6 pozos, sobre cubre objetos estériles, se transfectaron las células con la construcción pSilencer-Rad50.6 y se dejaron recuperar las células durante 48 hrs. Se realizó tratamiento con *cis*-platino analizando el daño a DNA a los 30 min, 3 hrs y 12 hrs.

Las células tratadas con *cis*-platino se fijaron con solución de paraformaldeído al 4% durante 45 min. a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con PBS se bloquearon la laminillas con solución bloqueadora metanol-H₂O₂ .3% durante 60 min a 37°C, se permeabilizaron las células durante 2 min en hielo con solución de PBS-triton-X100 2%. En un tubo estéril se mezclaron 450 µl de solución de marcaje con 50 µl de enzima deoxinucleotidil transferasa terminal. Se lavaron 2 veces con PBS las células permeabilizadas. Se adicionaron 50 µl de mezcla solución de marcaje/enzima a las células y se incubaron durante 1h a 37°C protegiendo de la luz, una vez transcurrido el tiempo de incubación las laminillas con las células se lavaron 3 veces PBS, se adicionaron a las celular 25 µl de solución converter-POD y se incubaron durante 30 min a 37°C, se lavaron las células 3 veces con PBS se agregaron 50 µl de sustrato DAB y se incubaron durante 10 min a TA, transcurrido el tiempo de incubación las laminillas se lavaron 3 veces con PBS , las laminillas se montaron en portaobjetos con solución PBS/glicerol 1:1 las muestras se analizaron en microscopio óptico de campo claro. Las células positivas a daño generado o en estado de apoptosis tendrán una coloración de café a marrón.

VI. RESULTADOS

1. Diseño de 2 secuencias dirigidas contra 2 blancos diferentes en el gen *rad50* y clonación en el vector pSilencer-U6-retro

Para el diseño de las secuencias interferentes Rad50.1 y Rad50.2 se realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de encontrar secuencias blanco para las cuales se haya reportado un silenciamiento eficaz del gen *rad50*. Se encontraron 4 secuencias reportadas de las cuales se eligieron dos, la secuencia reportada por, Hui Zhong (2005) y la reportada por Weihang Chai (2006) las cuales presentaban un mayor porcentaje de silenciamiento del gen *rad50*. Las secuencias blanco se muestran en la tabla 1.1

Posteriormente se empleó el convertidor online de Ambion, recomendado para el diseño de oligos a clonar en el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la tabla 1.2 Posteriormente, se procedió a realizar la clonación de los oligonucleótidos hibridados Rad50.1 y Rad50.2 en el vector, para obtener las construcciones pSilencer-Rad50.1 y pSilencer-Rad50.2, respectivamente.

Para determinar si las clonas bacterianas seleccionadas después de la clonación y transformación de bacterias contenían el inserto del tamaño esperado (63 pb) necesario para expresar los transcritos capaces de silenciar la expresión del gen *rad50*, se purificó el DNA plasmídico de 3 clonas para cada una de las construcciones y se realizó una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para liberar el inserto (figura. 4A y B). Por otro lado, se transformaron bacterias

con un plásmido que se empleó como control negativo, el cual produce un transcrito sin homología con ninguna secuencia codificante del genoma humano (secuencia scramble) (figura 4C). Debido a que en ambas clonas no se logró observar que hubiera una clara liberación del inserto, se optó por secuenciar el DNAp de las clonas 1 y 2 pSilencer-Rad50.1 y las clonas 1 y 2 pSilencer-Rad50.2, como se muestra en la figura 5.

2. Silenciamiento de la expresión del gen *RAD50* en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 mediante la transfección de las construcciones pSilencerRad50.1 y Rad50.2

Antes de iniciar con los ensayos de transfección y silenciamiento del gen *rad50* en las líneas celulares de cáncer de mama se realizó un análisis de la expresión de la proteína RAD50 en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 y definir si en alguna de estas líneas celulares se expresa en mayor cantidad. El análisis se realizó utilizando los anticuerpos especificados en la tabla 2.1. Como control de carga se empleó el anticuerpo dirigido contra actina actina.

Como se puede observar en la figura 6, la expresión de la proteína RAD50 es muy similar en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. También se realizó el análisis de la línea celular ZR-75-1 puesto que previamente se había reportado que la proteína RAD50 no se expresaba o se expresaba muy poco en esta línea celular, por lo que se pensó que esta línea celular podría ser estar una silente natural para RAD50.

Tabla 1.1 Secuencias blanco utilizadas para el silenciamiento del gen *rad50* en distintos tipos de cáncer

Secuencia blanco	Referencia	Tipo de cáncer	% Silenciamiento
GCAGACTTAGACAGGACCC	Hui Zhong (2005)	Cáncer de cabeza y cuello	95
GAACTTATAGCTGTGCAA	Biard (2007)	Cáncer de cabeza y cuello	70
GGAGAAGGAAATACCAGAA	Weihang C hai (2006)	Cancer cervicouterino	80
AGGAACAGATTCAACATCTA A	Ze-Huai Zhong (2007)	Fibrosarcoma	65

Tabla 1.2 Secuencia de los oligonucleótidos que se emplearon para silenciar el gen *rad50*

Nombre	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti sentido
Rad50.1	5'GATCCGCAGACTTAGACAGG ACCCTTCAAGAGAGGGTCCTGT CTAAGTCTGCTTTTTTGGAAA-3'	3'GCGTCTGAATCTGTCCTG GGAAGTTCTCTCCCAGGACAGA TTCAGACGAAAAAACCTTTTCGA-5'
Rad50.2	5'GATCCGGAGAAGGAAATACCA GAATTCAAGAGATTCTGGTATTT CCTTCTCCTTTTTTGGAAA-3'	3'GCCTCTTCCTTTATGGTCTTAAGT TCTCTAAGACCATAAAGGAAGAGGA AAAACCTTTTCGA-5'

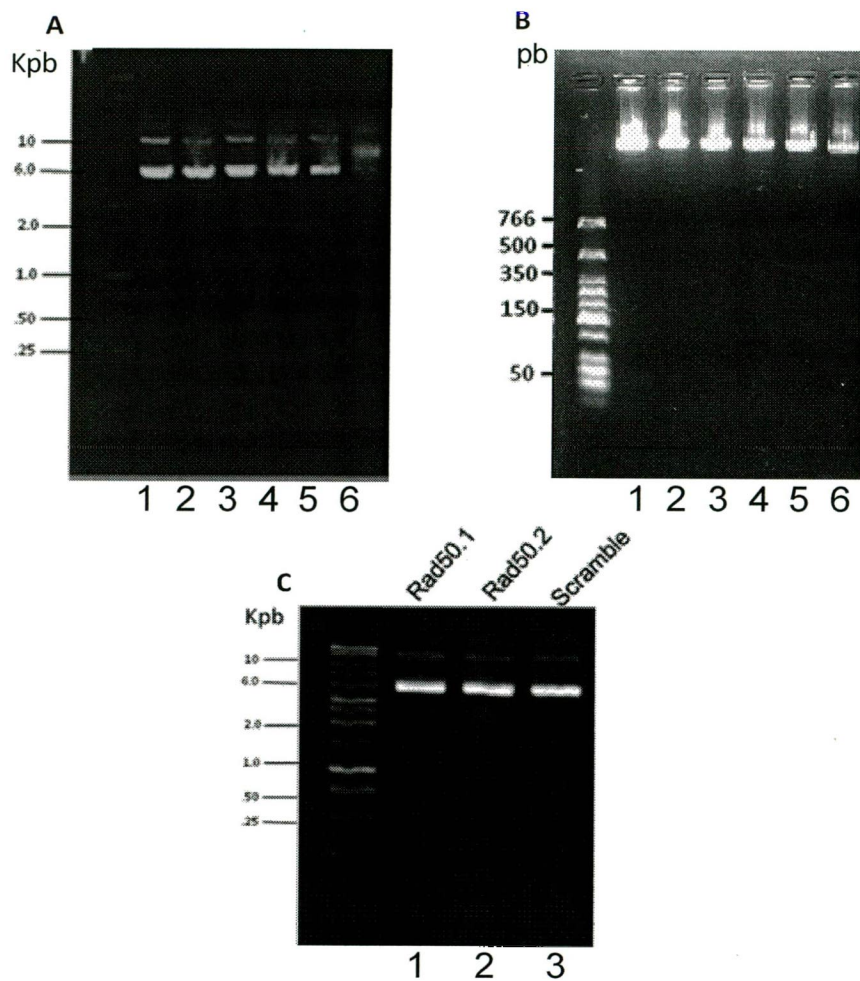


Figura 4. Análisis de los plásmidos candidatos para verificar la clonación de las secuencias Rad50.1 y Rad50.2 en el plásmido pSilencer. (A) Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt donde se muestra el DNA plasmídico purificado de 3 clones de pSilencer-Rad50.1 (carriles 1,2 y 3) y 3 clones de pSilencer-Rad50.2 (carriles 4,5 y 6). **(B)** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt donde se muestra el resultado de la doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III de las clones de pSilencer-Rad50.1 (1,2 y 3) y 3 las clones de pSilencer-Rad50.2 (4,5 y 6). No se logra observar la liberación de inserto de 63 pb. **(C)** Plásmido control pSilencer-Scramble junto con las construcciones pSilencer-Rad50.1 y pSilencer-Rad50.2.

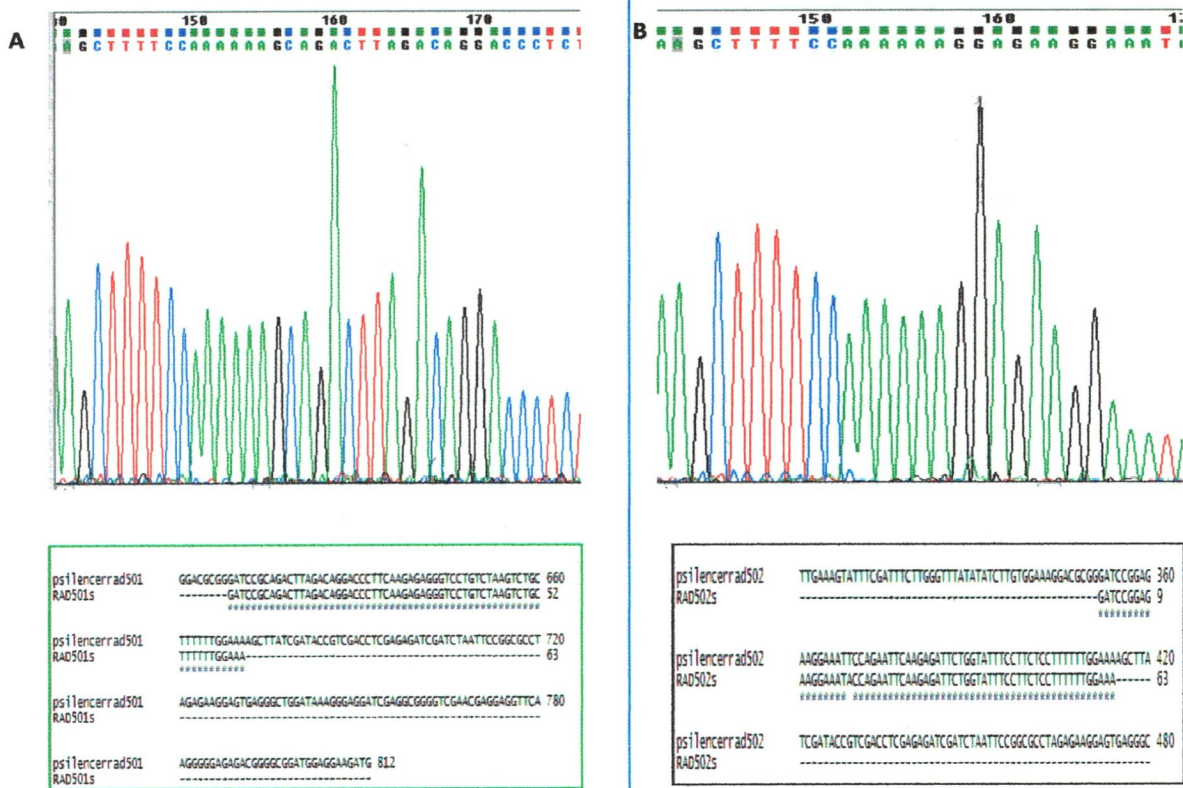


Figura 5. Electroferogramas y secuencias obtenidas de pSilencer-Rad50.1, pSilencer-Rad50.2. (A) Secuencia de la clona 1 Rad50.1, (B) Secuencia de la clona 1 Rad50.2. En cada caso se muestra el alineamiento de la secuencia del plásmido pSilencer con las secuencias interferentes diseñadas Rad50.1 y Rad50.2.

Sin embargo al realizar el Western blot con extractos totales de la línea celular ZR-75-1 se mostró que esta línea celular expresaba la proteína RAD50 y que su nivel de expresión era muy similar al observado para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

Con base en estos resultados, decidimos utilizar la línea celular MCF-7 y MDA-MB-231 para evaluar el efecto de silenciar el gen *rad50* en respuesta al tratamiento con *cis*-platino. Además estas líneas celulares resultan interesantes puesto que representan los 2 principales tipos de cáncer de mama, aquellos que son Her2 positivo como MCF7 y ER/PR/Her2 triple negativos como MDA-MB-231 ya que el *cis*-platino se utiliza en tumores que son triples negativos. La línea celular ZR-75-1 se descartó como posible control positivo, puesto que si expresa la proteína RAD50.

Con el objetivo de silenciar el gen *rad50* en las líneas celulares estables de MDA-MB-231 y MCF-7, se realizó un primer ensayo de transfección utilizando lipofectamina 2000 y cultivando en placas de 6 pozos 3.5×10^5 células MDA-MB-231 y 2.5×10^5 células MCF-7 por pozo un día antes de la transfección y al otro día se transfectó con 800 ng de pSilencer-Rad50.1, pSilencer-Rad50.2 y 2 μ l de lipofectamina por pozo, durante 6 h.

Tabla 2.1 Anticuerpos empleados para la inmunodetección de la proteína RAD50 y actina.

Proteína	PM (KDa)	Anticuerpo 1°	Dilución del Ac 1°	Anticuerpo 2°	Dilución del Ac 2°
RAD50	153.9	Rad50(13B3/2C6): sc-56209;Acmo, Santa Cruz	1/400	Anti-mouse- HRP	1/5000
Actina	41.8	Actin(C-2):sc-8432; Acmo,Santa Cruz	1/1000	Anti-mouse- HRP	1/5000

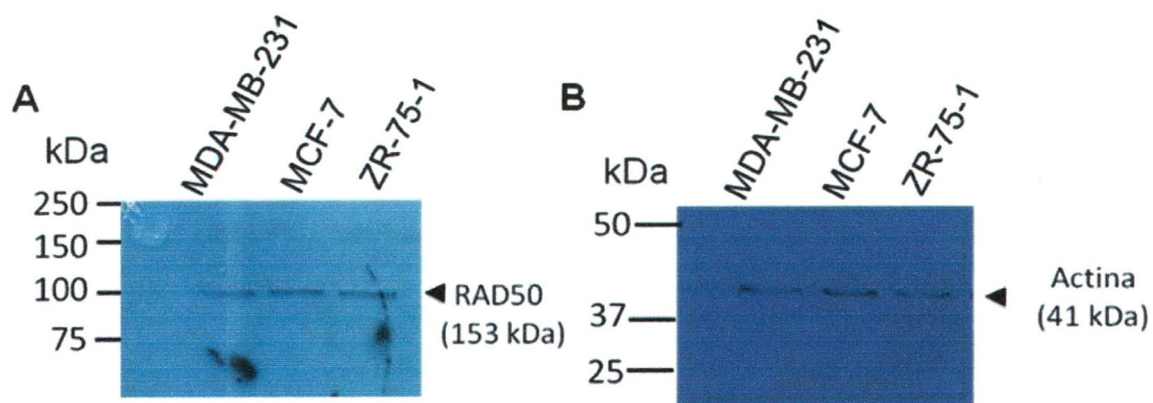


Figura 6. Análisis de la expresión de la proteína RAD50 por Western blot en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1. (A) Western blot, para detectar las proteínas RAD50 en extractos totales. (B) se utilizó actina como control de carga. Se emplearon 100 µg de extractos totales de cada línea celular.

Al término del proceso de transfección se observaron claras diferencias en la cantidad de células adheridas entre las transfectadas y no transfectadas ya que aquellas células que fueron transfectadas con los plásmidos Rad50.1 y Rad50.2 aproximadamente el 80 % de las células estaban despegadas mientras que las células control a las cuales solo se les adicionó lipofectamina más del 70 % estaban adheridas. Por lo que se decidió disminuir el tiempo de transfección a 5 h.

En un segundo intento de transfección se utilizaron las mismas condiciones salvo que el tiempo de transfección se acortó a 5 h. En este caso también se pudo observar diferencias entre las células transfectadas y no transfectadas e inclusive entre las dos líneas donde las células MDA-MB-231 se veían más afectadas por el proceso de transfección, llegando casi al 30% de células despegadas, para las células transfectadas y solo un 20% para las no transfectadas. Para las células MCF-7 no se veía un efecto importante llegando a un 10% de células despegadas en células transfectadas y no transfectadas. Por lo que se decidió realizar un ensayo de Western blot para analizar si se estaba silenciando la expresión de la proteína RAD50 bajo estas condiciones por lo que se obtuvieron extractos proteicos totales a las 24 y 48 h post-transfección. Los resultados se muestran en la figura 7 donde se puede observar que no hay diferencia entre los niveles de expresión de células transfectadas y no transfectadas, ni entre las construcciones o líneas celulares.

Se realizó un tercer ensayo modificando las condiciones de transfección incrementando la cantidad de DNA plasmidico a 1µg y 5 µl de lipofectamina 2000 por pozo. En la figura 8A se puede observar que al realizar el Western blot de las

células no transfectadas contra células transfectadas 24 y 48 h pos transfección no se observan diferencias en el nivel de expresión de RAD50. Por lo cual se decide hacer una variación mas al protocolo de transfección incrementando ahora la cantidad de DNA plasmidico a 2 µg y 5 µl de lipofectamina por pozo. Analizando por Western blot la expresión de RAD50 a las 24 y 48 hrs post-transfección y en células no trasfectadas , no se pueden observar diferencias en el nivel de expresión de RAD50 entre células transfectadas y no transfectadas. (figura 8B)

Hasta el momento no se había logrado obtener el resultado esperado es decir la inhibición de la expresión del gen *rad50*, por lo que se decidió realizar el diseño de otro set de secuencias interferentes, para lo cual se eligieron secuencias blanco cerca del extremo 3' del mRNA de RAD50. De manera inicial se diseñaron 10 secuencias y al realizar un análisis BLAST para ver si estas eran 100% específicas para el gen *rad50* humano solo 4 resultaron ser específicas. En la tabla 2.2 se muestra las secuencias blanco y en la figura 9 los 4 oligonucleótidos interferentes diseñados. Se empleó el convertidor online de Ambion, recomendado para el diseño de insertos a clonar en el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion).

Posteriormente, se procedió a realizar la clonación de los oligonucleótidos hibridados Rad50.3, Rad50.4, Rad50.5 y Rad50.6 en el vector

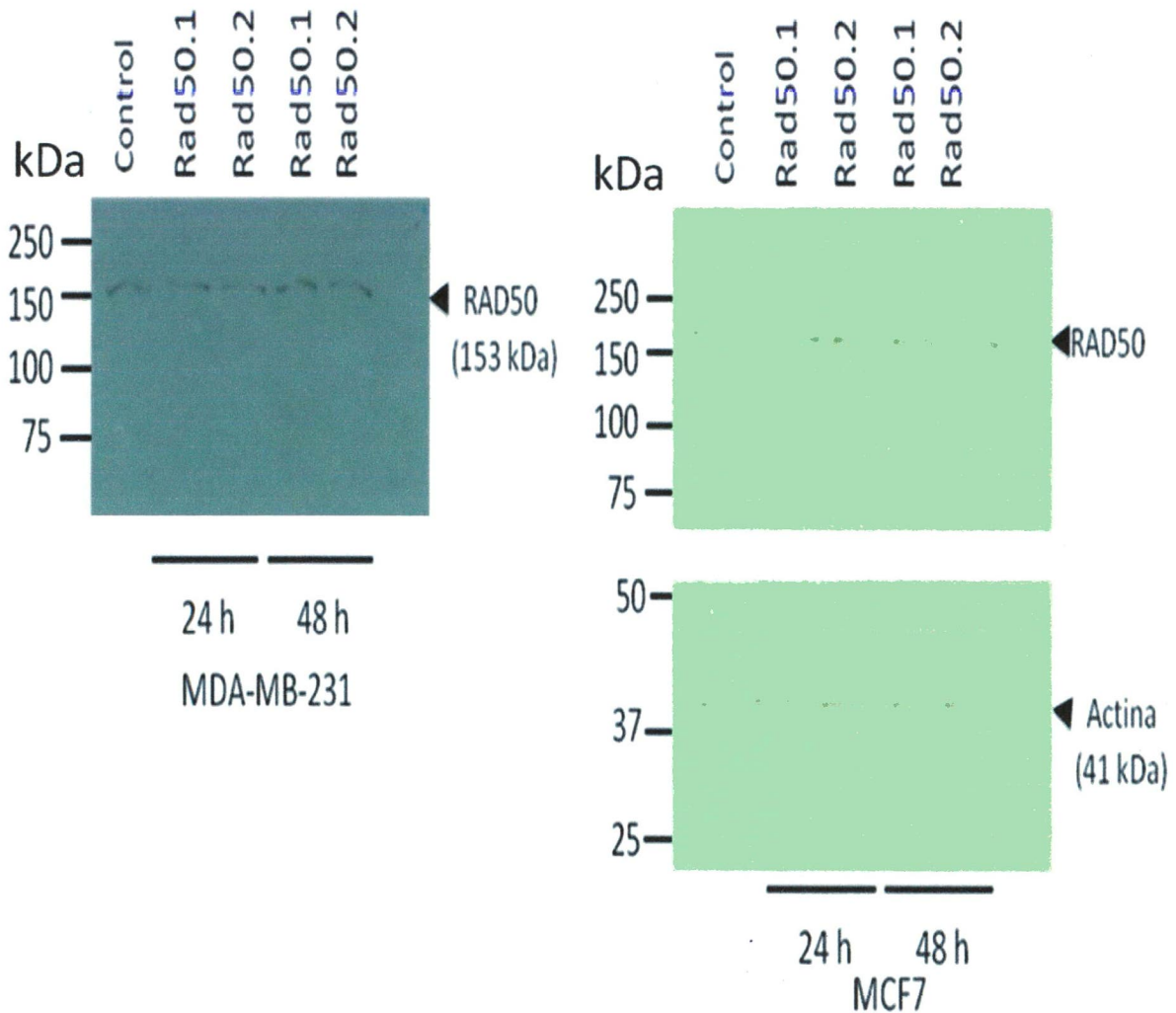


Figura 7. Análisis por Western blot de la expresión de proteína RAD50 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 transfectadas con los plásmidos pSilencer-Rad50.1 y pSilencer-Rad50.2. Se emplearon de cada línea celular 50 µg de extractos totales y se utilizó actina como control de carga, analizando la expresión de RAD50 a las 24 y 48 hrs en ambas líneas celulares.

para obtener las construcciones pSilencer-Rad50.3, pSilencer-Rad50.4, pSilencer-Rad50.5, pSilencer-Rad50.6 respectivamente. Para determinar si las clonas seleccionadas después de la clonación y transformación de bacterias contenían el inserto del tamaño esperado (63 pb), necesario para expresar los transcritos capaces de silenciar la expresión del gen *rad50*, se purificó el DNA plasmídico para cada una de las construcciones y se realizó una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III para liberar el inserto (figura 10).

Como se puede observar en la figura 10, no hubo liberación del inserto del tamaño esperado (63 pb) por lo que se optó por secuenciar las construcciones para verificar que estuvieran presentes las 4 secuencias clonadas en el vector pSilencer (figura 11). Como se puede observar las secuencias Rad50.3, Rad50.4, y Rad50.6 se clonaron correctamente en el plásmido y no se observan mutaciones por lo que son buenos candidatos para realizar ensayos de transfección, sin embargo la secuencia 5 se descartó debido a que esta presentaba mutaciones.

Posteriormente se realizó un ensayo para evaluar la eficiencia de transfección para lo cual se probaron las condiciones utilizadas en el último ensayo de transfección, pero en lugar de las construcciones pSilencer se utilizó un plásmido control pGFP-c2 el cual al excitarse a una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia que es detectable en un citómetro de flujo.

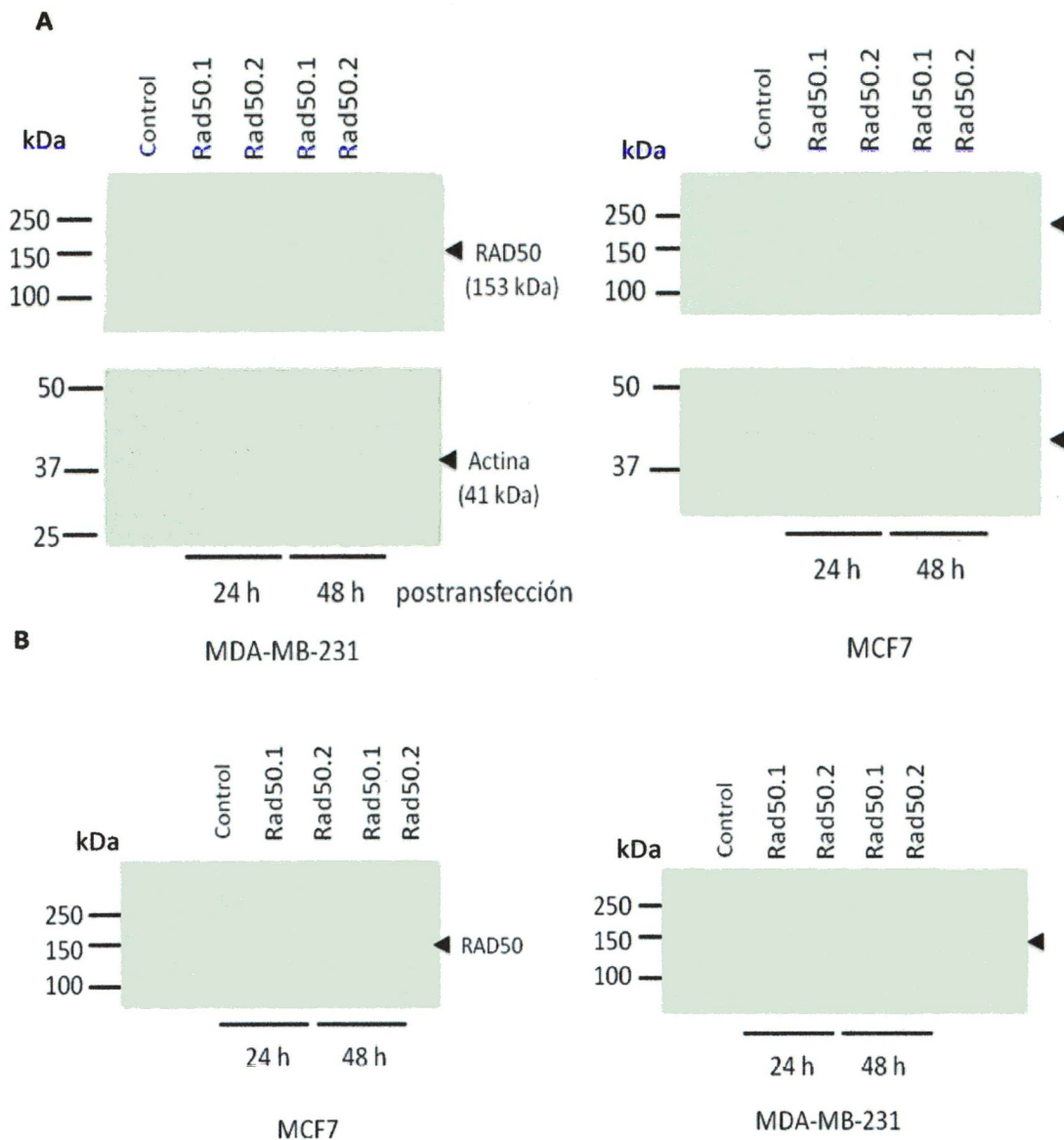


Figura 8. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína RAD50 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.1 y pSilencer-Rad50.2. (A) Western blot, para detectar RAD50. Se emplearon 50 µg de extractos proteicos totales de cada línea celular, se transfectó 1µg de plásmidos RAD50.1 y RAD50.2 con 5 µl de lipofectamina 2000 (B) Western blot, para detectar RAD50. Se emplearon 75 µg de extractos proteicos totales de cada línea celular. Se trasfectaron 2µg de los plásmidos RAD50.1 y RAD50.2 con 5 µl de lipofectamina y se utilizó actina como control de carga.

Tabla 2.2 Secuencias blanco utilizadas para el silenciamiento del gen *rad50*

Secuencia blanco	Nombre	Posición en el mRNA de RAD50
AACATCGATCAGTGCTCAGAG	pSilencer-Rad50.3	4354-4375
AAATGCAGTGTTAGCTCCCTG	pSilencer-Rad50.4	4381-4402
AATTATACGTGACCTGTGGCG	pSilencer-Rad50.5	3915-3936
AAGGCGGAATTATAACTACCG	pSilencer-Rad50.6	4014-4035

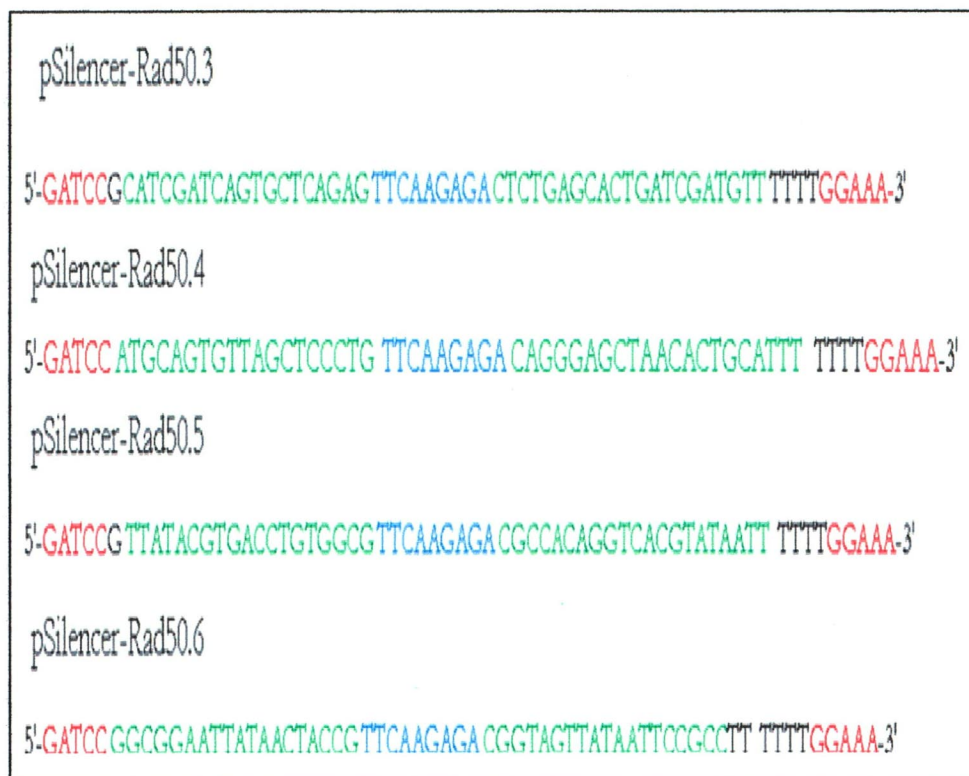


Figura 9. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para silenciar la expresión del gen *rad50*. En la figura se muestra un set de 4 secuencias diseñadas para silenciar el gen *rad50*. En rojo se marcan las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, en verde se muestra la secuencias sentido y antisentido, en azul la secuencia que forma el loop y en negro la secuencia terminadora para la RNA polimerasa III.

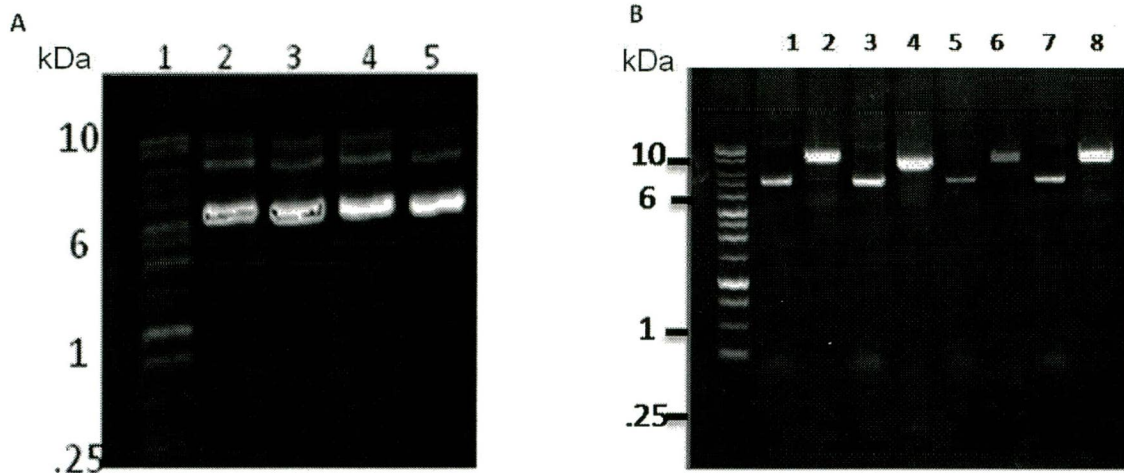


Figura 10. Análisis de los plásmidos candidatos para verificar la clonación de los insertos Rad50.3, Rad50.4, Rad50.5 y Rad50.6 en el plásmido pSilencer. (A) Gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red donde se muestra el resultado de la purificación del DNA plasmídico de 1 clona de pSilencer-Rad50.3 (2), Rad50.4 (3), Rad50.5 (4) y Rad50.6 (5) **(B)** Gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red donde se muestra el resultado de la doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III de las clonas de. pSilencer-Rad50.3 (1), Rad50.4 (3), Rad50.5 (5) y Rad50.6 (7) también se muestran los plásmidos sin cortar pSilencer-Rad50.3 (2), Rad50.4 (4), Rad50.5 (6) y Rad50.6 (8).

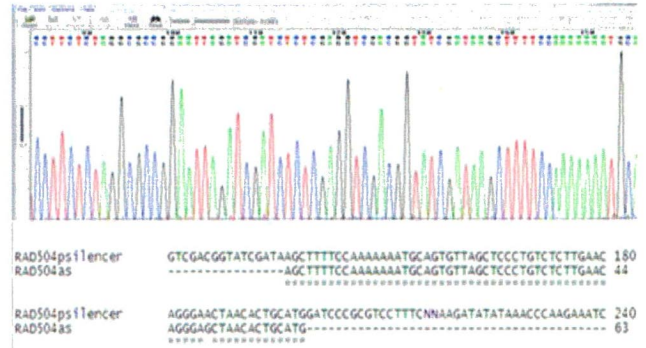
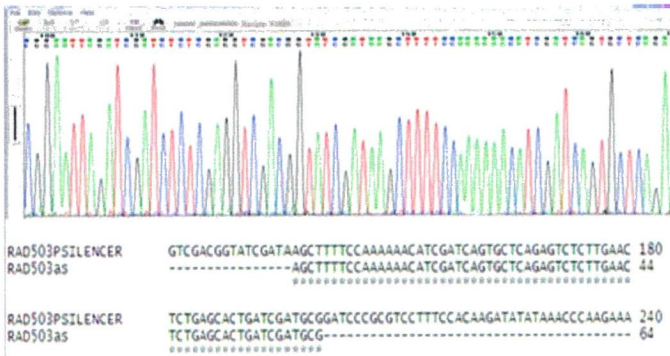
El resultado obtenido de este ensayo fue de muy baja eficiencia de transfección en las condiciones utilizadas hasta el momento, por lo cual se modificaron las condiciones incrementando la cantidad de DNA plasmidico a 5 μg y analizando distintos volúmenes de lipofectamina 5,8 y 10 μl . Se utilizaron células HeLa como control las cuales son mas permisibles para ensayos de transfección además de que se utilizaron células de mama con distinto números de pases (57 y 33). El resultado obtenido se muestra en la figura 12 donde se puede observar que las células HeLa se transfectan con una alta eficiencia del 85 % y que no hay diferencia significativas al utilizar diferentes volúmenes de lipofectamina. Para las células MDA-MB-231 la eficiencia de transfección fue menor, entre 40 y 48%, además de que hubo ligeras diferencias al utilizar diferentes volúmenes de lipofectamina 2000, obteniendo una mayor eficiencia de transfección al utilizar 8 μl del agente. Para las células MCF-7 la eficiencia de transfección fue menor y hubo diferencias notables entre las células con diferente numero de pases siendo más permisivas para la transfección las células con 33 pases obteniendo 36% de eficiencia de transfección al utilizar 8 μl de lipofectamina 2000. Para las células MCF-7 con 57 pases utilizando el mismo volumen de lipofectamina se obtuvo una eficiencia de transfección del 20%. Posteriormente se realizó un primer ensayo de transfección utilizando las condiciones optimas de transfección, es decir 8 μl de lipofectamina, 5 μg de DNA plasmidico, 5 hrs de transfeccion y células con no más de 45 pases y las

construcciones pSilencer-Rad50.1, pSilencer-Rad50.2, pSilencer-Rad50.3, pSilencer-Rad50.4, pSilencer-Rad50.6

La transfección se realizó en ambas líneas celulares, observándose diferencias notables entre las células transfectadas y las no transfectadas e incluso entre líneas celulares. A las células MDA-MB-231, el propio proceso de transfección provocó que se despegara un gran número de células, alrededor del 40-50%. Para la línea celular MCF-7, el panorama fue diferente despegándose solo el 15-25% de las células transfectadas con las 6 construcciones. Por lo cual se continuó con el análisis de esta línea celular, para la cual se realizó un ensayo de Western blot para determinar si alguna de las construcciones fue capaz de silenciar la expresión de RAD50. En la figura 13A se puede observar que las construcciones pSilencer-RAD50.4 y pSilencer-Rad50.6 son capaces de silenciar la expresión de la proteína RAD50 en la línea celular MCF-7 aproximadamente 95 y 98 % respectivamente. También se puede observar una disminución importante del mRNA de *rad50* al analizar la expresión del mismo por RT.PCR a las 48 h después de la transfección (Figura 13B). Se puede observar una disminución importante en la expresión del mRNA de *rad50* en las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6.

Rad50.3

Rad50.4



Rad50.5

Rad50.6

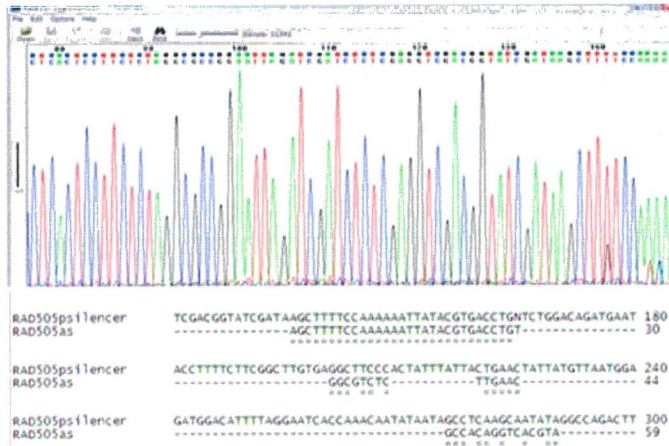


Figura 11. Electroferogramas y secuencias obtenidas de las construcciones pSilencer-Rad50.3, pSilencer-Rad50.4, pSilencer-Rad50.5 y pSilencer-Rad50.6. Secuencias de las clonas de pSilencer-Rad50.3, pSilencer-Rad50.4, pSilencer-Rad50.5 y pSilencer-Rad50.6. En cada caso se muestra el alineamiento de los insertos clonados en el plásmido pSilencer secuenciado y las secuencias interferentes Rad50.3, Rad50.4, Rad50.5 y Rad50.6 sintéticas. Se observa que la secuencia Rad50.5 clonada presenta mutaciones, mientras que Rad50.3, Rad50.4, y Rad50.6 permanecen intactas.

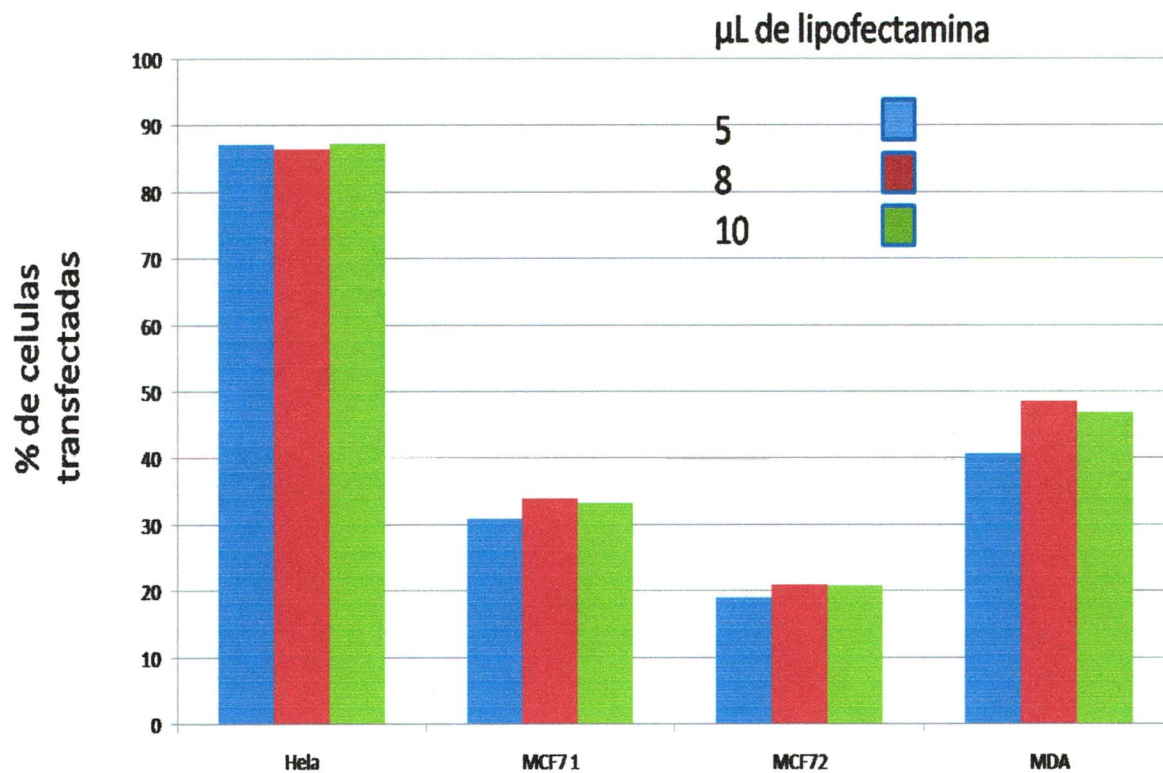


Figura 12. Ensayo para evaluar la eficiencia de transfección en diversas líneas celulares. Se transfectaron 250,000 células por pozo utilizando 5,8 y 10 µl de lipofectamina y 5 µg de del plasmido pEGFP-C2. Las células HeLa utilizadas en este ensayo tenían 40 pases, las células MCF-7 1 33 pases, MCF-7 2 57 pases y las MDA-MB-231 43 pases.

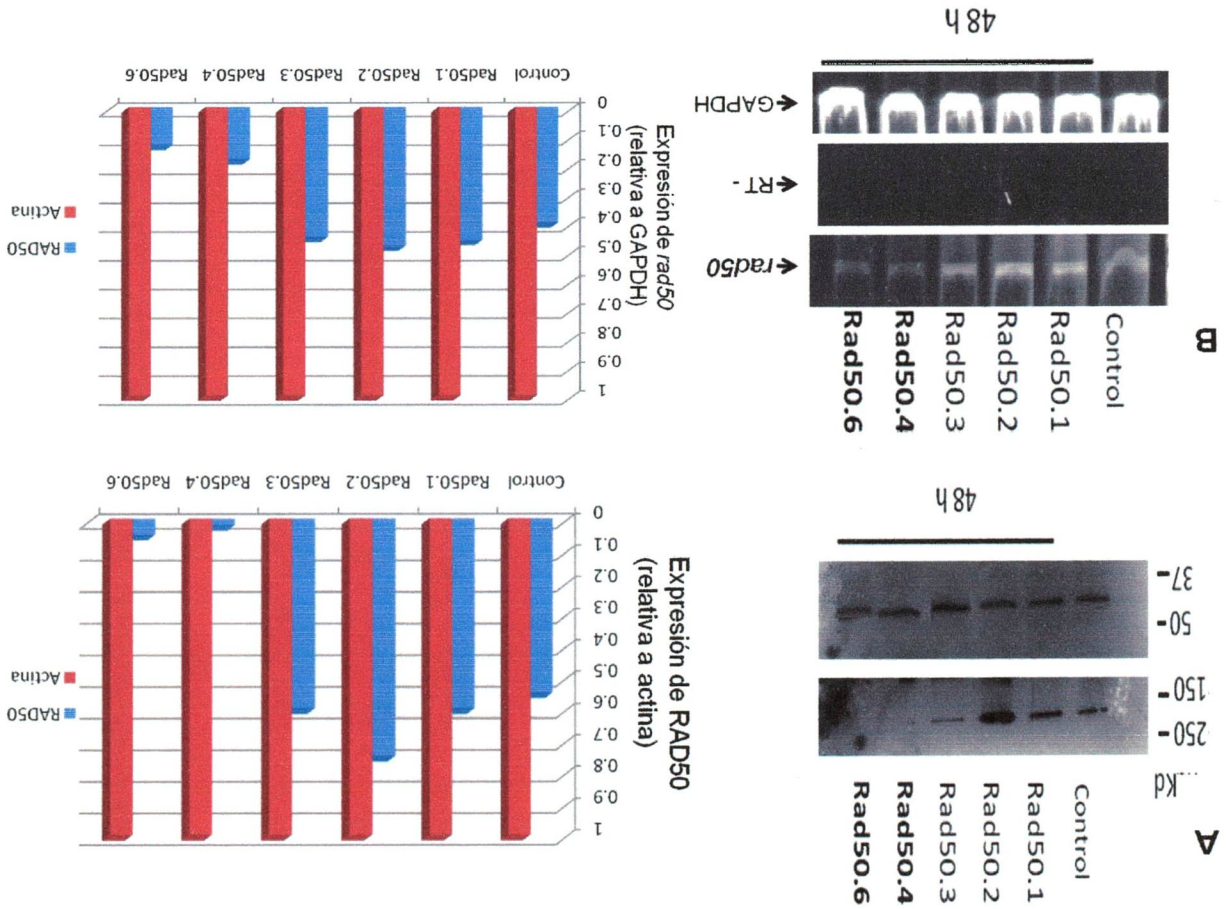


Figura 13. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína RAD50 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, transfectadas con los plásmidos psiencer-Rad50.1, psiencer-Rad50.2, psiencer-Rad50.3, psiencer-Rad50.4 y psiencer-Rad50.6. (A) Se utilizaron 50 µg de extractos totales, los extractos fueron obtenidos 48 hrs pos transfección. Se realizó el análisis de las bandas por densitometría y se obtuvo el nivel de expresión de RAD50 con respecto a actina. (B) RT-PCR células transfectadas con las 5 construcciones para determinar la expresión del mRNA de rad50 en la línea celular MCF-7 a las 48 pos-transfección.

3. Evaluación del efecto del silenciamiento de *rad50* en el crecimiento de la línea celular MCF-7 en respuesta al tratamiento con las combinaciones *cis*-platino/doxorubicina y *cis*-platino/paclitaxel

Una vez que se logró silenciar la expresión del gen *rad50* en la línea celular MCF-7 se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento al tratar las células transfectadas con el quimioterapéutico *cis*-platino, y tratarlas con las combinaciones *cis*-platino/doxorubicina y *cis*-platino/paclitaxel para lo cual, lo primero que se hizo fue determinar la concentración letal media del *cis*-platino. Se colocaron 250,000 células MCF-7 en placas de 6 pozos y fueron tratadas con concentraciones crecientes de *cis*-platino (0-300 μ M) durante 24 h. Después del tratamiento se midió la viabilidad celular mediante el método de exclusión por azul de tripano. En la figura 14 se puede observar que la dosis letal media (DL50) fue de 25.8 \pm 1.3 μ M. Una vez teniendo la DL50 se procedió a realizar el tratamiento con *cis*-platino de las células MCF-7 transfectadas con las construcciones Rad50.4 y Rad50.6.

Para esto se sembraron 250.000 células MCF-7 transfectadas por pozo en placas de 6 pozos y se les administró el *cis*-platino a una concentración de 25.8 μ M y se analizó su efecto sobre la viabilidad celular cada 12 hrs durante 48 h. Como se puede observar en la figura.15, hubo una diferencia sobre la viabilidad celular de las células transfectadas con las dos construcciones esto en respuesta al tratamiento con *cis*-platino entre las distintas condiciones analizadas.

En el ensayo de sensibilidad se analizaron células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y Rad50.6 tratadas con *cis*-platino como control se utilizaron células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y Rad50.6 sin tratamiento y células sin transfectar tratadas y sin tratar con *cis*-platino.

Para células transfectadas con las construcciones Rad50.4 y Rad50.6 que fueron tratadas con *cis*-platino se observó que hubo una disminución en la viabilidad celular obteniéndose valores alrededor del 31-33 % de viabilidad desde las 12 h de tratamiento. Por el contrario las células control, (transfectadas y no transfectadas, tratadas con *cis*-platino y sin tratar) mostraban una viabilidad celular alrededor del 80-95 % a las 12 hrs. de tratamiento. Las células control las cuales no fueron tratadas con *cis*-platino ni transfectadas no mostraron disminución en su viabilidad sino que al contrario empezaron a crecer de tal forma que casi duplican su número a las 48 hrs. Las células control que fueron tratadas con *cis*-platino, muestran una disminución en la viabilidad celular llegando alrededor del 50% a las 24 hrs y a un 20% a partir de las 36 hrs. Las células transfectadas no tratadas bajaron su viabilidad hasta alrededor del 65-80% y se mantuvieron así durante las 48 hrs del análisis.

De lo anterior se puede concluir que las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 se sensibilizaron al tratamiento con *cis*-platino, ya que a las 12 h del análisis se observa una descenso

en la viabilidad de las células transfectadas, esto en comparación con las no transfectadas tratadas con *cis*-platino. También algo que cabe resaltar es el efecto que genera la transfección de las construcciones sobre las células, estas dejaron de mostrar crecimiento al menos durante las 48 hrs. que duro el análisis

Posteriormente se realizó el tratamiento de células MCF-7 transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 con la combinación *cis*-platino/doxorubicina, para esto se busco realizó una búsqueda para encontrar la DL50 utilizada para esta línea celular la cual fue 2-5, esta DL50 se comprobó de manera experimental la DL50 de doxorubicina para la línea celular MCF-7 obteniendo una DL50 de 2.5 μ M. Como se observa en la figura 16 este resultado se encuentra dentro del rango reportado por lo que se opto por utilizarla para el tratamiento de las células MCF-7. Se sembraron en placa de 6 pozos 350,000 células MCF-7 las cuales fueron transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6. También se cultivaron células sin transfectar, las cuales fueron tratadas solo con lipofectamina y se utilizó como control de transfeccion una de las construcciones para las cuales no se observó silenciamiento del gen *rad50*. Las células control las cuales no fueron transfectadas y solo fueron tratadas con lipofectamina mostraron un crecimiento normal duplicando su número a las 48 hrs que fue lo que duro el ensayo, para las células sin transfectar que fueron tratadas con la combinación *cis*-platino/doxorubicina se pudo observar una disminución drástica en la viabilidad celular llegando a un 15% a las 24 h de tratamiento llegando a 0% a las 48 h (figura 17) tratadas.

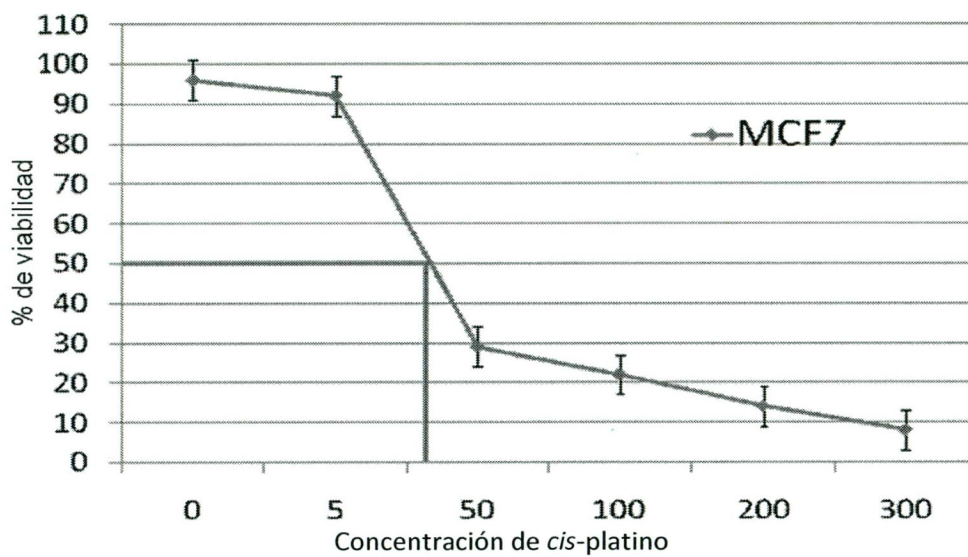


Figura 14. Determinación de la DL50 de *cis*-platino en células MCF-7. Se cultivaron 250,000 células por pozo, y se determinó la concentración a la cual el 50% de las células estaban muertas, calculando la DL50 entre 25.8 +/-1.3 µM. El ensayo se realizó por triplicado.

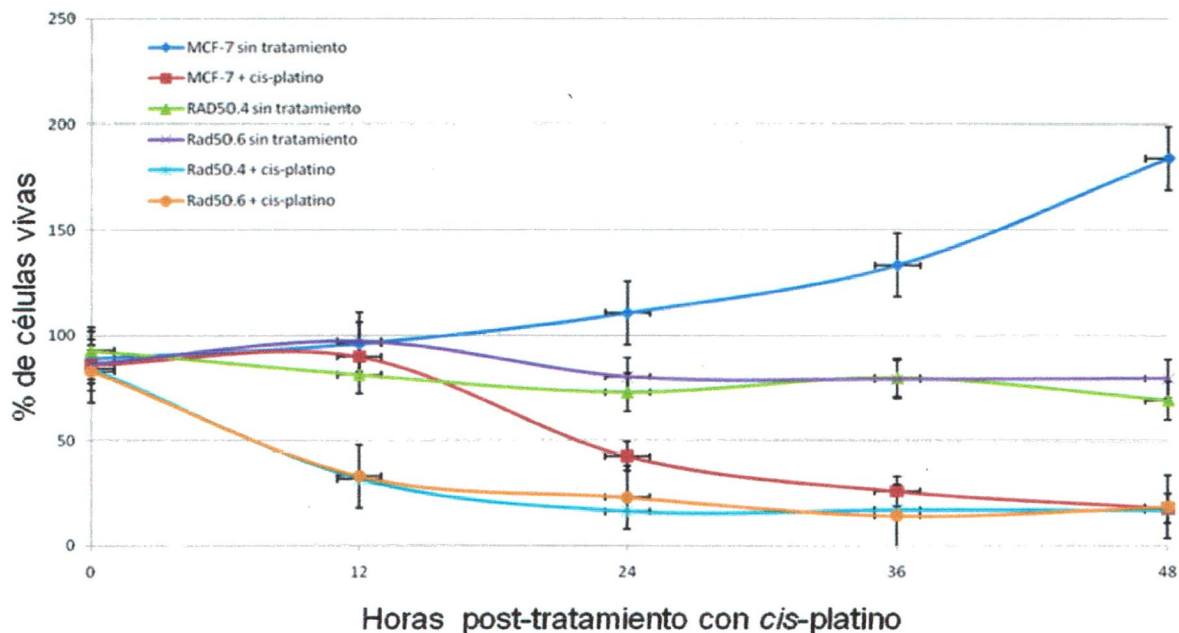


Figura 15. Ensayo dosis respuesta de las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino. En azul se marcan las células control las cuales no fueron transfectadas ni tratadas con *cis*-platino, en rojo células sin transfectar que fueron tratadas con *cis*-platino, en morado y verde células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 respectivamente pero sin tratar con *cis*-platino. En azul y naranja células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 respectivamente y tratadas con *cis*-platino (25.8 μ M)

este resultado contrasta con el obtenido al tratar células en las mismas condiciones pero tratadas solo con *cis*-platino para el cual al término del ensayo (48h) no se logró eliminar el 100% de las células tratadas.

Con el objetivo de observar el efecto del silenciamiento de *rad50* sobre la viabilidad celular. Se transfectaron células con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6, las células no fueron tratadas con la combinación de fármacos se puede observar en la figura 17 que estas células presentan un detenimiento de su crecimiento celular manteniéndose alrededor de un 60-80 % de viabilidad celular durante el ensayo. Para las células transfectadas que fueron tratadas con la combinación de quimioterapéuticos se puede observar que la viabilidad celular se reduce drásticamente a las 24 h de tratamiento a 28% para la construcción Rad50.4 y 20% para Rad50.6 y entre 3-4% de viabilidad a las 48 h de tratamiento (figura 17). Este resultado es menor al obtenido al tratar células únicamente con *cis*-platino donde a las 24 hrs de tratamiento se observó una viabilidad celular de entre 30-33% y entre 18-20% a las 48 h de tratamiento. Por último se transfectaron células con la construcción Rad50.1 para la cual no se observó silenciamiento del gen *rad50* y fueron tratadas con la combinación de fármacos durante 48 h. Para estas células se pudo observar un patrón muy similar al que se observó para las células control no transfectadas tratadas, por lo cual se considero como control de transfeccion.

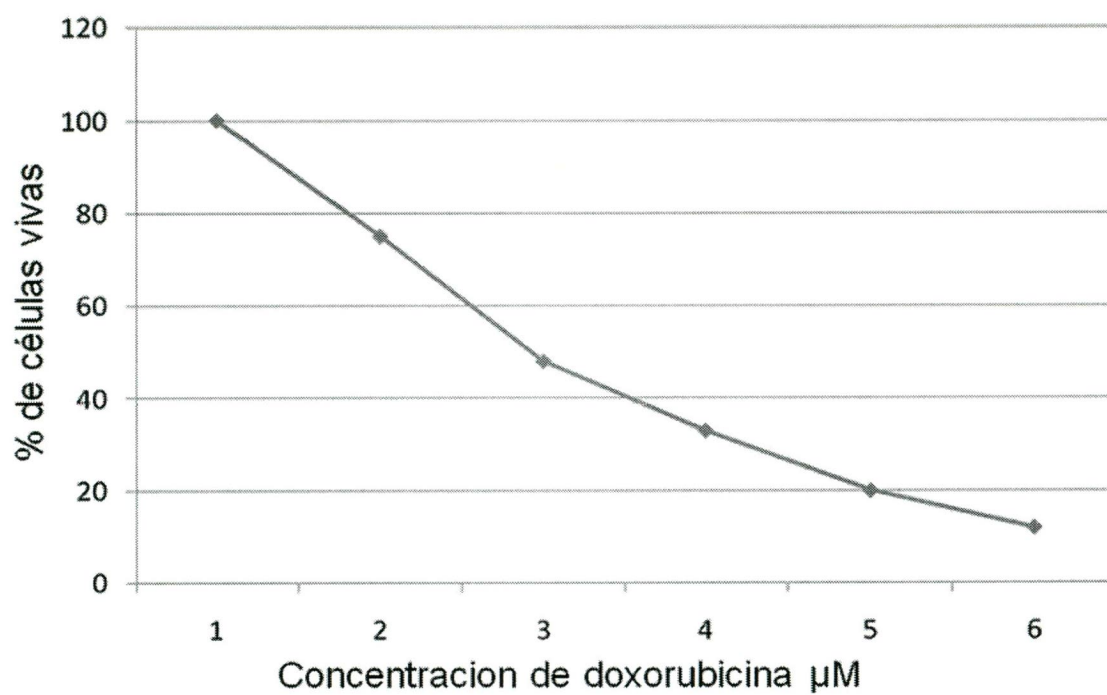


Figura 16. Determinación de la DL50 de doxorubicina en células MCF-7. Se cultivaron 250,000 células por pozo, y se determinó la concentración a la cual el 50% de las células estaban muertas, calculando la DL50 por regresión lineal a 2.5 μM .

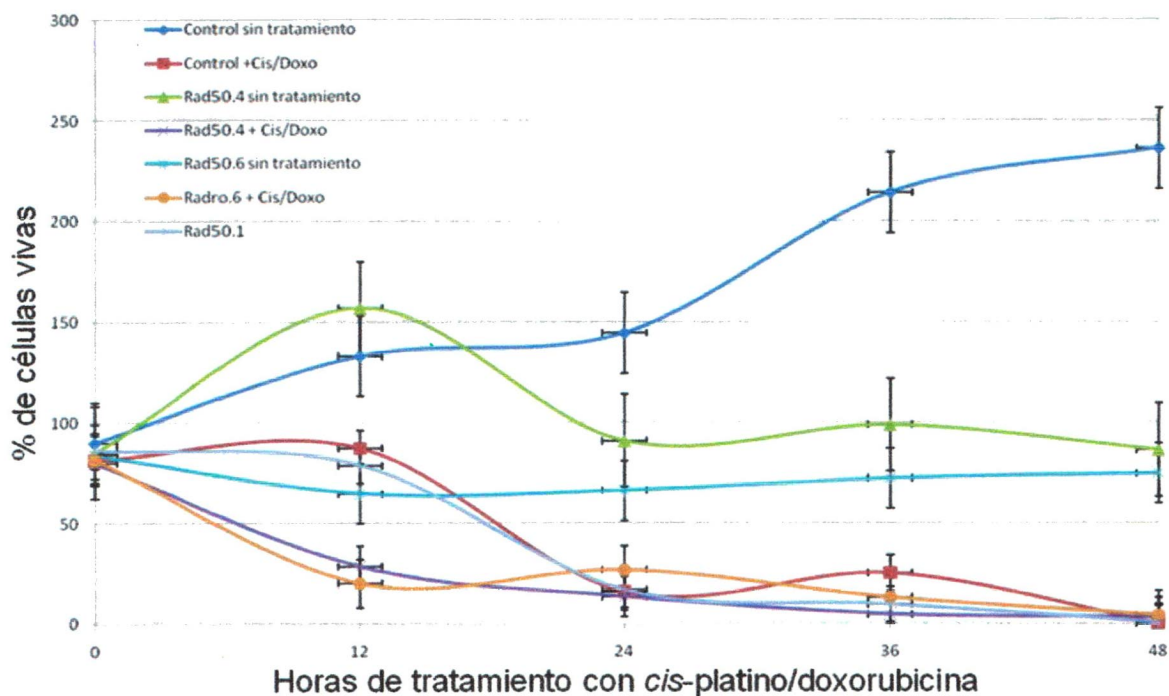


Figura 17. Ensayo dosis respuesta de las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 tratadas con la combinación *cis*-platino/doxorubicina. En azul se marcan las células control las cuales no fueron transfectadas ni tratadas, en rojo células sin transfectar que fueron tratadas con *cis*-platino/doxorubicina, en morado y verde células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 respectivamente pero sin tratar. En azul y naranja células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 respectivamente y tratadas con *cis*-platino/doxorubicina (25.8/2.5 μ M) en azul claro células transfectadas con el plasmido RAD50.1 tratadas con la combinación *cis*-platino/doxorubicina.

Por último se realizó un ensayo dosis respuesta utilizando a combinación *cis*-platino/taxol, para taxol se utilizo la dosis DL50 determinada por P Tassone y cols. para la línea celular MCF-7 la cual es .2 μ M de igual manera se sembraron 350,000 células por pozo en placas de 6 pozos. Se transfectaron las células con las construcciones pSilencer-Rad50.4, pSilencer-Rad50.6 y pSilencer-Rad50.1 como control de transfeccion, también se utilizaron células las cuales no fueron transfectadas con los fármacos, solo con lipofectamina. Las células control sin transfectar y que no fueron tratadas con los quimioterapéuticos mostraron un patrón de crecimiento normal muy similar al observado en los ensayos anteriores llegando a duplicar su número a las 48 hrs de tratamiento, las células control transfectadas con Rad50.1 y sin transfectar que fueron tratadas con la combinación *cis*-platino/taxol mostraron un comportamiento similar llegando después de 24 h de tratamiento a una de viabilidad 39% y 42 %, respectivamente. Las células que fueron transfectadas con las construcciones Rad50.4 y Rad50.6 que no fueron tratadas con la combinación de fármacos mostraron un comportamiento similar al observado en los ensayos anteriores bajo las mismas condiciones. La viabilidad celular de estas células se mantuvo entre 79-86% durante las 48 h del ensayo (figura 18). Para las células transfectadas con las construcciones Rad50.4 y Rad50.6 que fueron tratadas con la combinación *cis*-platino/taxol se observó que la viabilidad celular desciende de manera considerable (40-50%) a las 12 h de tratamiento, sin embargo este efecto sobre la viabilidad fue diferente al observado después del tratamiento con la combinación

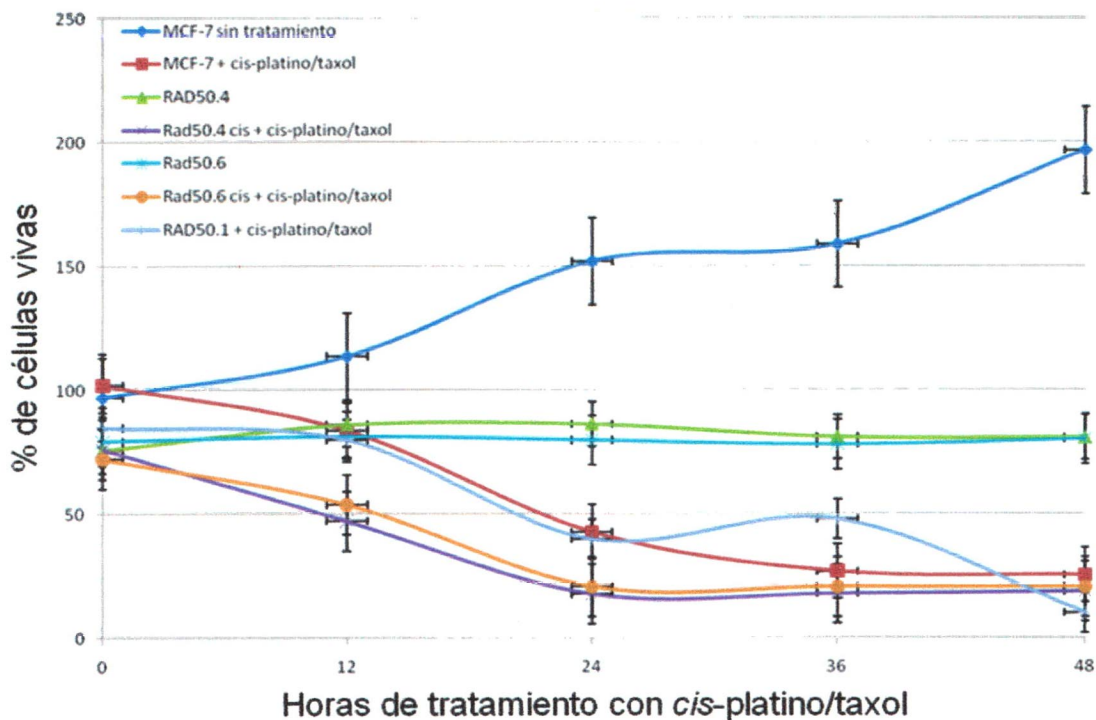


Figura 18. Ensayo dosis respuesta de las células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 tratadas con la combinación *cis*-platino/taxol. En azul se marcan las células control las cuales no fueron transfectadas ni tratadas, en rojo células sin transfectar que fueron tratadas con *cis*-platino/taxol. En morado y verde células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 respectivamente pero sin tratar. En azul y naranja células transfectadas con las construcciones pSilencer-Rad50.4 y pSilencer-Rad50.6 respectivamente y tratadas con *cis*-platino/taxol (25.8/.2 μ M) en azul claro células transfectadas con el plasmido RAD50.1 tratadas con la combinación *cis*-platino/taxol

cis-platino/doxorubicina para la cual a las 12 h de tratamiento se observó un descenso en la viabilidad celular alrededor del 20%. También se observó que la combinación *cis*-platino/taxol no llega a matar completamente a las células después de 48 h de tratamiento puesto que estas presentan entre un 10-18% de viabilidad al término del ensayo (figura18).

4. Análisis de la presencia de rompimientos de la doble cadena del DNA (DSB) en células silenciadas para el gen *rad50* posterior al tratamiento con quimioterapéuticos.

Una vez que se logró silenciar la expresión del gen *rad50* y con el objetivo de demostrar que la muerte celular observada tras el tratamiento con los quimioterapéuticos es debida al daño causado al DNA, se realizó un ensayo de determinación del estado fosforilado de la histona H2AX (γ H2AX) el cual es un marcador temprano de daño a DNA, en particular de DSB y daño genotóxico. Esta histona se fosforila en la serina 139, cerca de las regiones en donde se generó el daño al DNA lo cual va a activar una cascada de señalización encaminada a la activación de las rutas de reparación del daño al DNA. Para este fin se transfectaron células con la construcción pSilencer-Rad50.6 como se describió anteriormente y se dejaron recuperar las células durante 48 hrs. Se utilizaron como control células tratadas solo con lipofectamina (8 μ l). Estas células fueron tratadas durante 12 hrs con *cis*-platino a la DL50 25.8 μ M, se analizó el estado fosforilado de la histona H2AX a los 30 min, 3 h, y 12 h de tratamiento, mediante inmunofluorescencia e inmunodetección utilizando los anticuerpos anti-histona fosforilada acoplado a alexa 647 (cell signaling) y anti- γ H2AX (abcam), respectivamente.

En la figura 19 se muestra el ensayo de detección *in situ* de la γ H2AX mediante inmunofluorescencia. Se utilizó como control positivo las células MCF-7

sin transfectar tratadas con *cis*-platino a la DL50 25.8 μ M previamente determinada (figura 19A). Se puede observar que a los 30 min de tratamiento ya hay una fuerte señal de la histona fosforilada en el núcleo, lo cual indica que el *cis*-platino está generando daño y DSBs al DNA esto al comparar con las células transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 sin tratamiento (figura 19B) en la cual la señal de fosforilación de la histona es muy baja, lo cual representaría el daño generado de manera normal en la célula. Posteriormente las células transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 fueron tratadas con *cis*-platino a la DL50 durante 12 hrs. A los 30 min se puede observar que hay señal de la γ H2AX sin embargo es ligeramente menor a la observada en las células control las cuales no fueron transfectadas pero si tratadas con *cis*-platino. A las 3 h de tratamiento (figura 19D) se puede observar que también hay señal sin embargo la señal es moderada. Al analizar las células tratadas con *cis*-platino por 12 h (figura 19E) se logró observar un incremento importante en la señal de la γ H2AX esto comparado con los tiempos menores y las células control.

También se realizó la detección de la γ H2AX mediante Western blot, puesto que esta es un método semi-cuantitativo y se puede observar de mejor manera cambios en la presencia la γ H2AX, tanto en las células no tratadas como en las tratadas con *cis*-platino a diferentes tiempos. En la figura 20 se observa la detección de la γ H2AX mediante Western blot en extractos totales de células MCF-7 tratadas y no tratadas con *cis*-platino mediante Western blot. En cada carril se cargaron 50 μ g de extractos totales, en el carril 1 están los extractos totales de células MCF-7 sin transfectar tratadas con *cis*-platino a 25.8 μ M durante

30 min ,donde se puede observar a la γ H2AX en el peso esperado de 15 kD. En la figura 20 se puede apreciar que esta dio una señal fuerte, es decir que después del tratamiento con el *cis*-platino hay una gran cantidad de H2AX en su estado fosforilado, lo cual podría representa la cantidad de daño generado al DNA de estas células. En el carril 2, se cargaron extractos totales de células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 y no tratadas, y se puede observar que la señal correspondiente a la γ H2AX es muy baja, lo cual representaría el daño generado normalmente en la célula. En el carril 3 se analizaron extractos totales de células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 y tratadas con *cis*-platino a la DL50, durante 30 min. Se puede observar la señal de la γ H2AX sin embargo, aunque se analizó un tiempo de tratamiento igual al de las células control, el nivel de la señal es bajo. En el carril 4 se analizaron extractos totales de células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino a la DL50, durante 3 h. La señal detectada para la γ H2Ax es moderada y muy similar a la detectada para las células transfectadas y tratadas con *cis*-platino durante 30 min. En el carril 5 se analizaron extractos de células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino a la DL50, durante 12 h. En este caso la señal detectada para la γ H2AX es mucho mayor que la observada a los tiempos 30 min y 3 h . En este ensayo se puede observar claramente un aumento gradual en la detección de la señal de la γ H2AX para las células tratadas con

cis-platino a los tiempos 30 min, 3 h y 12 h. observando la mayor señal a las 12 h. de tratamiento, la cual es muy similar a la detectada para las células control a los 30 min de tratamiento con *cis*-platino. Esto podría indicar que en aquellas células para las cuales está silenciado el gen *rad50* hay un retardo en la señalización y fosforilación de la histona H2AX en respuesta al daño a DNA.

Por último para determinar si la muerte celular vista tras el tratamiento con los quimioterapéuticos era debido al daño generado por los mismos se realizó un ensayo de TUNEL con el objetivo de visualizar el daño a DNA generado después del tratamiento con *cis*-platino. Para esto se sembraron sobre laminillas 350,000 células por pozo en placas de 6 pozos, se transfectaron con la construcción pSilencer-Rad50.6 y se dejaron recuperar durante 48 h también se sembraron células, las cuales no fueron transfectadas y solo fueron tratadas con lipofectamina 2000 como células control. Las células transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 fueron tratadas con cisplatino a la DL50 y se analizaron por TUNEL a los 0 min, 30 min, 3 y 12 h de tratamiento, también se analizaron las células control (sin transfectar) después de 30 min de tratamiento con *cis*-platino. En la figura 21A se observan las células control las cuales no fueron transfectadas ni tratadas con *cis*-platino se puede observar la monocapa celular completa y no se observan células con daño a DNA o en estado de apoptosis (el daño generado a DNA en específico los DSBs va a ser visualizado mediante el marcaje en color café o marrón de los sitios donde se ha generado la

ruptura a DNA y se considera que se encuentran en estado de apoptosis) en la figura 21B se observan células silenciadas para *rad50* sin tratamiento con *cis*-platino y se puede ver que la monocapa celular se encuentra en completa se puede observar también algunas células teñidas de café lo cual indica que estas células recibieron daño a DNA o están en estado de apoptosis lo cual puede ser debido al proceso de transfeccion. En la figura 21C se visualizan células control tratadas durante 30 min con *cis*-platino se puede observar que el estado de la monocapa aun es integro sin embargo ya hay un mayor número de células que presentan daño a DNA aunque este solo representa aproximadamente entre un 15-20 % de total de células en la figura 21D se pueden observar células silenciadas para el gen *rad50* tratadas durante 30 min con *cis*-platino a la DL50 se puede observar un panorama muy similar al visto para las células control (figura 21C) en la figura 21E se observan células con el gen *rad50* silenciado tratadas durante 3 h con *cis*-platino en este caso el daño a DNA generado a las células es mayor puesto que aproximadamente entre un 30-40 % se encuentran teñidas de color café y se puede observar destrucción ligera de la monocapa, en las células transfectadas y tratadas con *cis*-platino durante 12 h se puede observar claramente el daño generado a la monocapa y que entre el 60-70 % de las células en la monocapa presentan daño a DNA.

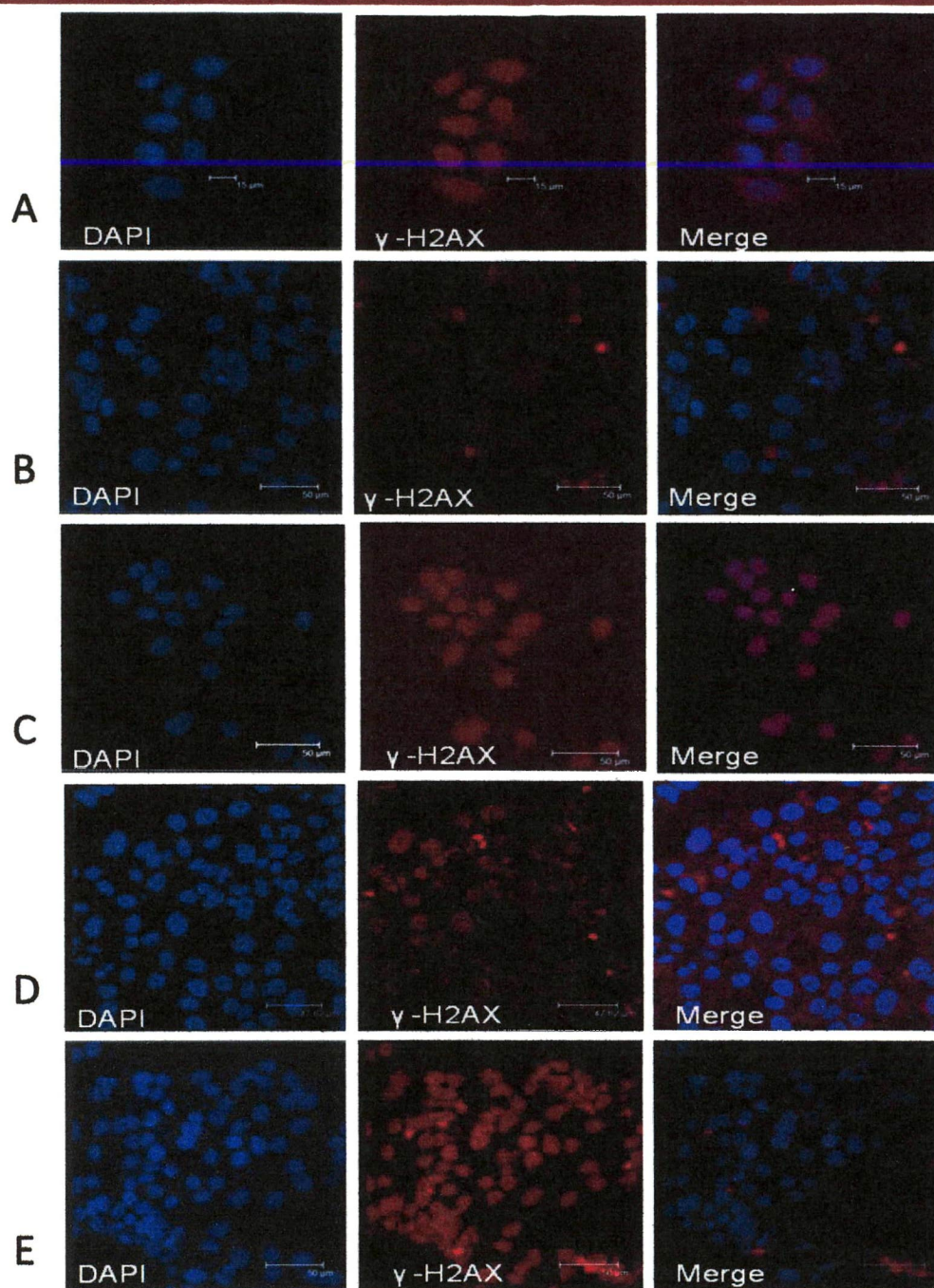


Figura 19. Detección *in situ* de la histona γ H2AX. (A) Células MCF-7 sin transfectar tratadas con *cis*-platino a una DL50 25.8 μ M durante 30 min, (B) Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 sin tratamiento, (C) Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino 25.8 μ M durante 30 min (D) Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino 25.8 μ M durante 3 h. (E) Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino 25.8 μ M durante 12 h.

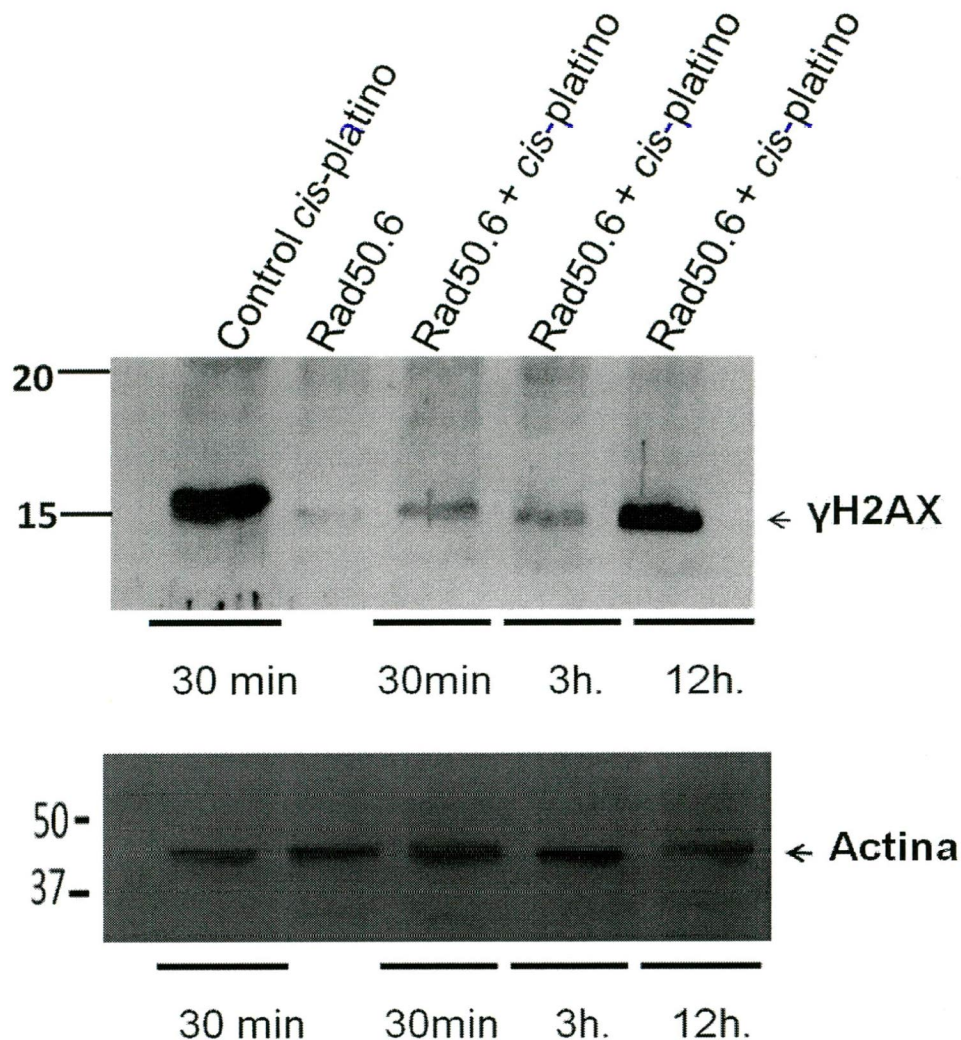


Figura 20. Detección de la γ H2AX mediante Western Blot. Carril 1 células MCF-7 no transfectadas tratadas con *cis*-platino durante 30 minutos, carril 2. Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 no tratadas. Carril 3 células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino 25.8 μ M durante 30 min. Carril 4 Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino 25.8 μ M durante 3 hrs. carril 5 Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 tratadas con *cis*-platino 25.8 μ M durante 12 h se corrieron 50 μ g de extractos totales en cada carril.

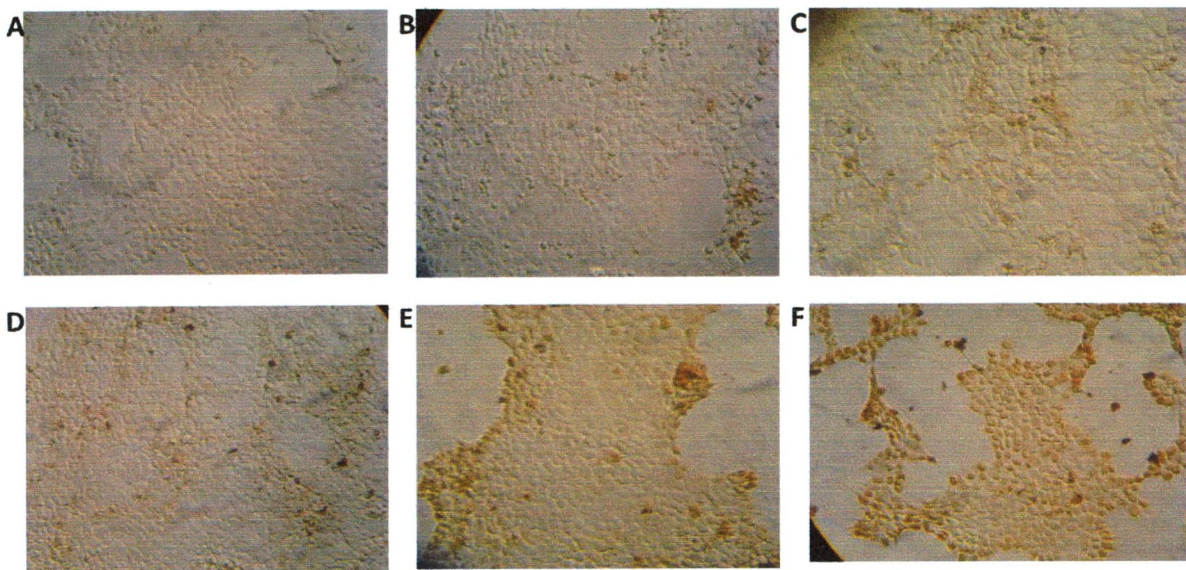


Figura 21. Análisis mediante ensayo de TUNEL de la presencia de rompimientos de la doble cadena del DNA (DSB) en células MCF-7 silenciadas para el gen *rad50* posterior al tratamiento con *cis*-platino. A) Células MCF-7 sin transfectar y sin tratar B) Células MCF-7 transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 sin tratar C) Células MCF-7 sin transfectar tratadas durante 30 min con *cis*-platino a la DL50 D) Células MCF-7 silenciadas para *rad50* tratadas durante 30 min. con *cis*-platino E) Células MCF-7 silenciadas para *rad50* tratadas durante 3 h con *cis*-platino F) Células MCF-7 silenciadas para *rad50* tratadas durante 12 h con *cis*-platino. El daño a DNA se ve representado por las células que se encuentran teñidas en color café o marron y se considera que se encuentran en estado de apoptosis.

VII. DISCUSION

Las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 conforman el complejo MNR, el cual está involucrado en mecanismos de reparación del ADN por recombinación homóloga, mantenimiento telomérico y activación de rutas de señalización para reparación de DNA. (16,17,18,19,35,36) Nuestro grupo de investigación previamente comparó la expresión de MRE11 y RAD50 en biopsias de tumores de mama provenientes de mujeres mexicanas y biopsias de tejido normal mediante inmunohistoquímica, y observó que existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de estas dos proteínas. En particular para Rad50 se observó que el 43% de los tejidos tumorales presentaban una expresión fuerte, el 29% una expresión moderada y solo un 4% no expresaban la proteína, a diferencia del tejido normal donde el 57% de las biopsias presentaban una expresión fuerte, el 21% moderada y el 21% restante una expresión débil (Tesis de Maestría de Echarte Lourdes, UACM 2009). Estos resultados muestran que la expresión de RAD50 en los diferentes tumores de mama analizados es muy heterogénea, sin embargo, se observa que en la mayoría existe una expresión fuerte de Rad50. Cuando Echarte analiza los niveles expresión de Rad50 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama mediante Western blot, observa que en las líneas MDA-MB-231 y MCF7 la expresión es muy similar, sin embargo, en la línea ZR-75-1 no detecta la expresión de la proteína.

En este trabajo determinamos los niveles de expresión de RAD50 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama y analizamos el efecto del silenciamiento de Rad50 en respuesta al tratamiento quimioterapéutico basado en *cis-platino*.

Cuando nosotros repetimos los experimentos de Echarte y analizamos los niveles de expresión de RAD50 en las 3 líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1) observamos que a diferencia de lo reportado la línea ZR-75-1 si expresaba la proteína RAD50 en niveles muy similares a los expresados por las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 este resultado pudo ser debido a que probablemente en la línea celular que se analizo en el trabajo de Echarte pudieran haberse generado mutaciones que generaran un silente natural y que la cepa con la que nosotros trabajamos no presenta esta mutacion puesto que pertenecen a un lote de células distintas a las trabajadas por Echarte.

Los niveles de expresión de RAD50 en las células pueden tener un papel dual en el desarrollo del cáncer y su progresión. Se ha observado que cuando existen mutaciones en el gen *rad50* se genera una baja en la expresión de la proteína, el cuál puede desencadenar la aparición de síndromes y enfermedades relacionadas con fragilidad cromosómica, como es el caso del síndrome de Nijmegen breakage (38,39,40). Waltes R. y cols. observaron que pacientes que presentaban este síndrome tenían una expresión baja de la proteína RAD50. Así mismo evaluaron el efecto de mutaciones sobre el gen *rad50* en diferentes líneas

celulares de linfoblastoma y observaron que cuando las irradiaban con rayos X existía una respuesta deficiente de los mecanismos de reparación del daño al DNA, lo que podría resultar en una serie de mutaciones, translocaciones y deleciones, como las que se presentan en el síndrome Nijmegen breakage, lo cual podría derivar en una mayor riesgo a desarrollar cáncer. Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión de proteínas que están involucradas en rutas de reparación, como por ejemplo RAD50 y PARP (42,43,44,45) puede resultar en el desarrollo de resistencia a quimioterapéuticos. Estas observaciones dan pie a pensar que al silenciar los genes de proteínas relacionadas con reparación a DNA se podría lograr una sensibilización de células tumorales al tratamiento con quimioterapéuticos que generan daño a DNA.

Para comprobar esta hipótesis, nosotros silenciamos la expresión de *rad50* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi). Para ello de manera inicial se utilizaron dos secuencias interferentes específicas para RAD50 (denominadas RAD50.1 y RAD50.2), las cuales fueron diseñadas y empleadas por Hui Zhong y cols (2005) y Weihang Chai y cols (2006), respectivamente. Weihang Chai analizó el papel que juega RAD50 en el mantenimiento de los telómeros y de la integridad cromosómica una línea celular de cáncer de cérvix encontrando que al silenciar la expresión de *rad50* había un recortamiento en la longitud de los telómeros para la línea celular HeLa. Por otro lado, Hui Zhong y cols. analizaron la respuesta al daño al DNA vía

cascadas de fosforilación que involucran a ATR en una línea celular de cabeza HCT116 que tenía silenciada *rad50*. Estos autores encontraron que al silenciar *rad50* había las rutas de señalización de reparación del DNA que involucran a ATM se veían retardadas, así mismo se generaba una hipersensibilidad de esta línea celular al tratamiento con radiación UV. Por lo cual se decidió utilizar las secuencias blanco que estos autores utilizaron para silenciar a *rad50* en líneas celulares de cáncer de mama. En estos trabajos se logró silenciar la expresión de *rad50* Hui Zhong en un 90% y Weihang Chai en un 80%. Sin embargo al realizar los primeros ensayos de transfección y silenciamiento de *rad50* en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 nosotros no logramos silenciar el gen *rad50* probablemente esto se debió a que los métodos de transfección utilizados entre Hui Zhong, Weihang Chai y nosotros fueron distintos ellos utilizaron vectores virales mientras nosotros utilizamos un vector plasmídico y lipofección, aunque no hay evidencia reportada que apoye esta idea.

Otra hipótesis que se planteó es que probablemente hay diferencias en cuanto al silenciamiento de un gen entre diferentes líneas celulares, otra molécula conocida que es capaz de regular la expresión génica de manera negativa son los miRNA y se sabe que la expresión de estos miRNAs es tejido específico, por lo que probablemente estén sometidos a algún tipo de regulación el cual podría ser compartido por nuestros shRNAs, por ejemplo la presencia de secuencias endógenas específicas del tejido mamario que tengan cierta complementariedad

con las secuencias Rad50.1 y Rad50.2 generando un efecto de secuestro e inactivación de las secuencias estas secuencias interferentes sin embargo esto es solo una hipótesis de la cual no hay evidencia reportada y por último se pensó que las condiciones de transfección no eran adecuadas , por lo que se realizó el diseño de otras 4 secuencias interferentes y se optimizaron las condiciones de transfección.

Una vez encontradas las condiciones de transfección óptimas se intento silenciar nuevamente a *rad50*, en esta ocasión se obtuvieron resultados favorables y aunque las secuencias Rad50.1 y Rad50.2 silenciaban en algún grado a RAD50 este era muy bajo, no como el reportado por Hui Zhong y Weihang Chai. Por lo que se optó por la utilización de las secuencias interferentes Rad50.4 y Rad50.6 las cuales mostraron un mayor silenciamiento para el gen *rad50*

Lo que nosotros encontramos fue que al silenciar la expresión de *rad50* en la línea celular MCF-7, podíamos sensibilizarlas al tratamiento basado en *cis*-platino. El siguiente paso fue determinar si las células MCF-7, a las cuales les silenciamos la expresión de *rad50* eran o no más sensibles al tratamiento quimioterapéutico basado en *cis*-platino, por lo cual se determinó la DL50 de *cis*-platino para esta línea celular obteniendo un DL50 de 25.8 μ M. Esta DL50 es muy similar a la reportada por J Leon y cols (2006) los cuales realizaron el perfil de citotoxicidad a diferentes quimioterapéuticos en diferentes líneas de cáncer obteniendo una DL50 a *cis*-platino de 16-4 \pm 2.8 para la línea celular MCF-7. Sin

embargo también P. Tassone y cols. determinaron la DL50 para la línea celular MCF-7 en el 2003 obteniendo un rango entre, 60-70 μM la cual es mas elevada a la encontrada por nosotros y por J. Leon por lo que se decidió tomar para todos los experimentos de sensibilidad las DL50 determinadas experimentalmente para nuestras células MCF-7. Lo que nosotros encontramos fue que al silenciar la expresión de *rad50* en la línea celular MCF-7 ,podíamos sensibilizarlas al tratamiento basado en *cis*-platino. Previamente Waleed M. y cols generaron una mutante negativa para RAD50 en células de cáncer de cabeza y cuello ellos tenían como objetivo determinar si la disminución en la expresión de RAD50 podría producir un efecto de silenciamiento en sus líneas celulares al tratamiento con *cis*-platino. Lo que ellos lograron fue una sensibilización al tratamiento con cisplatino de su células transfectadas con un vector viral nuevo que contenía la secuencia codificante para la mutante dominante negativa. Sin embargo no existen reportes que analicen este efecto para células tumorales de cáncer de mama. Nosotros encontramos como ya se menciona un efecto muy similar al reportado por Walled y cols. al tratar con *cis*-platino a la línea celular MCF-7 para la cual se silencio la expresión de *rad50* lo que observamos fue que a las células silenciadas para *rad50*. al ser tratadas con *cis*-platino presentaban niveles de muerte celular muy elevado puesto que aproximadamente del 70% a las 12 h de tratamiento. Las células utilizadas como control las cuales no fueron silenciadas para *rad50*, al ser tratadas con *cis*-platino durante un mismo lapso de tiempo presentaban una muerte celular de aproximadamente 20% esto representa un

efecto importante de sensibilización de la línea celular MCF-7 silenciada para *rad50* al *cis*-platino, efecto muy similar observado para las líneas celulares JHU012 y JHU029 por Waleed y cols aunque ellos lo observaron a tiempos más largos.

Otro efecto interesante observado en las células silenciadas por RAD50 fue que su proliferación celular se detuvo, al menos durante las 48 hrs que duró el estudio, a diferencia de lo reportado por Waleed y cols donde ellos observaron proliferación celular baja pero constante.

Al realizar los tratamientos combinados se observaron comportamientos muy similares a los descritos anteriormente, al tratar las células silenciadas para *rad50* con la combinación *cis*-platino/doxorubicina se puede observar a las 12 horas de tratamiento que hay altos niveles de muerte celular puesto que al analizar la viabilidad celular, esta solo es del 20% lo cual es menor a los valores obtenidos de los tratamientos con únicamente *cis*-platino los cuales eran alrededor del 30% de viabilidad celular. Otro efecto interesante observado al tratar a las células silenciadas para *rad50* con esta combinación fue que a tiempos más largos (36 y 48 h) la viabilidad celular disminuye drásticamente llegando a valores de entre 0-3%, efecto no observado en el tratamiento con *cis*-platino, por lo que se puede inferir que la combinación de estos dos quimioterapéuticos más el silenciamiento de *rad50* logran un efecto sinérgico incrementando el efecto terapéutico de estos fármacos.

Un efecto interesante fue el que se observó al tratar a las células silenciadas para *rad50* con la combinación *cis*-platino/taxol, puesto que al analizar la viabilidad celular de células transfectadas con las construcciones Rad50.4 y Rad50.6 en efecto a 12, 24 y 36 h es muy similar al observado al tratar células en las mismas condiciones únicamente con *cis*-platino, este efecto resulto desconcertante puesto que al combinar *cis*-platino con doxorubicina se logro un efecto sinérgico se esperaba que sucediera un efecto muy similar al tratar células silenciadas para *rad50* con la combinación *cis*-platino/taxol sin embargo el efecto fue muy similar al busto con la monoterapia con *cis*-platino. Una posible respuesta del porque esta diferencia entre el efecto de las dos combinaciones es el daño que es capaz de generar cada fármaco y el momento en el cual es más activo es decir mientras la doxorubicina es capaz actuar en cualquier momento del ciclo celular al generar de manera indirecta SSBs, DSBs y de generar muerte celular por inducción de liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) el taxol es más activo en células que se están en proceso de división celular, puesto que actúa uniéndose a los microtubulos impidiendo su despolimerización, generando muerte celular por apoptosis, y un efecto observado en los tres tratamientos realizados, es que al silenciar a *rad50* las células no son capaces de seguirse replicándose puesto que no incrementan su número durante las 48 h que duran los ensayos de sensibilización a quimioterapéuticos es decir, si las células no se dividen el efecto del taxol se va a ver menguado y no va a generar la muerte celular esperada.

Una vez que se silenció RAD50 en las células MCF-7 se procedió a determinar si la muerte celular observada era una consecuencia del daño generado por el cis-platino. Una manera indirecta de detectar el daño al DNA, particularmente de rupturas de doble cadena es determinar la presencia de la histona H2AX en su estado fosforilado (γ H2AX). Se analizó y comparó la presencia de la histona γ H2AX mediante WB e IF en células transfectadas con la construcción pSilencer-Rad50.6 y células sin transfectar como control, ambas tratadas con cis-platino a la misma dosis. En las células sin transfectar se pudo observar en el western blot una clara señal correspondiente a la γ H2AX en el peso esperado (15kD), a los 30 min de tratamiento con cis-platino. Esto es muy similar a lo reportado por Dmitrieva I. y cols (2008) donde detectan un mayor número de DSBs entre los 15 y 90 minutos además de la detección de la γ H2AX desde los 30 min y mayor señal entre los 60 y 90 después de un tratamiento con altas concentraciones de NaCl en células HeLa. Sin embargo para las células MCF-7 silenciadas para RAD50 esta señal se observó con una intensidad muy similar a las células control hasta las 12 h. Esto se puede explicar por el efecto observado por Kobayashi J. y cols. los cuales observaron que NBS1 que forma parte del complejo MRN es importante para desencadenar la cascada de señalización que involucra a ATM y a la histona H2AX. El complejo MRN es capaz de sensor el daño al DNA, promover la autofosforilación de ATM y esta a su vez promueve la fosforilación de la histona H2AX. Al silenciar a rad50 el complejo MRN se desestabiliza por lo cual no es capaz de realizar sus funciones con eficacia esto

los reportos Walled y cols (2009), por lo tanto al nosotros al silenciar a RAD50 desestabilizamos el complejo MRN retardando la cascada de señalización que involucra la fosforilación de la histona H2AX lo cual explica el efecto visto en este ensayo. Otro ensayo para detección in situ de daño a DNA es el ensayo de TUNEL el cual es ampliamente utilizado para determinar y analizar daño o fragmentación del DNA en una gran variedad de tipos celulares, además de ser capaz de discriminar entre muerte celular por apoptosis o necrosis (54,55,56) , para este ensayo nosotros transfectamos células MCF-7 con la construcción pSilencer-Rad50.6, estas células fueron tratadas con *cis*-platino a la DL50 y de análisis por TUNEL a diferentes tiempos de tratamiento (0, 30 min, 3, 12 h) con el objetivo de determinar si la muerte celular observada en los ensayos de quimiosensibilidad con quimioterapéuticos era debido a la generación de DSBs por efecto del tratamiento con *cis*-platino o era debido a otra causa. Como se puede ver en la figura 21 desde los 30 minutos de tratamiento ya hay generación de daño a DNA y este daño según lo observado en los ensayos de detección de la γ H2AX es suficiente para promover la fosforilación de la histona H2AX la cual detectamos mediante inmunodetección e inmunofluorescencia obteniendo una señal fuerte de fosforilación, sin embargo en las células silenciadas para *rad50* la cantidad de daño generado al DNA por el *cis*-platino a los 30 min de tratamiento no es suficiente para generar la misma respuesta (fosforilación de la histona H2AX) observada en la figura 21 para las células control bajo las mismas condiciones. Otro dato importante que correlaciona con los resultados obtenidos de los

tratamientos con quimioterapéuticos a células silenciadas para *rad50* es que de manera general hay un fuerte descenso en la viabilidad celular de estas tras 12 horas de tratamiento. Al analizar mediante TUNEL el nivel de daño generado a células MCF-7 silenciadas para *rad50* y tratadas con cis-platino durante 12 horas se pudo observar que la mayoría de las células se encontraban en estado de apoptosis (figura 21) por lo que la muerte celular observada en los ensayos de quimiosensibilidad es debida al daño generado (DSBs) por el *cis*-platino.

VIII. CONCLUSIONES

El objetivo general del presente trabajo fue analizar el efecto del silenciamiento del gen *rad50* en líneas celulares de cáncer de mama en respuesta al tratamiento con las combinaciones *cis*-platino/paclitaxel y *cis*-platino-doxorubicina para ello lo primero que se realizó fue el diseño de un set de secuencias interferentes mediante las cuales se llevaría a cabo el silenciamiento del gen *rad50* . se eligieron 6 secuencias 2 de ellas ya habían sido utilizadas previamente para el silenciamiento de *rad50* (Rad50.1 y Rad50.2) y las otras 4 fueron diseñadas en nuestro laboratorio (Ra50.3,Ra50.4,Rad50.5,Rad50.6) las cuales fueron clonadas dentro del vector plásmidico pSilencer 5.1 U6 Retro (Ambion), todas estas secuencias tenían como blanco distintas regiones del mRNA del gen *rad50* humano, sin embargo al realizar nuestros ensayos de transfeccion solo 2 de ellas (Ra50.4 y Rad50.6) resultaron ser eficaces para el silenciamiento del gen *rad50*. La línea celular MDA-MB-231 no pudo ser analizada puesto que el mismo proceso de transfección generaba una gran muerte celular. Una vez que se logro silenciar *rad50* en la línea celular MCF-7 se realizaron ensayos de quimiosensibilidad. De estos ensayos se pudo concluir que al silenciar al gen *rad50* en la línea celular MCF-7 esta es más sensible al tratamiento con quimioterapéuticos basada en *cis*-platino logrando un mayor efecto a las 12 h de tratamiento obteniendo una viabilidad celular alrededor del 30

% para la monoterapia de *cis*-platino, 20% para la terapia combinada *cis*-platino/doxorubicina y 25-30% para la combinación *cis*-platino/taxol.

El efecto de los quimioterapéuticos sobre las células silenciadas para *rad50* indicaba que estas eran más sensibles a los quimioterapéuticos utilizados sin embargo había que verificar que la muerte celular observada en los tratamientos con quimioterapéuticos era debida al daño generado por los mismo es decir daño directo a DNA (DSBs) para lo cual se realizaron 2 ensayos, la detección *in situ* del estado fosforilado de la histona H2AX (γ H2AX) mediante inmunodetección e inmunofluorescencia y ensayo de TUNEL. Ambos ensayos están enfocados a analizar el daño generado a DNA *in situ* y son específicos para detectar DSBs. Mediante el ensayo de detección del la γ H2AX se pudo determinar que había daño generado a DNA desde los primero 30 minutos de tratamiento , sin embargo hubo diferencias en cuanto a la señal detectada de la γ H2AX puesto que para las células control que no estaban silenciadas para *rad50* después de 30 min de tratamiento con *cis*-platino la señal era fuerte y para las células silenciadas para *rad50* esta señal era baja a los 30 min e iba incrementando hasta igualar la señal detectada en las células control pero después de 12 h de tratamiento. De estos ensayos se pudo concluir que al silenciar *rad50* el complejo MRN se desestabiliza, como ya se menciona este complejo cumple dos funciones en la reparación del daño a DNA, efector y sensor, como sensor va a detectar el daño generado a DNA y promover mediante la interacción de la proteína NBS1 la autofosforilacion de ATM, la cual a su vez promueve la fosforilacion de la histona H2AX, por lo que al silenciar *rad50* esta cascada de señalización se ve afectada. Por lo que la

detección de la γ H2AX además de servirnos como un marcador temprano de daño a DNA, nos sirvió como sensor indirecto del estado del complejo MRN en las células silenciadas para *rad50*.

Por último del ensayo de TUNEL se puede concluir que la muerte celular observada a las 12 horas de tratamiento con quimioterapéuticos es debida a la generación de DSBs, esto al observar que a las 12 horas de tratamiento aproximadamente el 70% de las células se encontraban en estado de apoptosis lo cual correlaciona con lo observado en los ensayo de quimiosensibilidad.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.breastcancer.org/>
2. Cotran RS, Robbins SL, y Kumar V, Patología Estructural y Funcional, Mc-Graw Hill, 6ª ed., 1999.
3. CancerStats: Worldwide cancer. London: Cancer Research UK. April 2005. World Health Organization. Fact sheet No. 297. Cancer. WHO, Geneva: February 2006.
4. Lozano, Knaul, Gómez Dantés, Arreola-Ornelas y Méndez. "*Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006*". Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud, 2008.
6. Knaul Felicia M, Nigenda Gustavo , Lozano Rafael, Arreola-Ornela Héctor, Langer Ana, Frenk Julio." *Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante*" salud pública de méxico/ vol. 51, suplemento 2 de 2009
7. Marion Kiechle, Alfons Meindl. "*Predisposition for Breast Cancer*". Jeffrey S. Ross, Gabriel N. Hortobagyi (ed). Molecular Oncology of Breast Cancer. Sudbury, Massachusetts 2004, pp 48-59.

8. Henry T. Lynch, Jane Lynch, Theresa Conway, Patrice Watson, Jean Feunteun, Gilbert Lenoir, Steven Narod, Robert Fitzgibbons. "*Hereditary breast cancer and family cancer syndromes*". 1994, 18(1): 21 – 31.
9. Deng, C. X., and Brodie, S. G. "*Roles of BRCA1 and its interacting proteins*". Bioessays . 2000. 22: 728-737.
10. Steven A. Narod. "*Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer*" Nature Reviews Cancer 2002. 2: 113-123.
11. Teni Boulikas. "*Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug*" Cancer Therapy Vol 5, 351-376, 2007
12. Zahid H Siddik, "*Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*" oncogene 2003 22:7265-7279
13. Zhiyong Mao,³ Ying Jiang,³ Xiang Liu, Andrei Seluanov and Vera Gorbunova "*DNA Repair by Homologous Recombination, But Not by Nonhomologous End Joining, Is Elevated in Breast Cancer Cells*" Neoplasia Vol. 11, No. 7, 2009

14. Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J et al. "ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway". *Nature* 2000; 404: 613–617.
15. Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC et al. "Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products". *Nature* 2000; 405: 473–477.
16. Weihang Chai, Agnel J Sfeir, Hirotoshi Hoshiyama et. al. "The involvement of the Mre11/ Rad50 /Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres". *EMBO reports* 2006; 7 (2): 225–230.
17. Alan Yueh-Luen Lee, Embo Liu, and Xiaohua "The MRE11/Rad50/Nbs1 Complex Plays an important Role in The Prevention of DNA Rereplication in Mammalian Cell" *Journal of biological Chemistry* 2007 282: 32243-32254
18. Usui,T., Petrini,J.H. and Morales,M. "Rad50S alleles of the Mre11 complex: questions answered and questions raised". *Exp. Cell. Res.* 2006; 312: 2694–2699

19. Annapaola Franchitto, Pietro Pichierri. "*Werner Syndrome Protein and the MRE11 Complex are Involved in a Common Pathway of Replication Fork Recovery*". *Cell Cycle* 2004; 3 (10): e78-e86.
20. Moufarij MA, Phillips DR, Cullinane C. "*Gemcitabine potentiates cisplatin cytotoxicity and inhibits repair of cisplatin- DNA damage in ovarian cancer cell lines*". *Mol Pharmacol* 2003;63:862-9.
21. Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. "*Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines*". *Cancer Res* 2003;63:1311-6
22. Hui Zhong, Alyson Bryson, Mark Eckersdorff and David O. Ferguson "*Rad50 depletion impacts upon ATR-dependent DNA damage responses*" *Human Molecular Genetics* 2005 14(18):2685-2693
23. Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C. & Engelward, B. P. "*DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment*". *DNA Repair* 2007; 6: 923-935.

24. Hao Mimi Tran, Md, Guoli S. "Mutant Nbs1 enhances cisplatin-induced DNA damage and cytotoxicity in head and neck cancer". *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:477-84.

25. Brummelkamp RT, Bernards R, Agami R. "A system of stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells". *Science*. 2002;296:550–553

26. Marlis Frankenberg-Schwager, Dorothea Kirchermeier, Goetz Greif. "Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Toxicology* 2005; 212: 175–184.

27. Sledge G, Loehrer Pj, Raoth Bj, Einhorn LE. "Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer". *Clin Oncol* 1988 ; 6 1811-1814

28. Kolaric, K. & Roth, A. (1983). Phase II clinical trial of cis-dichlorodiammine platinum (cis-DDP) for antitumorigenic activity in previously untreated patients with metastatic breast cancer.

Cancer Chemother. Pharmacol., 11, 108-112.

29. Martin M, Diaz-Rubio E, Casado A. Et al Carboplatin: an active drug un metastatic breast cáncer. JClin Oncol 1992;10:433-437
30. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Ando M, Kohno T, et al. expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2006; 99: 9-17.
31. Rubin P. Oncología Clínica. 8va ed. Madrid: 2003.
32. N Zaffaroni, R Silvestrini, L Orlandi, A Bearzatto, D Gornati and R Villa. Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and-resistant human ovarian cancer cell. British Journal of Cancer (1998) 77(9), 1378-138.
33. Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, HamiltonTC. "Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines". Cancer Res 2003; 63: 1311-6.

34. Michael van den Bosch, Ronan T. Bree & Noel F. Lowndes
The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes EMBO reports VOL 4 : NO 9 ; 2003
35. Thomas Helleday, Eva Petermann, Cecilia Lundin, Ben Hodgson and Ricky A.Sharma. "*DNA repair pathways as targets for cancer therapy*"
Nature Reviews Cancer.2008; 8: 193-204.
36. Alan R. Lehmann, Atsuko Niimi, Tomoo Ogi, Stephanie Brown, Simone Sabbioneda,Jonathan F. Wing, Patricia L. Kannouche and Catherine M. Green. "*Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch*".DNA Repair 2007; 6 (7):891-899.
37. Echarte Raffaelli Lourdes. "Evaluación de los niveles de expresión de mre11 y rad50 en biopsias de cáncer de mama y de la participación del gen mre11 en la respuesta al Tratamiento Con Cisplatino" Tesis de Maestría. Universidad, Autónoma de la Ciudad de México Posgrado en Ciencias Genómicas Agosto 2009
38. McKinnon, P.J., and Caldecott, K. "DNA Strand BreakRepair and Human Genetic Disease". Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 8, 37–55. 2007.

39. Van der Burgt, I., Chrzanowska, K.H., Smeets, D., and Weemaes, C. "Nijmegen breakage syndrome." *J. Med. Genet.* 33, 153–156. 1996.
40. Digweed, M., and Sperling, K. "Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks." *DNA Repair (Amst.)* 3, 1207–1214. 2004.
41. Regina Waltes, Reinhard Kalb, Magtouf Gatei, Amanda W. Kijas, Markus Stumm, Alexandra Sobock, Britta Wieland, Raymonda Varon, Yaniv Lerenthal, Martin F. Lavin, Detlev Schindler, and Thilo Dörk "Human RAD50 Deficiency in a Nijmegen Breakage Syndrome-like Disorder" *The American Journal of Human Genetics* 84, 605–616, May 15, 2009
42. Camille Godon, Fabrice P. Cordelie, Denis Biard, Nicole Giocanti, Frederique Megnin-Chanet, Janet Hall and Vincent Favaudon "PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility" *Nucleic Acids Research*, , Vol. 36, No. 13 2008

43. Zhiyong Mao, Ying Jiang, Xiang Liu, Andrei Seluanov* and Vera Gorbunova. "DNA Repair by Homologous Recombination, But Not by Nonhomologous End Joining, Is Elevated in Breast Cancer Cells" *Neoplasia* Vol. 11, No. 7, 2009.

44. Rocío Aguilar-Quesada, José Antonio Muñoz-Gámez, David Martín-Oliva, Andreína Peralta, Ma Teresa Valenzuela, Rubén Matínez-Romero, Rosa Quiles-Pérez, Josiane Menissier-de Murcia, Gilbert de Murcia, Mariano Ruiz de Almodóvar and F Javier Oliver "Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition" *BMC Molecular Biology* 2007, 8:29

45. Arnaudeau, C., Tenorio Miranda, E., Jenssen, D. & Helleday, T. "*Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells*". *Mutat. Res. DNA Repair* 2000; 461: 221–228.

46. J. León, S. M. Gómez, S. J. Morantes, C. P. Cordero, F. Ancízar "Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*" *Biomédica* vol.26 no.1 Bogotá Mar. 2006.

47. P Tassone*, P Tagliaferri, A Perricelli, S Blotta, B Quaresima, ML Martelli, A Goel, V Barbieri ,F Costanzo, CR Boland and S Venuta. "BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells" *British Journal of Cancer* (2003) 88, 1285 – 1291
48. N.yu. Lukyanova, N.V. Rusetskya, N.A. Tregubova, V.F. Chekhun "Molecular profile and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and doxorubicin" *Experimental Oncology* 31, 87–91, (2009)
49. M.C. Barros Filho, M.L.H. Katayama, H. Brentani, A.P.S. Abreu, E.M. Barbosa, C.T. Oliveira, J.C.S. Góes, M.M. Brentani and M.A.A.K. Folgueira "Gene trio signatures as molecular markers to predict response to doxorubicin cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients" *Braz J Med Biol Res*, December (2010), Volume 43(12) 1225-123
50. Natalia I. Dmitrieva and Maurice B. Burg "Analysis of DNA breaks, DNA damage response, and apoptosis produced by high NaCl" *AJP-Renal Physiol* Vol 295 (2008)
51. Junya Kobayashi A., Hiroshi Tauchi B., Benjamin Chen C., Sandeep Bruma c, Satoshi T., Shinya Matsuura E, Keiji Tanimoto F, David J. Chen c,

- Kenshi Komatsu "Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380 (2009) 752–757
52. Toshiyuki Bohgaki, Miyuki Bohgaki, Razqallah Hakem. "DNA double-strand break signaling and human Disorders" *Genome Integrity* 2010, 1:15
53. Wainer Zoli, Paola Ulivi, Anna Tesei, Francesco Fabbri, Marco Rosetti, Roberta Maltoni, Donata Casadei Giunchi, Luca Ricotti, Giovanni Briigliadori, Ivan Vannini, Dino Amadori "Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines" *Breast Cancer Research* 2005, 7:R681-R689
54. Raffaella Di Micco, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, Massimiliano Garre, Paolo Giovanni Nuciforo, Aaron Bensimon, Roberta Maestro, Pier Giuseppe Pelicci, Fabrizio d'Adda di Fagagn "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication" *NATURE* Vol 444 30 Noviembre 2006
55. Omid Vafa, Mark Wade, Suzanne Kern, Michelle Beeche, Tej K. Pandita, Garret M. Hampton, Geoffrey M. Wahl "c-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate p53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability" *Molecular Cell*, Vol. 9, 1031–1044, May, 2002

56. Zhi-Min Yuan, Yinyin Huang, Takatoshi Ishiko, Surender Kharbanda, Ralph Weichselbaum, Donald Kufe "Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase" Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 1437–1440, February 1997

X. APÉNDICE (soluciones y medios de cultivo).

Medios de cultivo:

- LB:

10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, Agua c.b.p. 1 L. Se ajusta el pH a 7.5. Se esteriliza por autoclave.

- DMEM, SFB 10%, PISt (100 ml):

90 ml de Gluta-MAX-I (DMEM, alto glucosa y glutamina, Invitrogen), 10 ml de Suero

fetal bovino (Invitrogen), previamente inactivado durante 30 min a 56 °C e incubado

durante 2 días a 37 °C y 1 ml de solución de Penicilina (10.000 U/ml)- Estreptomicina (10.000 ug/ml), (HyClone).

Amortiguador de carga para proteínas (2X):

2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M, 0.4 mg de SDS, 2ml de glicerol, 200 ug de β -mercaptoetanol y 0.1 mg de azul de bromofenol en un volumen final de 10 ml. pH 6.8.

Amortiguador de corrida para electroforesis de proteínas:

Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 1%.

TAE (50X):

242 g de Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 37.2 g de Na₂EDTA.2H₂O. Agua c.b.p. 1 L.

TBE (10X):

108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico, 40 ml 0.5 M de EDTA pH 8. Agua c.b.p. 1L.

TE:

Tris.Cl 10 mM, pH 7.4 y EDTA 1 mM pH 8.0.

Solución bloqueadora para Western blot:

5% de leche descremada en PBS 1x pH 7.4

Amortiguador de transferencia (1X):

Tris (0.025 M), glicina (0.192 M), 20 % de metanol.

Amortiguadores para la obtención de extractos totales:

-**TNTE:** 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA

PBS pH 7.4:

NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaH₂PO₄.12H₂O 6.47 mM y KCl 2.68 mM.

Solución de Azul de Coomasie (1 L):

Coomasie R-250 al 0.25%, 500 ml de metanol y 70 ml de ácido acético. Agua c.b.p.1L.

Solución desteñidora:

Etanol 30 %, ácido acético 10 % y Agua bidestilada 60%.

Reactivo de Bradford:

50 mg de Azul de Coomasie G-250, 25 ml de etanol al 100%, 50 ml de ácido fosfórico al 85 % y 500 ml de agua bidestilada. La solución se filtra con papel Whatman No. 1.

Apéndice de soluciones y medios de cultivo

Solución stock de *Cis*-platino:


El día previo a ser utilizado se pesa la cantidad deseada y se diluye en PBS 1x, pH 7.4. Se almacena a -20 °C.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 26 de julio del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al QFB. José Ali Flores Pérez.

Dr. Mario César López Camarillo



Dra. Mavil López Casamichana



Dra. Elena Arechaga Ocampo



Pedro Abanada



REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTÓRICO MÉXICO, D.F.

TESIS URGENTES

PRESUPUESTOS DE 9:30 A.M. A 7:00 P.M.

SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

TEL. 5512-8469

PART. 2619-0742