



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

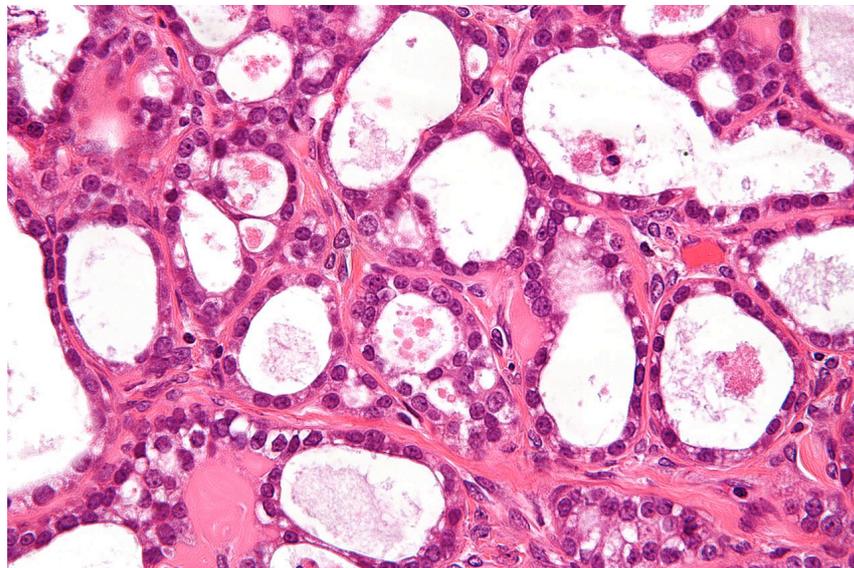
## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Análisis de la expresión del gen HMGB2 y relacionados en células de ovario tumorales en presencia de Olaparib**

**Análise da expresión da xene HMGB2 e asociados en células de ovario tumorais en presenza de Olaparib**

**Analysis of HMGB2 gene expression and related genes in tumor ovary cells in the presence of Olaparib**



**Nerea Martínez Corral**

**Curso: 2019-2020. Convocatoria: Julio**

*Director 1: Ángel José Vizoso Vázquez*

*Directora 2: Mónica Lamas Maceira*

## **Glosario de abreviaturas**

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ASCO: American Society of Clinical Oncology

ATCC: American Type Culture Collection

BRCA: Breast Cancer

CTC: Células tumorales circulantes

COMMD1: Copper Metabolism Domain Containing 1

DNAsa: Desoxirribonucleasa

DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DSB: Roturas bicatenarias

ECAAC: European Collection of Authenticated Cell Cultures

EMA: The European Medicines Agency

EOC: Cáncer epitelial ovárico

FBS: Suero Fetal Bovino

HMG: High Mobility Group

HMGB: High Mobility Group Box

LMP: Tumores de bajo potencial maligno

MIEM1: Migration And Invasion Enhancer 1

NCI: National Cancer Institute

OMS: Organización Mundial de la Salud

PARP: poli(ADP-ribosa) polimerasa

RNAsa: Ribonucleasa

RPMI: Rosswell Park Memorial Institute

RT-qPCR- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

TOV: Tumores dudosos o invasivos

UV: Ultravioleta

## Resumen

El cáncer de ovario es una enfermedad de alta incidencia entre las mujeres postmenopáusicas (entre 50 y 75 años), que presenta una tasa de supervivencia del 60% a edades menores de 65 y de un 31% en edades superiores a ésta. Uno de los medicamentos empleados para dicha enfermedad es Olaparib. Aunque este fármaco es efectivo como tratamiento de mantenimiento, su unión a PARP bloquea la reparación del material genético. La presencia de Olaparib junto con la proteína HMGB2 pone en evidencia que ésta podría tener varias dianas celulares en relación con su función de reparación del ADN. En este trabajo se ha estudiado mediante RT-qPCR la variación de la expresión de *HMGB2* además de otros dos genes como son *COMMD1* y *MIEM1* en dos líneas celulares diferentes (SKOV-3 y PEO1) tras un tratamiento con Olaparib y con respecto a un control, observándose una diferencia significativa en el gen *HMGB2* en la línea celular SKOV-3, lo que abre puertas a la realización de nuevos estudios para apoyar estos resultados.

Palabras clave: cáncer de ovario, HMGB2, Olaparib, expresión génica

## Resumo

O cancro de ovario é unha enfermidade de alta incidencia entre as mulleres postmenopáusicas (entre 50 e 75 anos), que presenta unha taxa de supervivencia do 60% a idades menores de 65 e dun 31% en idades superiores. Un dos medicamentos empregados para dita enfermidade é Olaparib. Aínda que este fármaco é efectivo como tratamento de mantemento, a súa unión a PARP bloquea a reparación do material xenético. A presenza de Olaparib xunto coa proteína HMGB2 pon en evidencia que esta podería ter varias dianas celulares en relación coa súa función de reparación do ADN. No presente traballo, estudouse mediante RT-qPCR a variación da expresión de *HMBG2* ademais de outros dous xenes como son *COMMD1* e *MIEM1* en dúas liñas celulares diferentes (SKOV-3 e PEO1) tras o tratamento con Olaparib e respecto a un control, observándose unha diferenza significativo no xene HMGB2 na liña celular SKOV-3, o que abre portas á realización de novos estudos para apoiar estes resultados.

Palabras clave: cancro de ovario, HMGB2, Olaparib, expresión xénica

## Abstract

Ovarian cancer is a high-incidence disease among postmenopausal women (between 50 and 75 years), which has a survival rate of 60% at ages under 65 and 31% at ages higher than it. One of the medicines used for this disease is Olaparib. Although this drug is effective as a maintenance treatment, its binding

to PARP blocks the repair of genetic material. The presence of Olaparib along with the HMGB2 protein shows that it could have several cellular targets in relation to its DNA repair function. In this work, the variation of the expression of *HMGB2* has been studied using RT-qPCR in addition to two other genes such as *COMMD1* and *MIEM1* in two different cell lines (SKOV-3 and PEO1) after treatment with Olaparib and with respect to a control, observing a significant difference in the *HMGB2* gene in the SKOV-3 cell line, which opens doors to the completion of new studies to support these results.

Keywords: ovarian cancer, HMGB2, Olaparib, gene expression

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El cáncer .....	1
1.2 El cáncer de ovario.....	2
1.3 El Olaparib.....	4
1.4 Proteínas HMGB. HMGB2. COMMD1 y MIEM1 .....	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	8
3.1 Cultivo celular.....	8
3.2 Tratamiento con Olaparib y recogida de células.....	9
3.3 Extracción de ARN .....	9
3.4 Cuantificación.....	10
3.5 Tratamiento con DNAsa I .....	10
3.6 Purificación y concentración de ARN .....	10
3.7 RT-qPCR.....	11
3.8 Análisis estadístico .....	13
4. RESULTADOS .....	13
4.1 Tratamiento con Olaparib.....	13
4.2 Extracción y cuantificación .....	14
4.3 Tratamiento con DNAsa I y cuantificación .....	14
4.4 Análisis de los resultados de RT-qPCR .....	15
5. Discusión .....	19
6. Conclusiones .....	20
7. Bibliografía.....	21

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El cáncer

El cáncer es un término que engloba un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y que se caracteriza por una división anormal de las células que incluso puede llegar a invadir partes del cuerpo adyacentes en lo que se conoce como metástasis (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018). Dentro del término general “cáncer” podemos englobar más de 100 tipos diferentes e incluso puede haber diferentes tipos de tumores en un órgano concreto. Las células cancerosas se caracterizan por 6 alteraciones en la fisiología celular (Figura 1), estando estas alteraciones presentes en la mayoría de los tumores humanos. (Hanahan & Weinberg, 2000).

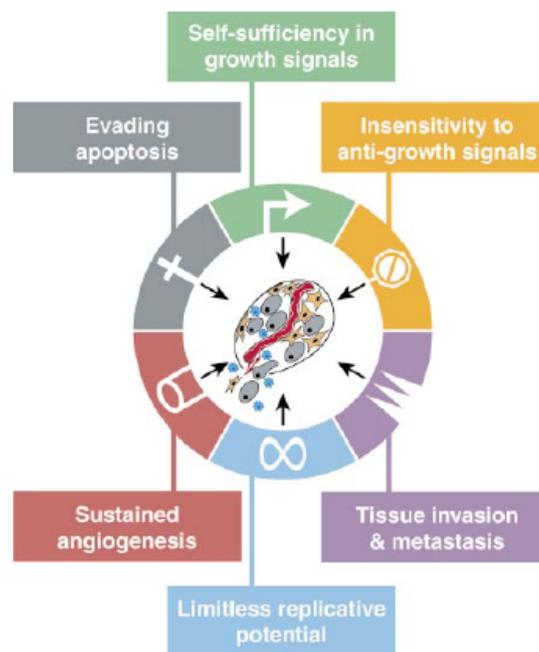


Figura 1. Características de las células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2000)

Actualmente, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad, habiendo aproximadamente 8,8 millones de casos a nivel mundial en 2015. Además, este informe indica que se estima que el número de casos aumente un 70% llegando a los 24 millones de casos en el año 2035. Los tipos más frecuentes y aquellos que causan mayor mortalidad son el de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Aproximadamente un 30% de las muertes se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios como puede ser un índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol, siendo todos estos factores prevenibles. Además de estos factores, la edad también es un factor de riesgo ya que lleva a la acumulación de cambios en el genoma (OMS).

Podemos diferenciar varios tipos de cáncer dependiendo de la célula en la cual se originen, aunque se distinguen 4 tipos fundamentalmente: linfomas (aquellos que se forman a partir de células del sistema inmune), sarcomas (a partir de hueso, cartílago, tejido conectivo, etc.), leucemias (a partir de células sanguíneas) y los carcinomas (a partir de tejido epitelial); siendo el último mencionado el más común, ya que representa alrededor del 90% del total de cánceres diagnosticados (Cooper & Hausman 2017).

## 1.2 El cáncer de ovario

Cada mujer tiene dos ovarios que se encuentran uno a cada lado del útero (Figura 2). Se trata de un órgano que se encuentra en la pelvis, con forma de almendra y una longitud de entre 2-4 centímetros. Las funciones del ovario son fundamentalmente dos: la producción de gametos femeninos y la secreción de hormonas femeninas, siendo las principales los estrógenos y la progesterona que están implicadas en varios procesos como la regulación del ciclo menstrual (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2020).

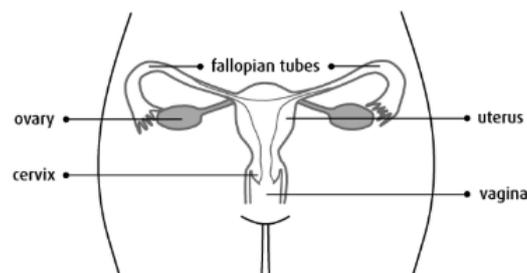


Figura 2. Ubicación del ovario en el sistema reproductor femenino (Canadian Cancer Society, 2020)

Existen tres tipos principales de cáncer de ovario: carcinoma epitelial, tumores de células germinales y tumores del estroma siendo el primero la principal causa de mortalidad por cáncer ginecológico (SEOM, 2020). Estos tipos de cáncer se corresponden con los tipos de células que forman el ovario (epiteliales, germinales y del estroma) (Figura 3).

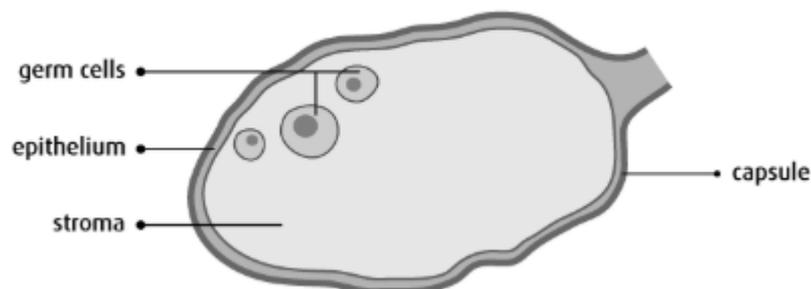


Figura 3. Sección transversal del ovario (Canadian Cancer Society, 2020)

La tasa de supervivencia a 5 años indica el porcentaje de mujeres con todo tipo de cáncer de ovario, trompa de Falopio y peritoneal que viven 5 años después de detectar el cáncer. Este porcentaje es del 48% pero puede variar en función de la etapa, el tipo de célula y el grado del cáncer. La tasa de supervivencia es del 60% para las mujeres menores de 65 años y del 31% para aquellas que superan esta edad (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2020).

La mayor letalidad del cáncer epitelial mencionada anteriormente es debida principalmente a la ausencia de síntomas en las primeras etapas. El cáncer epitelial ovárico (EOC) se puede subdividir en tumores de bajo potencial maligno (LMP) o dudosos e invasivos (TOV), presentando estos últimos un mayor nivel de células atípicas, es decir, con alteraciones que afectan a la forma, al tamaño o al proceso de diferenciación de las mismas (Ouellet *et al.*, 2006).

Los tumores de cáncer epitelial ovárico pueden presentar distintos niveles de diferenciación, siendo los LMP los tumores más diferenciados y se conocen como grado 0 (G0) o B mientras que los TOV pueden estar bien diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2) o pobremente diferenciados (G3) (Ouellet *et al.*, 2006).

El tratamiento básico que se usa para el cáncer de ovario es la cirugía tradicional combinado con quimioterapia, aunque hay nuevas terapias (segunda línea de tratamiento) como pueden ser la quimioterapia neoadyuvante; la cual hace referencia a un tratamiento que se administra como primer paso para reducir el tamaño del tumor antes del tratamiento principal que suele consistir en una cirugía, inmunoterapia y terapia dirigida molecularmente en la cual se utilizan medicamentos u otras sustancias dirigidas a moléculas específicas que participan en el crecimiento y la dispersión de las células cancerosas (NCI, 2020) (Wang *et al.*, 2015).

La metástasis es responsable de hasta el 90% de las muertes por cáncer. La cascada metastática se lleva a cabo en dos pasos. El primero de ellos es la translocación física de las células cancerosas desde el tumor a otro órgano y, el segundo paso es la colonización de estas células dentro de órgano al que se han desplazado. Esta cascada metastática (Figura 4) comienza con la adquisición de un fenotipo invasivo dentro del tumor primario por parte de las células cancerosas. Estas células tienen la capacidad de invadir la matriz circundante para así, a través de la circulación, llegar a otros órganos. Las células que viajan a través de la circulación son células tumorales circulantes (CTC) que muestran propiedades de supervivencia independientes del anclaje. Una vez que llegan a este nuevo órgano, las CTC tratan de colonizar y adaptarse al nuevo entorno haciendo frente a la respuesta inmune e inflamatoria, para finalmente proliferar y convertirse en un depósito macrometastático activo (Chaffer & Weinberg, 2011).

Además, en las últimas décadas se ha definido un proceso celular nuevo denominado transición epitelio mesénquima, el cual desempeña papeles importantes en la morfogénesis embrionaria. Se ha demostrado que este proceso puede inducir a las células madre no cancerosas a convertirse en células madre cancerosas (Chaffer & Weinberg, 2011).

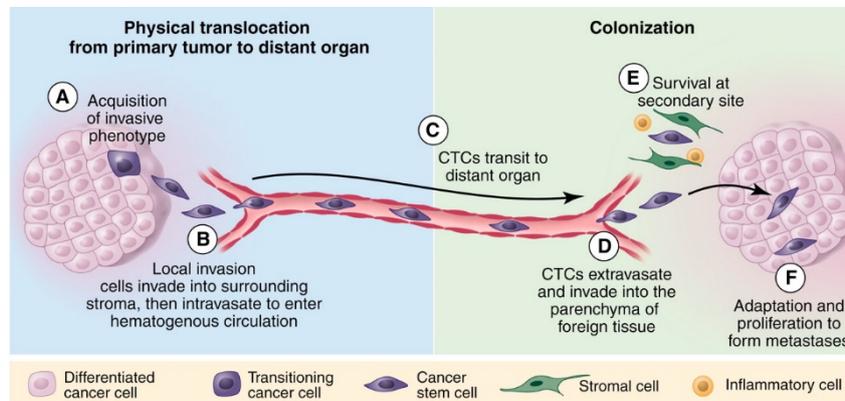


Figura 4. La cascada metastática (Chaffer & Weinberg, 2011).

### 1.3 El Olaparib

El Olaparib (Figura 5) es un inhibidor de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) que ha mostrado actividad antitumoral en pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado, entre otros (Ledermann *et al.*, 2012). Olaparib está autorizado para terapia de mantenimiento (aquella que se administra para impedir que el cáncer vuelva después de haber desaparecido (NCI, 2020)) de pacientes adultas con cáncer epitelial ovárico de alto grado, trompa de Falopio o peritoneal primario en recaída (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS, 2019).

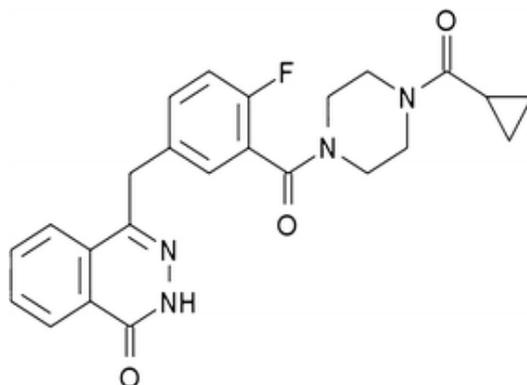


Figura 5. Estructura del Olaparib (Chen *et al.*, 2013)

Este medicamento se presenta en forma de cápsulas duras o comprimidos, siendo la dosis diaria recomendada de 800 mg al día para las cápsulas y de 600 mg diarios en caso de los comprimidos. Sin embargo, pueden aparecer efectos adversos por lo que estas dosis pueden ser modificadas. El inicio del tratamiento con Olaparib no puede ser más de 8 semanas después de terminar la última sesión de quimioterapia con platino (AEMPS, 2019). El tratamiento

con Olaparib solo es efectivo en aquellas pacientes con cáncer de ovario avanzado recién diagnosticado (Moore *et al.*, 2018).

Este fármaco fue el primer inhibidor de PARP usado en ensayos clínicos debido a su capacidad para inhibir PARP1/2, así como debido a su potencia (cantidad requerida para producir un efecto) o a las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas favorables (Slade, 2020). Las PARP son necesarias para una reparación eficiente de las roturas monocatenarias del ADN (AEMPS, 2019). Olaparib se une al sitio activo de PARP (Figura 6), evita su disociación y lo atrapa en el ADN, bloqueando la reparación. Esto provoca roturas bicatenarias (DSB) cuando las horquillas alcanzan el complejo PARP-ADN. En ausencia de BRCA1/2 funcional las DSB no se pueden reparar por recombinación homóloga. (The European Medicines Agency (EMA), 2006).

Para sustituir la ausencia mencionada anteriormente, se activan las vías alternativas propensas a errores como puede ser la unión de extremos no homólogos lo que va a ocasionar una mayor inestabilidad genómica. Tras varias rondas de replicación, esta inestabilidad llega a niveles no tolerables y da como resultado la muerte de las células cancerosas ya que presentan una gran cantidad de daños en el ADN (EMA, 2006).

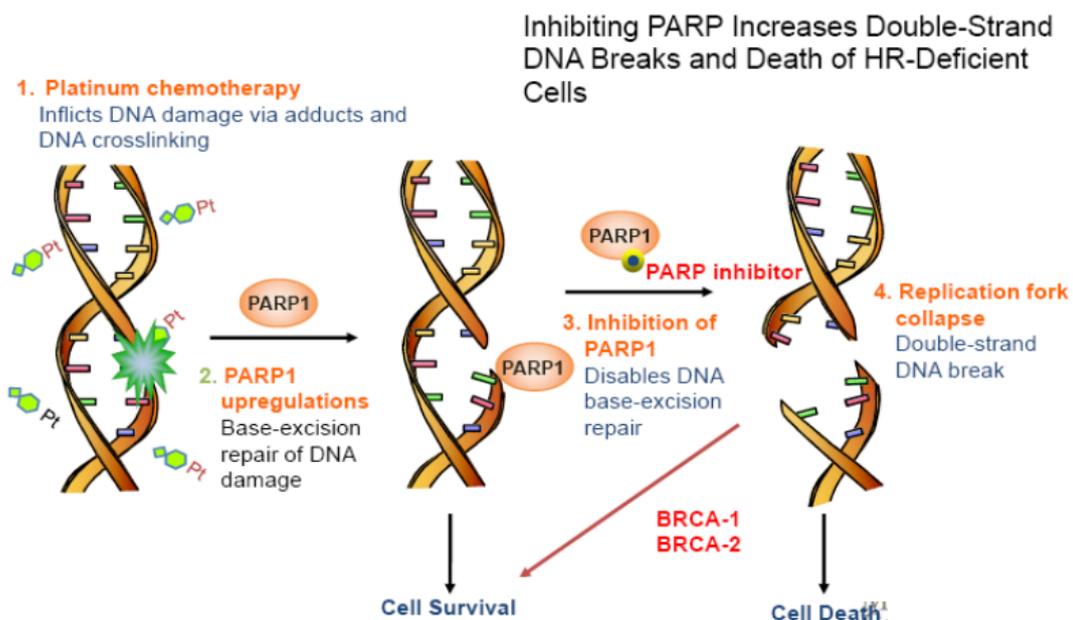


Figura 6. Mecanismo de acción de Olaparib (García, 2015)

#### 1.4 Proteínas HMGB. HMGB2. COMMD1 y MIEM1

La superfamilia de las proteínas HMG (High Mobility Group) está formada por tres grandes familias: HMGA, HMGB y HMGN (Barreiro-Alonso, 2017). Concretamente, la familia HMGB poseen un dominio único de unión al ADN, denominada caja HMG. Este dominio contiene entre 65-85 aminoácidos con un plegamiento en forma de L constituido por 3 hélices  $\alpha$  (Vizoso-Vázquez *et al.*,

2017). Se trata de proteínas no histónicas muy abundantes que se expresan de forma ubicua e influyen en numerosos procesos celulares, como la transcripción, la replicación, la recombinación, la reparación del ADN y la estabilidad genómica. Estas proteínas están consideradas como proteínas cromosómicas puesto que su principal función es la de unirse al ADN y provocar cambios conformacionales que faciliten su interacción con otras moléculas, como factores de transcripción o proteínas reparadoras del ADN (Figura 7) (Štros, 2010). A pesar de ser importantes como factores transcripcionales, como se ha mencionado anteriormente, su función en la regulación génica va a depender del tipo celular y/o tisular (Cámara-Quílez *et al.*, 2019).

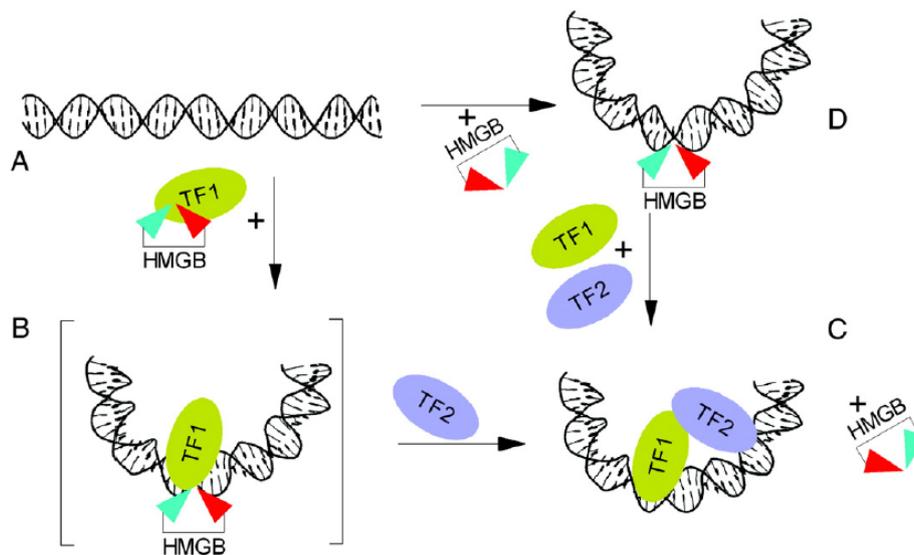


Figura 7. Papel de las proteínas HMGB. A) HMGB interactúa con TF1 (factor de transcripción) y lo dirige hacia su sitio de unión al ADN. B) Se forma un complejo ternario TF1-HMGB-ADN. C) TF2 (factor de transcripción) es atraído por el complejo mencionado anteriormente y provoca la liberación de HMGB de éste. D) La secuencia es plegada por HMGB (Štros, 2010).

Las proteínas HMGB están involucradas en la progresión del cáncer y en la respuesta celular a compuestos platinados que habitualmente se usan en el tratamiento quimioterapéutico de pacientes con cáncer ovárico (Barreiro-Alonso *et al.*, 2018). Además, se sobreexpresan en muchos tipos de cáncer, incluidos aquellos cuya etiología está basada en el daño oxidativo, y son importantes en la búsqueda de terapias contra el cáncer y tratamientos de regeneración celular más efectivos (Cámara-Quílez *et al.*, 2019).

Dentro de la familia HMGB se incluye HMGB1 que es ubicuo, HMGB2 específico de tejido y HMGB3 específico de embrión (Taniguchi *et al.*, 2009). Recientemente se ha descubierto también HMGB4 que comparte con las anteriores que tiene dos dominios HMG-box pero carece de cola acídica (Štros, 2010).

Concretamente, hablando de HMGB2 (Figura 8), se sabe que está formada por dos dominios HMG-box que median la unión con el ADN y una cola C-terminal

con 22 residuos Glu/Asp que modulan la afinidad de unión al ADN por interacciones intra e intermoleculares. Los dominios HMG-box mencionados anteriormente están conectados con la cola C-terminal por una región básica de unos 20 residuos (Cámara-Quílez *et al.*, 2019).

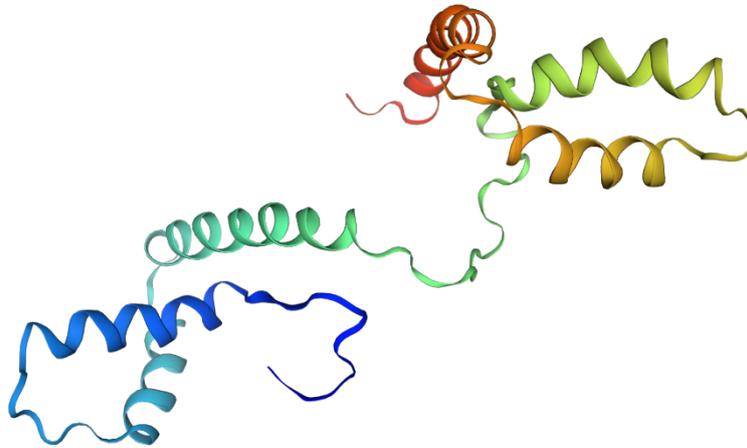


Figura 8. Estructura de HMGB2 (UniProt: P26583)

HMGB2 se encuentra sobreexpresado hasta 5 veces en células de tumores malignos e invasivos de cáncer de ovario epitelial seroso, provocando la inestabilidad en el genoma y un cambio en su localización celular, migrando desde el núcleo hasta el citoplasma para participar en los procesos de bloqueo de muerte celular por apoptosis (Cámara-Quílez *et al.*, 2019). Además, esta sobreexpresión también se ha asociado con los principales signos del cáncer, progresión tumoral, metástasis y mal pronóstico (Barreiro-Alonso *et al.*, 2018).

Las diferentes funciones que puede llevar a cabo HMGB2 van a depender de su localización celular, el núcleo, el citoplasma o el espacio extracelular; así como de sus modificaciones post-traduccionales (acetilaciones o de interacción con otras proteínas). El punto relativo a las modificaciones post-traduccionales es interesante ya que se ha comprobado que la interacción de HMGB2 con distintas proteínas relacionadas con procesos como puede ser la motilidad celular, el citoesqueleto, la apoptosis o la diferenciación y migración celular. Algunas de estas proteínas están relacionadas con el cáncer de ovario específicamente como: MIEM1 relacionada con la migración e invasión celular; HDLBP, HACD3 y FEZ1 involucradas en la proliferación celular o SAMM50 y ZNF428 relacionadas con la apoptosis. Estas proteínas que interactúan con HMGB2 en células epiteliales del ovario están involucradas en procesos que, en las células cancerosas están alterados, por lo que van a ser muy útiles para una mayor investigación del papel de HMGB2 (Barreiro-Alonso *et al.*, 2018).

*COMMD1* (Figura 9a) es una proteína de armazón implicada en diversos procesos fisiológicos y cuya función está relacionada con la ubiquitinización de proteínas (Mao *et al.*, 2011). La característica distintiva de las proteínas

COMMD es que presentan un dominio conservado en el extremo carboxi-terminal. Además, recientemente se ha demostrado que *COMMD1* inhibe la replicación de VIH-1 (Maine *et al.*, 2009).

*MIEM1* (Figura 9b) es una proteína potenciadora de migración e invasión cuya función es aumentar la migración celular al inducir la formación de filopodios en el borde de ataque de las células migratorias (Dasgupta *et al.*, 2009).

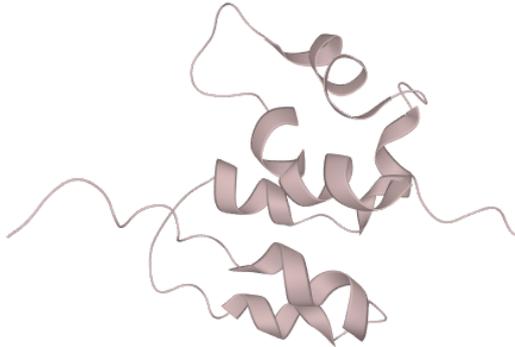


Figura 9a. Estructura de *COMMD1*  
(PDB: Q8N668)



Figura 9b. Estructura de *MIEM1*  
(PDB: Q9BRT3)

## 2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es determinar si la expresión de *HMGB2*, *COMMD1* y *MIEM1* en dos líneas celulares diferentes de cáncer de ovario (SKOV-3 y PEO1) varía en presencia de Olaparib con respecto a un control sin tratamiento.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Cultivo celular

Para poder analizar la expresión génica de *HMGB2* y otros en células de cáncer de ovario se utilizaron las líneas celulares SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) y PEO1 (ECAAC 10032308). Estas células se hacen crecer adheridas a la superficie de placas p100 utilizando dos medios de cultivo distintos, el Rosswell Park Memorial Institute 160 (RPMI160) (Gibco) para la línea PEO1 y el McCoy (Gibco) para la línea SKV3. Ambos cultivos fueron suplementados con 10% de suero fetal bobino (FBS) y con un 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) (ThermoFisher Scientific).

Todos estos procedimientos de manipulación del cultivo se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar Telstar Bio II Advance, previamente esterilizada con radiación UV. También es obligatorio utilizar material esterilizado para evitar la contaminación de los medios de cultivo y reactivos. Las células incubaron en condiciones estándar (37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad a niveles de saturación).

Previamente al inicio del tratamiento es necesario amplificar el número de células de ambas líneas tumorales mediante sucesivos pases (1:3), asegurándose de que el número de placas y su confluencia sean los deseados. Para esto, a partir de placas Petri p100 con células que habían alcanzado una confluencia del 70-80% lo primero fue retirar el medio de cultivo para luego, con 10 mL de tampón DPBS (Dulbeco's Phosphate-Buffered Saline) (Gibco) lavar las células para eliminar cualquier resto del medio que pudiera quedar. A continuación, se trataron con 500  $\mu$ L de una solución de tripsina-EDTA al 0.25% p/v (Thermo Fisher Scientific) durante dos minutos, una proteasa que digiere las proteínas adherentes de la superficie celular y permite que se liberen de la placa para recogerlas y pasarlas a una superficie nueva. A continuación, se paró la actividad proteolítica de la enzima agregando 10 mL del medio de cultivo nuevo para conseguir una completa inactivación. Finalmente, se transfirieron 3 mL a una placa nueva, donde se agregó más medio hasta tener un volumen final de 8 mL.

### **3.2 Tratamiento con Olaparib y recogida de células**

Ambas líneas celulares se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 60-70% de células en placa. Previamente a iniciar el tratamiento, se preparan las condiciones necesarias para llevarlos a cabo en tubos estériles. Ambos tipos de cultivo fueron suplementados con Olaparib (disuelto en DMSO) para obtener una concentración final de 2  $\mu$ M, o con DMSO (control) en un volumen equivalente. A continuación, quitaremos el medio de las placas y repartimos los 12 mL que tenemos en los tubos, de modo que cada placa tendrá 4 mL.

Las placas se incuban durante 48h en un incubador de CO<sub>2</sub> en condiciones estándar. A continuación, las células se levantaron con tripsina de la misma manera que se ha comentado anteriormente para luego, recogerlas en un tubo Falcon de 15 mL. Por último, se centrifuga a 200g durante 10 minutos, se elimina el medio y se congela a -80°C hasta el momento de realizar la extracción.

### **3.3 Extracción de ARN**

Para llevar a cabo la extracción y purificación se usa el *GeneJET™ RNA Purification Kit (Thermo Scientific™)*, siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Durante todo este proceso es importante trabajar en hielo ya que el ARN es una molécula lábil.

Vamos a trabajar en un kit que usa columnas que retienen ARN debido a su carga ya que los grupos fosfato tienen carga negativa y la membrana tiene alguna base que los retiene, por lo que solo van a poder eluir aquellos que se rehidratan con agua o con algún tampón.

Cada precipitado celular se trató con 600  $\mu$ L por muestra de la solución de lisis suplementada con 250  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, utilizando un vórtex hasta que se complete la resuspensión. A continuación, se añadieron 360  $\mu$ L de etanol

absoluto y se mezcló en el vórtex durante 2 segundos. Acto seguido, se hizo pasar dicha mezcla por la membrana de la columna de purificación mediante centrifugaciones de 2 minutos a 12000 en volúmenes de 700  $\mu\text{L}$ , descartando el sobrenadante del tubo colector. Posteriormente, se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de la solución de lavado 1 y se centrifuga 1 minuto a 12000g. Esto va seguido del lavado con la solución 2, que se llevó a cabo en dos pasos, el primero de ellos con 600  $\mu\text{L}$  y el segundo con 250  $\mu\text{L}$ , en ambos casos centrifugando 2 minutos a 12000g y descartando el fluido del tubo colector. Además, se centrifugó 2 minutos a 12000g sin añadir nada para eliminar cualquier resto que pudiera haber en la columna.

Finalmente, se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas para disolver el ARN, que se eluye mediante una centrifugación de 1 minuto a 12000g.

### **3.4 Cuantificación**

La cuantificación del ARN se realizó utilizando el espectrofotómetro *BioSpecrometer (Eppendorf)* junto con una cubeta *Eppendorf  $\mu\text{Cuvette}^{\circledR}$  G1.0* que permite medir la absorbancia de las muestras utilizando volúmenes de tan sólo 2  $\mu\text{L}$ .

La cuantificación de los ácidos nucleicos se basa en la capacidad que presentan para la absorción en el rango ultravioleta, por lo que van a tener su máximo a longitudes de onda de 260 nm mientras que los contaminantes que pueda haber presentan este máximo a 280 nm en el caso de las proteínas o 230 nm en el caso de los compuestos orgánicos. El índice  $A_{260}/A_{280}$  permite definir la calidad de los ácidos nucleicos. Que este cociente esté próximo a 2 indica un bajo contenido de contaminación proteica en la muestra.

### **3.5 Tratamiento con DNAsa I**

Este paso consiste en la eliminación del ADN, considerado en este caso como un contaminante, y obtener así una disolución de ARN puro. De cada muestra tomamos 2  $\mu\text{g}$ , que serán los que se traten con RNasa.

Además de la muestra, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de RNAsa (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) y 5  $\mu\text{L}$  de tampón de digestión. Debido a que el volumen final de la reacción era de 50  $\mu\text{L}$ , se añadió agua hasta completar dicho volumen. A la hora de realizar las mezclas en los tubos se sigue un orden específico, añadiendo primero el agua, luego el tampón, a continuación, el ARN y por último la enzima. Se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se procedió a la limpieza de las muestras, que se describe a continuación.

### **3.6 Purificación y concentración de ARN**

La purificación y concentración de la muestra se lleva a cabo siguiendo el protocolo *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Fisher Scientific<sup>TM</sup>)*. Este protocolo es similar al del apartado 3.3 Extracción del ARN, al que se le hace una modificación y es que en la etapa de elución con agua

libre de nucleasas (paso 10) añadimos 15  $\mu$ L de esta agua en lugar de los 10  $\mu$ L que recomienda el fabricante.

### 3.7 RT-qPCR

El análisis de la expresión de los genes de interés se realizó mediante RT-qPCR utilizando el kit comercial One-step NZY RT-qPCR Green kit (*Nzytech*<sup>TM</sup>) el termociclador StepOnePlus<sup>TM</sup> (Applied BioSystems). El kit comercial utilizado contiene los siguientes reactivos:

- NZYRT-mix: mezcla de retrotranscriptasa, encargada de sintetizar ADN complementario (cDNA) a partir del ARN mensajero (mRNA) presente en la muestra, así como inhibidores de nucleasas, que impiden la degradación del ARN.

- One-step NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2X): contiene una solución tamponante, sales, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) necesarios para la síntesis de ADN, una DNA polimerasa hot-start, que comienza la replicación del ADN tras ser sometida a 95°C permitiendo que no se produzcan amplificaciones inespecíficas durante la preparación de las muestras y un fluoróforo (Sybr) que se une específicamente a ADN bicatenario y que emite fluorescencia verde cuando es excitado.

Esto permite conocer en cualquier momento de la amplificación la cantidad de producto obtenido, puesto que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN presente en cada ciclo de la PCR y se hace una lectura en tiempo real de la misma durante los 40 ciclos de amplificación del cDNA. A medida que transcurre la reacción, se acumula producto amplificado en cantidad suficiente como para que el incremento de la señal fluorescente supere a la fluorescencia de fondo y sea detectable por el equipo. El número del ciclo en el cual se produce una señal detectable y única de fluorescencia recibe el nombre de ciclo umbral, también denominado como CT (Cycle Threshold), y guarda una relación inversamente proporcional a la cantidad de mRNA presente al inicio, de tal forma que cuanto mayor sea la cantidad inicial de mRNA menor será el valor del ciclo umbral.

Se analizaron los niveles transcripcionales de los genes de interés *HMGB2*, *COMMD1* y *MIEM1*, así como del constitutivo *GAPDH* (tabla 1), que codifica para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, y cuyos niveles de expresión no varían entre las condiciones experimentales utilizadas, sirviendo como control interno y permitiendo normalizar los resultados de los genes estudiados (Eisenberg & Levanon, 2013). Los cebadores utilizados para la amplificación del cDNA se diseñaron con ayuda del programa Netprimer (Premier Biosoft), y conforme a una serie de requisitos que permitan que el proceso se produzca de forma óptima. En este sentido, los cebadores utilizados deben presentar una temperatura de fusión ( $T_m$ ) similar, un porcentaje guanina/ citosina (G/C) igual o mayor de 42 %, no formar horquillas

ni dímeros, eficiencias de amplificación próximas al 100% y dar como resultado un amplicón de una longitud de entre 80 y 110 pb (Dieffenbach *et al.*, 1993) .

Tabla 1. Tabla descriptiva de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión (°C)	Tamaño amplicón (pb)
GAPDHf	CCTCCTGCACCACCAACT	57,2	102
GAPDhr	TGGCAGTGATGGCATGGA	57,0	102
HMGB2f	GAGCAGTCAGCCAAAGATAAACAA	60.4	111
HMGB2r	TCCTGCTTCACTTTTGCCCTT	61.0	111
COMMD1f	CAGCTATATCCAGAGGTGCCAC	62.1	109
COMMD1r	CCTCCAGCTGGTTGAAATCC	59.9	109
MIEM1f	TTGGGGGCAGGAGAGAGAC	61.0	107
MIEM1r	TTACCGAGGCGAAGAGTGG	59.7	107

Se realizaron reacciones con un volumen final de 10  $\mu$ L, en las que se añadieron las cantidades de cada reactivo mostrados en la Tabla 2, adaptadas a las indicaciones del fabricante (NZYTECH). De cada una de las condiciones de cultivo se realizaron tres réplicas biológicas. Adicionalmente, se incluyó una reacción con los cebadores de GAPDH para cada una de las muestras en la que no se incluyó la retrotranscriptasa y que nos sirvió como control negativo de la carga de ADN genómico en cada una de ellas.

Tabla 2. Desglose de componentes en las reacciones de PCR

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	Cantidad (unidades) [concentración]
NZYSpeedy qPCR Green master mix (2X)	5	(1X)
Cebador directo (10 $\mu$ M)	0.4	[400 nM]
Cebador reverso (10 $\mu$ M)	0.4	[400 nM]
NZYRT-mix	0.4	-
Agua destilada	2.8	-
RNA (1ng/ $\mu$ L)	1	(1ng)

Las 60 reacciones (4 genes y 12 muestras, además de los 12 controles negativos) fueron cargadas en placas de RT-qPCR de 96 pocillos y procesadas en el termociclador.

La RT-qPCR implica un ciclo inicial de retrotranscripción (20 minutos a 50°C), un ciclo de activación de la DNA polimerasa (5 minutos a 95°C) y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consta de 5 segundos a 95°C (desnaturalización) y 50 segundos a 60°C (anillamiento y amplificación). Una vez finalizada la fase de amplificación, se realizó una curva de

desnaturalización para comprobar la especificidad y homogeneidad en los amplicones obtenidos en la reacción.

### 3.8 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos tras la RT-qPCR se llevaron a cabo dos tipos de análisis: el primero de ellos mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001), el cual se trata de una buena manera de analizar los cambios en la expresión génica de las muestras tratadas respecto al control. A continuación, se llevó a cabo un análisis de varianzas para, posteriormente, poder realizar una prueba *t de student* con el fin de comprobar si hay diferencias significativas entre las medias de cada concentración con respecto al control.

El primero de los métodos mencionados anteriormente incluye dos maneras de calcular la variación de la expresión, una con respecto a una curva de patrones (cuantificación absoluta) y otra con respecto a un control no tratado (cuantificación relativa) (Livak & Schmittgen, 2001)

Los datos van a ser analizados utilizando la ecuación:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{TtratadoHMGB2} - C_{TtratadoGAPDH}) - (C_{TcontrolHMGB2} - C_{TcontrolGAPDH})$$

El valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  obtenido a partir de la ecuación mencionada anteriormente aporta una medida relativa del mRNA que está presente en la muestra y, consecuentemente, también de los niveles de expresión relativos con respecto a otros tratamientos.

Con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en la expresión de *HMGB2*, *COMMD1* y *MIEM1* en ambos tipos de líneas celulares (PEO1 y SKOV-3) se realizó un test paramétrico *t de student*, prueba diseñada inicialmente para examinar las diferencias entre dos muestras independientes y de pequeño tamaño que sigan una distribución normal y tengan varianzas homogéneas. Este test consta de una cola con un 95% de confianza. Se realizó previamente un análisis de varianza mediante una distribución F de Snedecor.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Tratamiento con Olaparib

Para llevar a cabo este estudio, se cultivaron 6 placas de células SKOV-3 y 6 placas de células PEO1. Estas placas fueron incubadas hasta obtener una confluencia del 60-70%. Ambos tipos de cultivo fueron tratados con Olaparib (disuelto en DMSO) para obtener una concentración final de 2  $\mu$ M, o con DMSO (control) en un volumen equivalente durante un total de 48h. Por tanto, se dispone de tres réplicas biológicas para cada uno de los tratamientos utilizados.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con DPBS, tratadas con tripsina y transferidas a tubos para su posterior conservación a -80°C.

#### 4.2 Extracción y cuantificación

La extracción del ARN total se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit de extracción de ARN (como se indica en el apartado 3.3 Extracción de ARN), para a continuación ser cuantificadas según lo indicado en el apartado 3.4 del presente trabajo.

De los resultados obtenidos y reflejados en la Tabla 3 cabe destacar que, en caso de las células PEO1 se observa una disminución de la concentración de ARN en las placas tratadas con Olaparib con respecto al control. Este resultado era en cierta medida el esperado, puesto que este fármaco es un agente citotóxico que reduce sustancialmente el número de células presentes en las placas en el momento de la recolección. En el caso de la línea celular SKOV-3, estas diferencias son más ajustadas.

Tabla 3. Resultados de la cuantificación de ácidos nucleicos, expresadas en ng/μL.

Muestra	Concentración ARN (ng/μL)
SKOV-3 control 1	164.7
SKOV-3 control 2	92.5
SKOV-3 control 3	143.9
SKOV-3 Olaparib 1	243.0
SKOV-3 Olaparib 2	136.0
SKOV-3 Olaparib 3	146.2
PEO1 control 1	302.6
PEO1 control 2	299.2
PEO1 control 3	554.7
PEO1 Olaparib 1	308.0
PEO1 Olaparib 2	184.0
PEO1 Olaparib 3	198.0

#### 4.3 Tratamiento con DNAsa I y cuantificación

La eliminación del ADN presente en la muestra se llevó a cabo tal y como se indica en el punto 3.5 del presente trabajo. Después del tratamiento, se procedió a la purificación y concentración de las muestras usando el el *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit*, eluyendo finalmente el ARN con 15 μL de agua libre de nucleasas (apartado 3.6 Purificación y concentración de ARN). Una vez hecha la cuantificación se obtienen los datos reflejados en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de ácidos nucleicos tras el tratamiento con DNAsa

Muestra	Concentración ARN (ng/ $\mu$ L)
SKOV-3 control 1	87
SKOV-3 control 2	66
SKOV-3 control 3	34
SKOV-3 Olaparib 1	98
SKOV-3 Olaparib 2	111
SKOV-3 Olaparib 3	65
PEO1 control 1	110
PEO1 control 2	97
PEO1 control 3	93
PEO1 Olaparib 1	54
PEO1 Olaparib 2	76
PEO1 Olaparib 3	71

#### 4.4 Análisis de los resultados de RT-qPCR

Para proceder al análisis de los datos, se siguió el método de Livak y Schmittgen (2001), descrito en el apartado 3.8. A partir del valor  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de cada réplica biológica se procedió a calcular la media de este valor, con sus respectivas desviaciones típicas, en cada uno de los tres genes analizados tras el tratamiento con 2  $\mu$ M del compuesto Olaparib. Estos valores, que son útiles como medida del cambio en la expresión génica con respecto al control en ausencia de tratamiento, se encuentran reflejados en la Tabla 5 para PEO1 y Tabla 6 para SKOV-3, y aparecen representados gráficamente en la Figura 10. Valores por debajo de 1 indican una reducción en la expresión relativa del gen objeto de estudio, mientras que valores superiores indican una sobreexpresión. En este caso, se observa cierta disminución en los niveles de expresión de *HMGB2*, *COMMD1* y *MIEM1* en la línea celular SKOV-3 tras el tratamiento con Olaparib, mientras que en la línea celular PEO1 esta disminución sólo es visible en el caso de *MIEM1*.

Tabla 5. Cálculo de los valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cada una de las réplicas biológicas tratadas con respecto al control en la línea celular PEO1, acompañado de los valores medios para las diferentes condiciones de tratamiento y sus desviaciones típicas.

Nombre muestra	E(Ct)	$\Delta Ct^*$	$2^{-\Delta Ct}$	Media $2^{-\Delta Ct}$	S.D. $2^{-\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}^{**}$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct}$	S.D. $2^{-\Delta\Delta Ct}$
PEO1_NT_1_GAPDH	20,459							
PEO1_NT_2_GAPDH	20,032							
PEO1_NT_3_GAPDH	20,806							
PEO1_NT_1_HMGB2	23,730	3,271	0,104	0,117	0,024			
PEO1_NT_2_HMGB2	22,815	2,783	0,145					
PEO1_NT_3_HMGB2	24,084	3,278	0,103					
PEO1_NT_1_COMMD1	24,764	4,305	0,051	0,067	0,031			
PEO1_NT_2_COMMD1	24,430	4,398	0,047					
PEO1_NT_3_COMMD1	24,084	3,278	0,103					
PEO1_NT_1_MIEM1	25,869	5,410	0,024	0,026	0,002			
PEO1_NT_2_MIEM1	25,243	5,211	0,027					
PEO1_NT_3_MIEM1	25,981	5,175	0,028					
PEO1_T_1_GAPDH	20,844							
PEO1_T_2_GAPDH	20,355							
PEO1_T_3_GAPDH	21,205							
PEO1_T_1_HMGB2	23,665	2,821	0,142	0,127	0,012	1,366	1,123	0,284
PEO1_T_2_HMGB2	23,439	3,084	0,118			0,812		
PEO1_T_3_HMGB2	24,230	3,025	0,123			1,192		
PEO1_T_1_COMMD1	24,551	3,707	0,077	0,070	0,006	1,513	1,183	0,451
PEO1_T_2_COMMD1	24,303	3,948	0,065			1,366		
PEO1_T_3_COMMD1	25,061	3,856	0,069			0,670		
PEO1_T_1_MIEM1	26,131	5,287	0,026	0,022	0,004	1,089	0,838	0,221
PEO1_T_2_MIEM1	25,979	5,624	0,020			0,751		
PEO1_T_3_MIEM1	26,951	5,746	0,019			0,673		

\*  $\Delta Ct = Ct(\text{Gen estudio}) - Ct(\text{GAPDH})$ ; \*\*  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tratamiento}) - \Delta Ct(\text{no tratado})$

Tabla 6. Cálculo de los valores  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cada una de las réplicas biológicas tratadas con respecto al control en la línea celular SKOV3, acompañado de los valores medios para las diferentes condiciones de tratamiento y sus desviaciones típicas.

Nombre muestra	E(Ct)	$\Delta Ct^*$	$2^{-\Delta Ct}$	Media $2^{-\Delta Ct}$	S.D. $2^{-\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}^{**}$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct}$	S.D. $2^{-\Delta\Delta Ct}$
SKOV-3_NT_1_GAPDH	20,700							
SKOV-3_NT_2_GAPDH	20,497							
SKOV-3_NT_3_GAPDH	20,208							
SKOV-3_NT_1_HMGB2	23,928	3,228	0,107	0,134	0,024			
SKOV-3_NT_2_HMGB2	23,299	2,802	0,143					
SKOV-3_NT_3_HMGB2	22,918	2,710	0,153					
SKOV-3_NT_1_COMMD1	24,391	3,691	0,077	0,070	0,019			
SKOV-3_NT_2_COMMD1	24,086	3,589	0,083					
SKOV-3_NT_3_COMMD1	24,587	4,380	0,048					
SKOV-3_NT_1_MIEM1	22,959	2,259	0,209	0,142	0,097			
SKOV-3_NT_2_MIEM1	22,924	2,427	0,186					
SKOV-3_NT_3_MIEM1	25,204	4,996	0,031					
SKOV-3_T_1_GAPDH	20,625							
SKOV-3_T_2_GAPDH	20,681							
SKOV-3_T_3_GAPDH	20,964							
SKOV-3_T_1_HMGB2	24,148	3,523	0,087	0,111	0,024	0,815	0,829	0,108
SKOV-3_T_2_HMGB2	23,568	2,887	0,135			0,943		
SKOV-3_T_3_HMGB2	24,130	3,166	0,111			0,729		
SKOV-3_T_1_COMMD1	24,696	4,071	0,059	0,062	0,002	0,768	0,953	0,320
SKOV-3_T_2_COMMD1	24,649	3,968	0,064			0,769		
SKOV-3_T_3_COMMD1	24,941	3,976	0,064			1,323		
SKOV-3_T_1_MIEM1	23,569	2,944	0,130	0,134	0,022	0,622	2,079	2,532
SKOV-3_T_2_MIEM1	23,815	3,134	0,114			0,613		
SKOV-3_T_3_MIEM1	23,638	2,674	0,157			5,002		

\*  $\Delta Ct = Ct(\text{Gen estudio}) - Ct(\text{GAPDH})$ ; \*\*  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{tratamiento}) - \Delta Ct(\text{no tratado})$

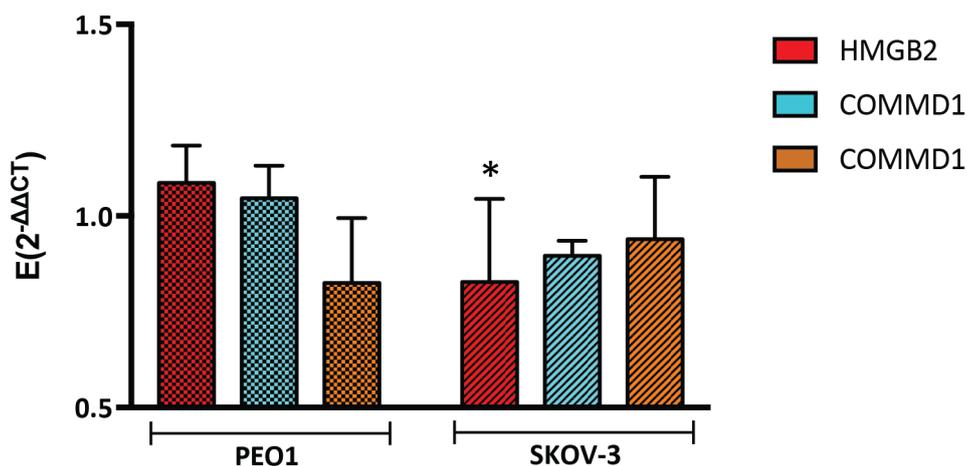


Figura 10. Representación en diagrama de barras los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para cada uno de los genes estudiados en las distintas condiciones de cultivo. (\*) nivel de significación  $p < 0,05$ .

Con el fin de darle una significancia estadística a los resultados obtenidos, se realizó un análisis mediante una prueba *t de student* por pares entre las muestras tratadas frente a las no tratadas para cada uno de los genes estudiados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Sólo en el caso de *HMGB2* en la línea celular SKOV-3 las diferencias en los niveles de expresión tras el tratamiento con Olaparib son estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). Para comprobar la homogeneidad de varianzas se utilizó el estadístico F de Snedecor, cumpliéndose en todos los casos el principio de homocedasticidad.

Tabla 7. Estadísticos obtenidos para cada uno de los genes estudiados en las distintas líneas celulares de cáncer de ovario.

Muestra	Gen	Varianza $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Tamaño muestral	Estadístico F de Snedecor	Alfa	Valor Crítico	p-valor Snedecor	p-valor t-student
PEO1 no tratado	HMGB2	0,00058631	3					
	COMMD1	0,000978104	3					
	MIEM1	4,96265E-06	3					
PEO1 tratado	HMGB2	0,000155257	3	3,776	0,05	19,000	0,209	0,247
	COMMD1	0,000356054	3	2,747	0,05	19,000	0,267	0,260
	MIEM1	1,33311E-05	3	0,372	0,05	19,000	0,729	0,136
SKOV-3 no tratado	HMGB2	0,000593371	3					
	COMMD1	0,000354535	3					
	MIEM1	0,00093309	3					
SKOV-3 tratado	HMGB2	0,000581548	3	1,020	0,05	19,000	0,495	0,026
	COMMD1	6,02939E-05	3	5,880	0,05	19,000	0,145	0,406
	MIEM1	0,000468276	3	1,993	0,05	19,000	0,334	0,251

## 5. DISCUSIÓN

Algunos inhibidores de PARP, como es el caso del Olaparib, han sido probados para el tratamiento del cáncer de ovario epitelial seroso obteniendo grandes beneficios clínicos (Fukumoto *et al.*, 2019). Una de las funciones de PARP es la reparación del ADN, cuyos mecanismos se verían enormemente alterados en presencia de Olaparib. Por su parte, *HMGB2* también está implicado en la reparación del ADN, actuando como sensor de daños en la doble hebra y modulando los mecanismos de reparación celular (Krynetskaia *et al.*, 2009). El hecho de que la presencia de Olaparib produzca una reducción en los niveles de expresión transcripcional de *HMGB2* podría tener su razón en las dosis empleadas. Fukumoto y colaboradores (Fukumoto *et al.*, 2019) utilizaron recientemente concentraciones superiores de Olaparib de (5  $\mu$ M), a diferencia de la utilizada en el presente experimento (2  $\mu$ M), viéndose que no hay datos significativos; por lo que sería necesario un estudio variando las concentraciones de Olaparib para ver qué ocurriría en ese caso.

Además, se hace un análisis adicional tanto de *COMMD1* como de *MIEM1*, aunque en ambos casos no se han encontrado resultados significativos. Estudios realizados sobre *COMMD1* revelan que la disminución de su expresión se observa con frecuencia en una gran variedad de cánceres, lo que se relaciona con la invasión tumoral (Sluis *et al.*, 2010); esto se puede observar en los resultados obtenidos en este experimento, ya que los resultados del análisis estadístico por debajo de 1 revelan que hay una disminución de la expresión. En cuanto a *MIEM1*, hay estudios (Rajendiran *et al.*, 2015) que muestran que éste se sobreexpresa en cánceres como el de mama, próstata y ovario además de tener un papel muy importante en procesos relacionados con la metástasis. Si comparamos esto con los resultados obtenidos, en caso de la línea celular SKOV-3 vemos una ligera sobreexpresión, mientras que en el caso de las células PEO1 lo que se observa es una reducción de la expresión, algo que sería positivo; ya que la sobreexpresión llevaría a una mayor agresividad de la enfermedad.

## 6. CONCLUSIONES

### Conclusiones

1. Se han estudiado cambios en la expresión de los genes *HMGB2*, *COMMD1* y *MIEM1* mediante cuantificación relativa por RT-qPCR de los niveles de mRNA en respuesta al tratamiento con el antitumoral Olaparib en concentraciones finales de 2  $\mu$ M.
2. En la línea celular PEO1 no se han observado diferencias significativas para ninguno de los genes estudiados.
3. En el caso de la línea SKOV-3, el tratamiento con Olaparib produjo cambios significativos en la expresión del gen *HMGB2*. Esto abre la posibilidad de ampliar el estudio con nuevos experimentos que corroboren y apoyen dichos resultados diferenciales.

### Conclusión

1. Estudáronse cambios na expresión dos xenes *HMGB2*, *COMMD1* e *MIEM1* mediante cuantificación relativa por RT-qPCR dos niveis de mRNA en resposta ao tratamento co antitumoral Olaparib en concentracións finais de 2  $\mu$ M.
2. Na liña celular PEO1 non se observaron diferenzas significativas para ningún dos xenes estudados.
3. No caso da liña SKOV-3, o tratamento con Olaparib produciu cambios significativos na expresión do xene *HMGB2*. Isto abre a posibilidade de ampliar o estudo con novos experimentos que corroboren e apoién ditos resultados diferenciais.

### Conclusions

1. Changes in the expression of the *HMGB2*, *COMMD1* and *MIEM1* genes have been studied by relative quantification by RT-qPCR of mRNA levels in response to treatment with the antitumor Olaparib at final concentrations of 2  $\mu$ M.
2. No significant differences have been observed in the PEO1 cell line for any of the genes studied.
3. In the case of the SKOV-3 line, treatment with Olaparib resulted in significant changes in the expression of the *HMGB2* gene. This opens up the possibility of expanding the study with new experiments that corroborate and support these differential results.

## 7. Bibliografía

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2019). *Informe de Posicionamiento Terapéutico de niraparib (Zejula®) en cáncer de ovario*. 2–7.
- Barreiro-Alonso, A., Lamas-Maceiras, M., García-Díaz, R., Rodríguez-Belmonte, E., Yu, L., Pardo, M., Choudhary, J. S., & Cerdán, M. E. (2018). Delineating the HMGB1 and HMGB2 interactome in prostate and ovary epithelial cells and its relationship with cancer. *Oncotarget*, 9(27), 19050–19064. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24887>
- Barreiro Alonso, A. I. (2017). *Interactome of Ixr1, HMGB1 and HMGB2 proteins in relation to their cellular functions*.
- Cámara-Quílez, M., Barreiro-Alonso, A., Rodríguez-Bemonte, E., Quindós-Varela, M., Cerdán, E., & Lamas-Maceiras, M. (2019). Differential characteristics of HMGB2 versus HMGB1 and their perspectives in ovary and prostate cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 26, 1–17. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190123120338>
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>
- Chen, Y., Zhang, L., & Hao, Q. (2013). Olaparib: A promising PARP inhibitor in ovarian cancer therapy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 288(2), 367–374. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2856-2>
- Dasgupta, S., Wasson, L. M., Rauniyar, N., Prokai, L., Borejdo, J., & Vishwanatha, J. K. (2009). Novel gene C17orf37 in 17q12 amplicon promotes migration and invasion of prostate cancer cells. *Oncogene*, 28(32), 2860–2872. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.145>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 23(4), 566–573. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- Fukumoto, T., Zhu, H., Nacarelli, T., Karakashev, S., Fatkhutdinov, N., Wu, S., Liu, P., Kossenkov, A. V, Showe, L. C., Jean, S., Zhang, L., & Zhang, R. (2019). N 6 -Methylation of Adenosine of FZD10 mRNA Contributes to PARP Inhibitor Resistance. *1640(11)*, 2812–2821. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3592>
- García, D. Y. (2015). *Cáncer de ovario y BRCA Abriendo un nuevo camino B-2 What Are the Promising Targets for Future Therapeutic • The most promising targets in clinical trials are Angiogenesis*.
- Krynetskaia, N. F., Phadke, M. S., Jadhav, S. H., & Krynetskiy, E. Y. (2009). Chromatin-associated proteins HMGB1/2 and PDIA3 trigger cellular

response to chemotherapy-induced DNA damage. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), 864–872. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0695>

- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., Matei, D., Macpherson, E., Watkins, C., Carmichael, J., & Matulonis, U. (2012). Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(15), 1382–1392. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105535>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maine, G. N., Mao, X., Muller, P. A., Komarck, C. M., Klomp, L. W. J., & Burstein, E. (2009). COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding. *Biochemical Journal*, 417(2), 601–609. <https://doi.org/10.1042/BJ20080854>
- Mao, X., Gluck, N., Chen, B., Starokadomskyy, P., Li, H., Maine, G. N., & Burstein, E. (2011). COMMD1 (Copper Metabolism MURR1 Domain-containing protein 1) regulates Cullin RING ligases by preventing CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated protein 1) binding. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32355–32365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278408>
- Moore, K., Colombo, N., Scambia, G., Kim, B. G., Oaknin, A., Friedlander, M., Lisyanskaya, A., Floquet, A., Leary, A., Sonke, G. S., Gourley, C., Banerjee, S., Oza, A., González-Martín, A., Aghajanian, C., Bradley, W., Mathews, C., Liu, J., Lowe, E. S., ... DiSilvestro, P. (2018). Maintenance olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(26), 2495–2505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810858>
- Ouellet, V., Page, C. Le, Guyot, M. C., Lussier, C., Tonin, P. N., Provencher, D. M., & Mes-Masson, A. M. (2006). SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, 119(9), 2119–2126. <https://doi.org/10.1002/ijc.22054>
- Rajendiran, S., Kpetemey, M., Maji, S., Gibbs, L. D., Dasgupta, S., Mantsch, R., Hare, R. J., Jamboor, K., Rajendiran, S., Kpetemey, M., Maji, S., Gibbs, L. D., Dasgupta, S., & Mantsch, R. (2015). MIEN1 promotes oral cancer progression and implicates poor overall survival MIEN1 promotes oral cancer progression and implicates poor overall survival. *Cancer Biology & Therapy*, 16(6), 876–885. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1040962>
- Sluis, B. Van De, Vooijs, M., Burstein, E., Sluis, B. Van De, Mao, X., Zhai, Y., Groot, A. J., & Vermeulen, J. F. (2010). COMMD1 disrupts HIF-1  $\alpha$  /  $\beta$  dimerization and inhibits human tumor cell invasion Find the latest version : COMMD1 disrupts HIF-1  $\alpha$  /  $\beta$  dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *120*(6), 2119–2130. <https://doi.org/10.1172/JCI40583.tination>

Štros, M. (2010). HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(1–2), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.09.008>

Taniguchi, N., Caramés, B., Ronfani, L., Ulmer, U., Komiya, S., Bianchi, M. E., & Lotz, M. (2009). Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1181–1186. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806062106>

The European Medicines Agency - EMA. (2006). Caelyx Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto 1. *Agencia Europea de Medicamentos*, 1–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.SABCS12-S5-3>

Vizoso-Vázquez, Á., Barreiro-Alonso, A., Rico-Díaz, A., Lamas-Maceiras, M., Rodríguez-Belmonte, E., Becerra, M., González-Siso, M. I., & Cerdán, M. E. (2017). HMGB Proteins from Yeast to Human. Gene Regulation, DNA Repair and Beyond. *Old Yeasts - New Questions*, 139–165. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70126>

American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2020. Ovarian Cancer: Statistics. Recuperado de <https://www.cancer.net/cancer-types/ovarian-fallopian-tube-and-peritoneal-cancer/statistics> el 12/04/2020.

National Cancer Institute (NCI), 2020. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol> el 23/05/2020.

Ovarian cancer, 2020. Toronto: Canadian Cancer Society Recuperado de <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/ovarian/ovarian-cancer/?region=on> el 14/03/2020.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> el 14/03/2020.