

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**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**

# T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**P R E S E N T A**  
**BIOL. LOURDES ECHARTE RAFFAELLI**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO**

**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO 2009**

## **SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN**



### **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA**

#### **RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES**

#### **DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>**

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. César López Camarillo  
Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### **ASESORES:**

Dra. Minerva Camacho Nuez  
Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Sara Frías Vázquez  
Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México e Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Patricio Gariglio Vidal  
Profesor investigador del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional

Dra. Mavil López Casamichana  
Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Selene Zárate Guerra  
Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias al apoyo académico y económico que otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco.

Asimismo, 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 Febrero del 2008 a 31 de Julio del 2009.

El trabajo se realizó en el laboratorio 2 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 le doy las gracias. Igualmente agradezco a la Dra. Sara Frías Vázquez, al Dr. Patricio Gariglio Vidal, a la Dra. Mavil López Casamichana y la Dra. Selene Zárate Guerra el asesoramiento brindado.

También quiero agradecer a la M. en C. Olga Hernández de la Cruz, a la M. en C. Itzel López Rosas y al Dr. José De La Luz Díaz Chávez por sus consejos en muchos de los ensayos realizados, a la Dra. Valeria Quintanar por su apoyo en la realización de las inmunohistoquímicas. Al M. en C. Eduardo Carrillo Tapia por su contribución en la secuenciación de los insertos clonados y al M. en C Iván Galvan Mendoza de la Unidad de Microscopia Confocal de los Laboratorios Centrales del CINVESTAV-IPN por su colaboración en la captura y análisis de imágenes de microscopía confocal.

# ÍNDICE

pág.

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| <b>ABREVIATURAS</b>                                                   | i  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>                                              | v  |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>                                               | ix |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                                | 1  |
| <b>1. Antecedentes generales del tema</b>                             | 1  |
| 1.1. Epidemiología y factores de riesgo                               | 1  |
| 1.2. Clasificación del cáncer de mama                                 | 5  |
| 1.3. Genética del cáncer de mama                                      | 8  |
| 1.4. Tratamiento del cáncer de mama                                   | 9  |
| 1.5. Mecanismos de reparación del daño al ADN inducido por cisplatino | 10 |
| 1.6. Mecanismo de recombinación homóloga                              | 11 |
| <b>2. Estado del arte</b>                                             | 16 |
| 2.1. El complejo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)                               | 16 |
| <b>3. Antecedentes particulares</b>                                   | 19 |
| 3.1. MRN y cáncer                                                     | 19 |
| 3.2. Inhibición de las vías de reparación en cáncer                   | 22 |
| <b>4. Importancia de continuar el estudio del tema</b>                | 25 |
| <b>II. HIPOTESIS</b>                                                  | 26 |
| <b>III. OBJETIVOS</b>                                                 | 26 |
| <b>1. Objetivo general</b>                                            | 26 |
| <b>2. Objetivos específicos</b>                                       | 26 |

|           |                                                                                                                                         |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>IV</b> | <b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>                                                                                                          | <b>27</b> |
| <b>V.</b> | <b>METODOLOGÍA</b>                                                                                                                      | <b>28</b> |
| <b>1.</b> | <b>Análisis de la expresión de MRE11 y RAD50 en biopsias de pacientes con CM mediante el uso de microarreglos de tejidos</b>            | <b>28</b> |
| 1.1.      | Preparación de cortes histológicos y tinción con HE                                                                                     | 28        |
| 1.2.      | Diseño y construcción de los microarreglos                                                                                              | 29        |
| 1.3.      | Prueba del Ac anti-MRE11 (Cellsignalling) por Western blot                                                                              | 29        |
| 1.4.      | Inmunohistoquímicas                                                                                                                     | 31        |
| 1.5.      | Contratinción con Hematoxilina de Mayer y montaje                                                                                       | 32        |
| 1.6.      | Procesamiento y análisis de los resultados de las inmunohistoquímicas                                                                   | 32        |
| <b>2.</b> | <b>Mantenimiento de las líneas celulares de CM</b>                                                                                      | <b>33</b> |
| 2.1.      | Condiciones de cultivo de las líneas celulares                                                                                          | 33        |
| 2.2.      | Subcultivo de líneas celulares                                                                                                          | 33        |
| 2.3.      | Congelamiento de líneas celulares                                                                                                       | 34        |
| 2.4.      | Descongelamiento de las líneas celulares                                                                                                | 34        |
| <b>3.</b> | <b>Análisis del nivel de expresión de MRE11, NBS1 y RAD50 en las líneas celulares MCF-7, ZR-75-1 y MDA-MB-231 mediante Western blot</b> | <b>34</b> |
| 3.1.      | Preparación de extractos proteicos                                                                                                      | 34        |
| 3.2.      | Determinación de la concentración de proteínas                                                                                          | 35        |
| 3.3.      | Electroforesis en condiciones desnaturalizantes                                                                                         | 36        |
| 3.4.      | Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa                                                                                 | 36        |
| 3.5.      | Ensayos de Western blot                                                                                                                 | 37        |

|           |                                                                                           |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.</b> | <b>Silenciamiento de la expresión del gen <i>mre11</i> mediante interferencia del ARN</b> | <b>39</b> |
| 4.1.      | Elección de secuencia blanco y diseño de oligonucleótidos                                 | 39        |
| 4.2.      | Hibridación de oligonucleótidos                                                           | 39        |
| 4.3.      | Transformación                                                                            | 42        |
| 4.3.1.    | Prepararon bacterias competentes congeladas                                               | 42        |
| 4.3.2.    | Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                      | 42        |
| 4.4.      | Elección de las clonas DH5 con inserto                                                    | 43        |
| 4.4.1.    | Extracción del plásmido por lisis alcalina (Miniprep)                                     | 43        |
| 4.4.2.    | Liberación del inserto con <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>                                  | 44        |
| 4.5.      | Curva de muerte (selección con Puromicina)                                                | 44        |
| 4.6.      | Transfección de pSilencer5.1 retro- <i>mre11</i> sh en línea celular de CM                | 45        |
| 4.7.      | Análisis de la expresión del ARNm del gen <i>mre11</i>                                    | 48        |
| 4.7.1     | Aislamiento del ARN total                                                                 | 48        |
| 4.7.2.    | Síntesis del ADN complementario                                                           | 49        |
| 4.7.3.    | Prueba de los oligonucleótidos para PCR                                                   | 49        |
| 4.7.4.    | PCR con ADN complementario                                                                | 50        |
| 4.7.5.    | Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida              | 51        |
| <b>5.</b> | <b>Evaluación de quimiosensibilidad al cisplatino</b>                                     | <b>51</b> |

|              |                                                                                                                        |    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>VI.</b>   | <b>RESULTADOS</b>                                                                                                      | 53 |
| 1.           | Análisis de la expresión de MRE11 y RAD50 en biopsias de pacientes con CM                                              | 53 |
| 2.           | Análisis del nivel de expresión de MRE11, NBS1 y RAD50 en las líneas celulares MCF-7, ZR-75-1 y MDA-MB-231             | 63 |
| 3.           | Silenciamiento del gen <i>mre11</i> mediante interferencia del ARN                                                     | 65 |
| 4.           | Evaluación de la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en las células MDA-MB-231 al silenciar el gen <i>mre11</i> | 83 |
| <b>VII.</b>  | <b>DISCUSIÓN</b>                                                                                                       | 89 |
| <b>VIII.</b> | <b>APÉNDICE (soluciones)</b>                                                                                           | 92 |
| <b>IX.</b>   | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                    | 96 |



## ABREVIATURAS

|                   |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| Ac                | Anticuerpo                                            |
| ADN               | Ácido Desoxirribonucleíco                             |
| ADNc              | Ácido Desoxirribonucleíco complementario              |
| ARN               | Ácido ribonucleíco                                    |
| ARNm              | ARN mensajero                                         |
| AT                | Ataxia telangiectasia                                 |
| ATLD              | Desorden similar a ataxia telangiectasia              |
| ATR               | Proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y RAD3 |
| BASC              | Complejo de vigilancia genómica asociado a BRCA1      |
| BLM               | Síndrome de Bloom                                     |
| brca1             | Breast cancer 1                                       |
| brca2             | Breast cancer 2                                       |
| BSA               | Albúmina sérica bovina                                |
| CaCl <sub>2</sub> | Cloruro de calcio                                     |
| CCU               | Cáncer cérvico uterino                                |
| CDDP              | Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II)             |
| CHO               | Ovario de hámster chino                               |
| CM                | Cáncer de mama                                        |
| CME               | Cáncer de mama esporádico                             |
| CMH               | Cáncer de mama hereditario                            |
| CO <sub>2</sub>   | Dióxido de carbono                                    |
| C-terminal        | Carboxilo terminal                                    |
| D.O.              | Densidad Óptica                                       |
| DAB               | 3,3-Diaminobencidina                                  |
| DMEM              | Cultivo de Eagle modificado por Dulbecco              |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido                                      |
| DNAsa I           | Desoxirribonucleasa I                                 |

|                   |                                                                              |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| dNTP's            | Desoxi Nucleótidos Trifosfatados                                             |
| DSB               | Rupturas doble cadena del ADN                                                |
| DTT               | Ditiotreitol                                                                 |
| <i>E. coli</i>    | <i>Escherichia coli</i>                                                      |
| E64               | Inhibidor epoxy succínico                                                    |
| EDTA              | Ácido etilendiaminotetraacético                                              |
| EGTA              | Ácido etilenglicoltetraacético                                               |
| EN                | Extracto Nuclear                                                             |
| ET                | Extracto total                                                               |
| FA                | Anemia de Fanconi                                                            |
| FUCAM             | Fundación Mexicana de Fomento para la Prevención Oportuna del Cáncer de Mama |
| GFP               | Proteína verde fluorescente                                                  |
| h/hs              | Hora/ horas                                                                  |
| HCl               | Ácido clorhídrico                                                            |
| HE                | Hematoxilina eosina                                                          |
| Hepes             | Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico                         |
| HRP               | Peroxidasa de rábano picante                                                 |
| INMEGEN           | Instituto Nacional de Medicina Genómica                                      |
| IHQ               | Inmunohistoquímica                                                           |
| kDa               | Kilodaltones                                                                 |
| l                 | Litros                                                                       |
| LB                | Medio de cultivo Luria-Bertoni                                               |
| Leu               | Leucina                                                                      |
| mA                | Miliamperios                                                                 |
| MAT               | Microarreglo de tejidos                                                      |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloruro magnesio                                                             |
| min               | Minuto                                                                       |
| ml                | Mililitros                                                                   |
| MMR               | Sistema de reparación de apareamientos erróneos                              |

|                   |                                                                                                    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MnCl <sub>2</sub> | Cloruro de manganeso                                                                               |
| moAc              | Anticuerpo monoclonal                                                                              |
| MOPS              | Ácido 3-[N-morfolino] Propano Sulfónico                                                            |
| MRE11             | Proteína homóloga a la proteína de recombinación meiotica 11<br>homólogo A de <i>S. cerevisiae</i> |
| MRN               | 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               | Síndrome de Nijmegen breakage                                                                      |
| NBS               | Nibrin                                                                                             |
| NER               | Reparación por escisión de nucleótido                                                              |
| ng                | Nanogramo                                                                                          |
| nm                | nanómetro                                                                                          |
| NP40              | Nonidet P-40                                                                                       |
| nt                | Nucleótidos                                                                                        |
| N-terminal        | Amino-terminal                                                                                     |
| ° C               | Grado Celsius                                                                                      |
| OR                | Odds ratio                                                                                         |
| PAGE              | Electroforesis en Gel de Poliacrilamida                                                            |
| pb                | Pares de Bases                                                                                     |
| PBS               | Buffer Fosfato Salino                                                                              |
| PBS               | Solución Amortiguadora de Fosfatos                                                                 |
| PCR               | Reacción en Cadena de la Polimerasa                                                                |
| PFA               | Paraformaldehído                                                                                   |
| Phe               | Fenilalanina                                                                                       |
| PISt              | Penicilina-Estreptomicina                                                                          |
| PMSF              | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo                                                                    |
| poAc              | Anticuerpo policlonal                                                                              |
| RAD50             | Proteína de reparación de ADN RAD50                                                                |

|       |                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| RbCl  | Cloruro de rubidio                                            |
| RDS   | Síntesis de ADN radioresistente                               |
| RH    | Recombinación homóloga                                        |
| RNAi  | Interferencia del ARN                                         |
| RPA   | Proteína de replicación                                       |
| 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                                             |
| SMC   | Proteínas de mantenimiento de la estructura de los cromosomas |
| TA    | Temperatura ambiente                                          |
| Ta    | Temperatura de annealing                                      |
| TBE   | Tampón de Tris, borato y EDTA                                 |
| TBP   | Proteína de unión a la caja TATA                              |
| TLS   | Síntesis translesión                                          |
| ug    | Microgramo                                                    |
| ul    | Microlitros                                                   |
| UV    | Ultravioleta                                                  |
| WB    | Western blot                                                  |
| %     | Porcentaje                                                    |

|                   | ÍNDICE DE FIGURAS                                                                                                                                                                         | pág. |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b>  | Tendencia de la mortalidad y número de casos por cáncer de mama en México, 1955 – 2007, y proyección 2008-2020.                                                                           | 4    |
| <b>Figura 2.</b>  | Proteínas que participan en el proceso de recombinación homóloga.                                                                                                                         | 13   |
| <b>Figura 3.</b>  | Mecanismo de recombinación homóloga.                                                                                                                                                      | 15   |
| <b>Figura 4.</b>  | Arquitectura del complejo MRN y su interacción con la ruptura doble cadena del ADN.                                                                                                       | 17   |
| <b>Figura 5.</b>  | Esquema del diseño de los miroarreglos de tejidos (MAT) MAT005, MAT009 y MAT011.                                                                                                          | 30   |
| <b>Figura 6.</b>  | Mapa del vector pSilencer5.1-U6 Retro                                                                                                                                                     | 41   |
| <b>Figura 7.</b>  | Western blot con anticuerpo $\alpha$ -MRE11 de Cellsignaling e imágenes representativas de inmunohistoquímicas con anticuerpos a-MRE11, a-RAD-50 de Santa Cruz y control negativo de Dako | 55   |
| <b>Figura 8.</b>  | Imágenes representativas de la clasificación de las muestras empleadas en las inmunohistoquímicas según su calidad.                                                                       | 56   |
| <b>Figura 9.</b>  | Imágenes representativas de biopsias con expresión nula, baja, moderada y alta de la proteína MRE11.                                                                                      | 59   |
| <b>Figura 10.</b> | Imágenes representativas de biopsias con expresión nula, baja, moderada y alta de la proteína RAD50.                                                                                      | 61   |

---

|                   |                                                                                                                                                                                                        |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 11.</b> | Análisis por Western blot de las proteínas del complejo MRN en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1.                                                                                       | 64 |
| <b>Figura 12.</b> | Purificación del ADN plasmídico de clonas MRE11.1 y MRE11.2 y liberación de inserto de ~55 pb por doble digestión con las enzimas BamHI y HindIII de las clonas MRE11.                                 | 67 |
| <b>Figura 13.</b> | Purificación del ADN plasmídico de clonas ciclofilina (C+) y scramble (C-) y liberación de inserto de ~55 pb por doble digestión con las enzimas BamHI y HindIII de las clonas ciclofilina y scramble. | 68 |
| <b>Figura 14.</b> | Secuencias obtenidas de la clona 2 MRE11.1, la clona 5 MRE11.2, la clona 16 ciclofilina (C+) y scramble (C-).                                                                                          | 69 |
| <b>Figura 15.</b> | Determinación de la concentración óptima de puromicina para selección en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.                                                                                      | 71 |
| <b>Figura 16.</b> | Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con las diferentes concentraciones de puromicina en relación al control no tratado para cada día.                         | 72 |
| <b>Figura 17.</b> | Evaluación del método de transfección midiendo la expresión de GFP por microscopía confocal.                                                                                                           | 75 |
| <b>Figura 18.</b> | Prueba de los oligonucleótidos por PCR con ADN genómico.                                                                                                                                               | 78 |
| <b>Figura 19.</b> | Prueba de los oligonucleótidos por RT-PCR para medir la expresión de mre11 en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231                                                                                  | 80 |

|                   |                                                                                                                                                                                                            |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 20.</b> | Silenciamiento transitorio de la expresión de <i>mre11</i> en la línea celular MDA-MB-231.                                                                                                                 | 82 |
| <b>Figura 21.</b> | Evaluación de las consecuencias de silenciar el gen <i>mre11</i> luego del tratamiento de células MDA-MB-231 con distintas concentraciones de cisplatino en términos de sensibilidad al quimioterapéutico. | 84 |
| <b>Figura 22.</b> | Evaluación de las consecuencias de silenciar el gen <i>mre11</i> luego del tratamiento de células MDA-MB-231 con cisplatino en términos de sensibilidad al quimioterapéutico.                              | 87 |
| <b>Figura 23.</b> | Evaluación de la eficiencia de transfección midiendo la expresión de GFP por microscopía confocal.                                                                                                         | 88 |

|                 | ÍNDICE DE TABLAS                                                                                                                                                                                                                                                   | pág. |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Tabla 1.</b> | Características de los anticuerpos empleados para la inmunodetección.                                                                                                                                                                                              | 38   |
| <b>Tabla 2.</b> | Características de las secuencias blanco para silenciar gen <i>mre11</i> .                                                                                                                                                                                         | 40   |
| <b>Tabla 3.</b> | Cantidades de ADN, lipofectamina y medio de cultivo empleados en las transfecciones con placas de 24 pozos.                                                                                                                                                        | 47   |
| <b>Tabla 4.</b> | Se representa la proporción de spots de las biopsias de tejido mamario tumoral (T) y tejido mamario normal (N) que se encuentran en las categorías muy buena, buena, regular o mala según su calidad en las inmunohistoquímicas con el anticuerpo $\alpha$ -MRE11. | 57   |
| <b>Tabla 5.</b> | Se representa la proporción de spots de las biopsias de tejido mamario tumoral (T) y tejido mamario normal (N) que se encuentran en las categorías muy buena, buena, regular o mala según su calidad en las inmunohistoquímicas con el anticuerpo $\alpha$ -RAD50. | 57   |
| <b>Tabla 6.</b> | Resumen del nivel de expresión de MRE11 en biopsias de tejido mamario normal y tumoral.                                                                                                                                                                            | 60   |
| <b>Tabla 7.</b> | Comparación del nivel de expresión de MRE11 en las biopsias de los pacientes que se cuenta con el resultado tanto en tejido normal como tumoral.                                                                                                                   | 60   |
| <b>Tabla 8.</b> | Resumen del nivel de expresión de RAD50 en biopsias de tejido                                                                                                                                                                                                      | 62   |



mamario normal y tumoral.

- Tabla 9.** Comparación del nivel de expresión de RAD50 en las biopsias de los 62  
pacientes que se cuenta con el resultado tanto en tejido normal como  
tumoral.
- Tabla 10.** Secuencia de los oligonucleótidos que se emplearon para silenciar 65  
gen *mre11*.
- Tabla 11.** Secuencia de oligonucleótidos empleados para analizar la expresión 77  
de *mre11* y *ciclofilina*.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

### 1.1. Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer es un grupo de enfermedades etiológicamente distintas entre sí, caracterizadas por un crecimiento celular exacerbado y gran capacidad invasiva. En particular 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 lobulillos (glándulas donde se produce la leche)<sup>1</sup>. En un 80% de los casos las neoplasias son ductales y el resto son lobulillares. Entre el 15 al 30% de estas neoplasias corresponden a carcinomas *in situ* y el resto son infiltrantes<sup>2</sup>. Ocurre tanto en hombres como en mujeres, aunque el CM masculino es de escasa incidencia (1%)<sup>3</sup>.

En todo el mundo, el CM es la forma más común de cáncer en las mujeres. Representa uno de cada diez de todos los nuevos diagnósticos de cáncer y casi uno de cada cuatro neoplasias en la mujer. Cada año, el CM es diagnosticado en 1,1 millones de mujeres en todo el mundo. La incidencia mundial anual de cáncer de mama casi se ha duplicado desde 1975<sup>4,5</sup>.

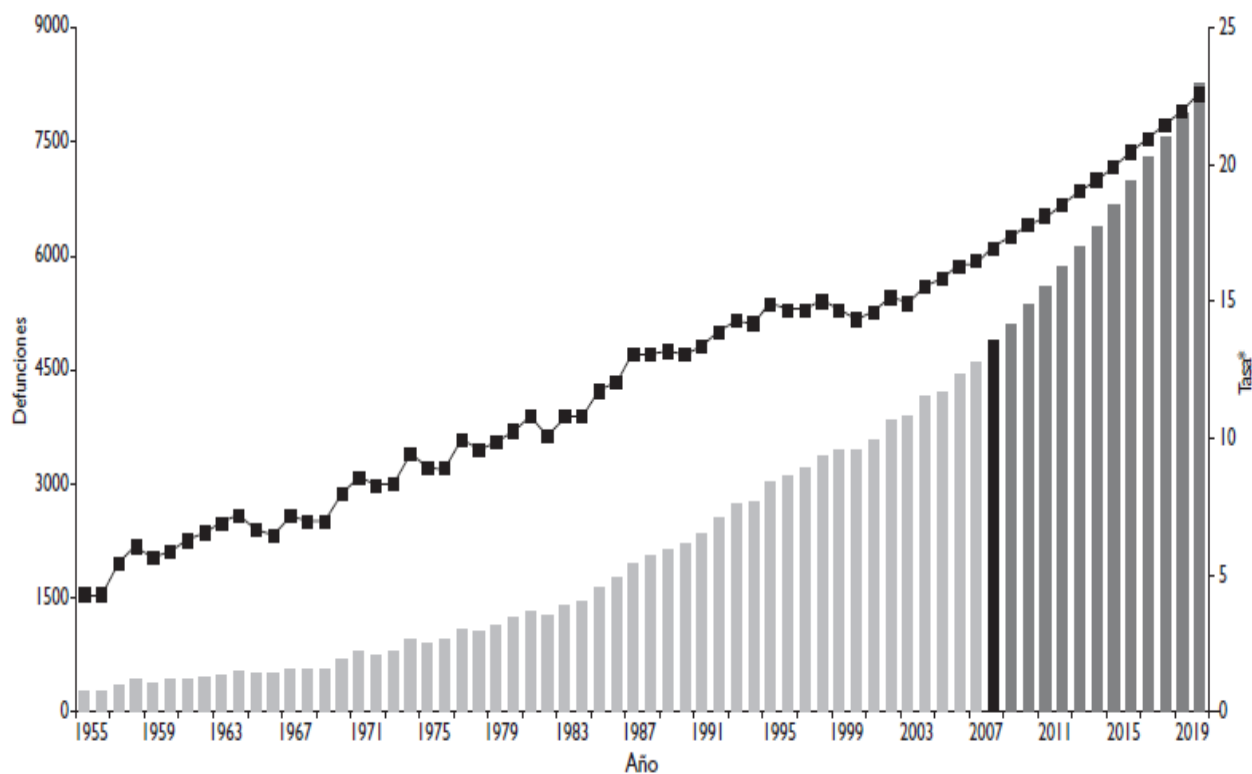
En México, a partir del 2006 el CM es la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años, la primera es por cáncer cérvico uterino (CCU), y se ubica como la primera causa de muerte por tumores malignos entre las mujeres. En el 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas por CM, lo cual implica un fallecimiento

cada 2 horas. La tasa de mortalidad por CM en México ha registrado un aumento importante, desde 1950 al 2005 la tasa pasó de 2 por 100,000 mujeres a una de 9 por 100,000 mujeres. La mortalidad por CCU ha ido descendiendo a partir de 1990 en México. No así la tasa por CM, que se incrementó 2.5 veces de 1992 al 2006, de tal forma que a partir del 2005 la tasa de mortalidad de CM es superior a la de CCU<sup>6</sup>. Si se considera la tendencia ascendente en la mortalidad por CM y el envejecimiento de la población mexicana, se puede proyectar que la carga de la enfermedad en México será similar a la observada hoy día en Norteamérica en 12 años (figura 1)<sup>7</sup>. En cuanto a la incidencia en el año 2001 se reportaron 3,971 casos (10.2 x 100,000 mujeres de 15 años o más) en México, y en el 2006 se elevó a 6,043 casos (15.6 por 100,000)<sup>8</sup>.

Por estudios epidemiológicos se han identificado una serie de factores que aumentan el riesgo de padecer CM y otros factores que son protectores. Dentro de los factores no modificables se encuentra la edad, la cual aumenta el riesgo a desarrollar CM a medida que se envejece<sup>9</sup>. Otros factores que aumentan el riesgo a padecer CM son el género, siendo mucho más frecuente en mujeres, y el origen, presentando un mayor riesgo las personas con ascendencia europea. Los factores hormonales y reproductivos son importantes ya que determinan el tiempo de exposición a hormonas esteroideas. Dentro de los que aumentan el riesgo a padecer CM son el tener una edad de menarca temprana, infertilidad, primer embarazo a edad adulta, nuliparidad y como factor protector la lactancia. Los factores ambientales que pueden aumentar el riesgo son, por ejemplo, la exposición a radiación ionizante y a hidrocarburos poliaromáticos. En cuanto a la dieta 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, si bien existen estudios que no ratifican estas asociaciones. Por otro se ha observado que la actividad física actúa como factor protector<sup>10</sup>.

También se ha observado que poseer historia familiar de CM es un factor de riesgo significativo para esta enfermedad. Se estima que un 15% de las personas con CM heredaron un gen mutado de sus padres, o sea, que cada célula en el cuerpo de la persona contiene la mutación y lo que es más importante las células germinales contienen la mutación y pueden heredarlo a su descendencia<sup>10,11</sup>. Sin embargo, el 85% de los casos de CM se consideran esporádicos (CME). Las personas con CME, no heredan mutaciones de sus padres que causan el cáncer sino que ciertas células en su cuerpo sufren mutaciones de *novο* o alteraciones epigenéticas que dan lugar al cáncer. En general se requiere más de una mutación para provocar cáncer por lo que las personas que han heredado una mutación son más propensas a desarrollarlo. Existen varias características distintivas cuando se compara el CME con el cáncer de mama hereditario (CMH). La edad de aparición es considerablemente inferior en los casos con CMH, la prevalencia de CM bilateral es más alta y en algunas familias los individuos padecen tumores asociados. Entre los tumores asociados se encuentran los de ovario, colon, próstata, endometrio y sarcomas<sup>12</sup>. Los genes afectados en CMH a menudo son los mismos que están mutados en CME<sup>10</sup>.



\*Tasa cruda por 100 000 mujeres de 25 y más años

**Fig.1. Tendencia de la mortalidad y número de casos por cáncer de mama en México, 1955 – 2007, y proyección 2008-2020.** Fuente: Bases de datos OMS/INEGI/SSA 1955-2007

## **1.2. Clasificación del cáncer de mama**

Históricamente el CM ha sido dividido en subgrupos que ayudan a los médicos y pacientes en la toma de decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad. Desde el punto de vista histopatológico se clasifican en dos categorías principales, carcinomas in situ (entre el 15% al 30%) y el resto carcinomas infiltrantes (invasivos y más agresivos). De estos últimos aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales (tipo tubular-cribiforme, coloides, medulares o papilares) y el resto son lobulillares. Se ha observado que mujeres con determinados tipos de carcinomas invasivos (lobular, tubular, coloides, medulares o papilares) tienen una supervivencia a 30 años mayor al 60%, en comparación con menos del 20% en mujeres con carcinomas ductales infiltrantes. Desafortunadamente, estas histologías favorables son menos comunes que los carcinomas ductales invasivos, que carece de distintas características histológicas<sup>2</sup>.

El análisis del grado histológico combinado propuesto por Elston y Ellis- una modificación al sistema de Bloom y Richardson- ha demostrado su valor pronóstico en el carcinoma ductal infiltrante de mama<sup>13,14</sup>. El grado histológico se obtiene mediante la suma de la valoración de tres parámetros: formación tubular, atipia nuclear y número de mitosis. Los pacientes con lesiones de grado 1 tienen una tasa de supervivencia global luego de 5 años del 95% en promedio, comparado con el 75% en los que presentan lesiones de grado 2 y un 50% para grado 3. La desventaja de este análisis es su subjetividad y la variación interobservador que puede confundir y limitar su utilidad.

El sistema de estadificación TNM para CM es una parte fundamental del manejo inicial de la enfermedad. Para determinar el estadio patológico del tumor se analiza el tamaño del tumor (T), la extensión de la diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M). La tasa de supervivencia global de los pacientes a 5 años decrece progresivamente a medida que los pacientes son clasificados dentro de los estadios superiores, con un 80% de los pacientes en estadio IV que mueren a causa de su enfermedad<sup>15</sup>.

Por otro lado, los recientes avances en la investigación básica y la genómica han mejorado la comprensión de las bases biológicas del desarrollo y progresión tumoral. Como resultado, una variedad de marcadores moleculares tumorales caracterizados en el laboratorio se han estudiado en la clínica por su potencial para predecir el curso de la enfermedad o la respuesta a la terapia en pacientes con CM. Actualmente sólo un número pequeño de los marcadores moleculares investigados son utilizados en el análisis de rutina. Por ejemplo, la determinación del estatus del receptor de estrógeno/progesterona (ER/PR) es empleado para seleccionar los pacientes a recibir terapia hormonal, también se utiliza para predecir el riesgo de progresión de la enfermedad, ya que se ha observado que los tumores ER/PR negativos están a menudo asociados con una mayor agresividad de la enfermedad. El análisis del estatus de HER-2, analizando la amplificación del gen o la sobreexpresión de la proteína HER-2, es utilizado como factor pronóstico debido a que muchos estudios asocian la amplificación del gen o la sobreexpresión de la proteína HER-2 con una prognosis

adversa. Además, conocer el estatus de este receptor permite predecir la respuesta a la terapia con trastuzumab que tiene como blanco terapéutico dicho receptor<sup>15</sup>.

El uso de microarreglos de ADN complementario (ADNc) ha sido aplicado exitosamente para definir perfiles de expresión genómica de tumores de CM, lo cual ha resultado en una mejor clasificación a nivel molecular de la neoplasia y en la identificación de huellas génicas con potencial valor pronóstico<sup>16</sup>. Los cambios en la expresión de los genes identificados han sido aplicados en la predicción en la respuesta al tratamiento y han permitido mejorar los criterios clínicos para el manejo de las pacientes. Los microarreglos de ADNc permiten clasificar subtipos de cáncer de mama, que presentan perfiles de expresión génica específicos<sup>17</sup>. El grupo “luminal” se distingue por la expresión, relativamente alta, de muchos genes expresados en las células epiteliales de la luz de los conductos mamarios, incluido el receptor de estrógenos. Son tumores negativos a HER-2 y suelen tener la mejor tasa de supervivencia. El grupo “parecido al normal” se caracteriza por expresar un gran número de genes propios del epitelio mamario normal (negativos al receptor de estrógenos). El grupo ERBB2, expresa altos niveles de *erbb2*, así como de otros genes localizados en el amplicón *erbb2* (negativos al receptor de estrógenos). Estos tumores muestran una mejor respuesta a la quimioterapia y cerca de 50% responde al tratamiento con Trastuzumab. El grupo “basal” expresa genes característicos de las células basales de la mama, en particular queratinas 5 y 17, y son negativos al receptor de estrógenos y ERBB2, es decir, son triples negativos. Este subtipo tiene el pronóstico más sombrío<sup>17,18</sup>. Los reportes muestran que estos marcadores moleculares pueden ser de



gran utilidad para mejorar la detección, la clasificación, el diagnóstico temprano, y el pronóstico del cáncer de mama y pueden ser utilizados como nuevos blancos terapéuticos permitiendo mejorar el tratamiento y la sobrevida de las pacientes<sup>16,17</sup>.

### **1.3. Genética del cáncer de mama**

En un 80% de los casos de CMH se detectan mutaciones en los genes *brca1* y *brca2* (breast cancer 1 y 2), por lo que son los principales genes de susceptibilidad genética para el CM. El 20% restante posee mutaciones en genes como *p53* (causante del síndrome de Li-Fraumeni), en el gen *pten* que aumenta el riesgo de padecer CM en un 25- 50%, mutaciones en el gen *atm*, donde portadores de mutaciones causantes del síndrome Ataxia telangiectasia tienen un riesgo cuatro veces mayor que la población general de padecer CM. En los casos de CME, entre un 30%-40% de los casos se explican por la alteración de la expresión del gen *brca1*, ya sea por mecanismos epigenéticos como por alteración de las vías río arriba que reprimen la expresión del gen. También se han reportado mutaciones somáticas en genes como *p53*, *Rb*, *amt*, entre otros<sup>10</sup>.

La proteína BRCA1 está involucrada en la regulación de numerosas funciones celulares incluyendo la reparación del daño provocado al ADN, la transcripción de genes, segregación cromosómica, detención del ciclo celular y apoptosis<sup>12</sup>. BRCA1 y varios factores de reparación del ADN (MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, RAD50, MRE11, NBS1 y el FRC) forman un complejo llamado BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex) en el cual se ha sugerido que BRCA1 podría

proporcionar un andamio que coordina las múltiples actividades necesarias para el mantenimiento de la integridad genómica y la fidelidad de la replicación del ADN<sup>19</sup>. BRCA-2 (FANCD1) también está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, específicamente, en la reparación de las rupturas doble cadena del ADN (DSB) vía recombinación homóloga (RH), en el control del ciclo celular a través de la interacción con p53 y en la remodelación de la cromatina<sup>20</sup>.

#### **1.4. Tratamiento del cáncer de mama**

En el tratamiento del CM habitualmente se emplea una combinación de modalidades terapéuticas para conseguir un control eficaz de la enfermedad. Por lo general, se trata mediante cirugía y se combina con radioterapia, como rayos X, hormonoterapia si expresan receptor de estrógeno o progesterona; terapia biológica con un anticuerpo monoclonal si tiene amplificado el gen del receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico (Her-2); o quimioterapia<sup>21</sup>.

Uno de los compuestos quimioterapéuticos empleados es una sal de platino conocida como cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II, CDDP)<sup>10,22</sup>. El principal blanco del cisplatino es el ADN, ya que es capaz de formar enlaces covalentes con los sitios nucleofílicos de las guaninas y adeninas. El cisplatino es un agente bifuncional ya que puede formar enlaces intracadena e intercadena en las hebras del ADN, asimismo produce lesiones replicativas que generan como intermediarios DSB<sup>23</sup>. A nivel celular el tratamiento con cisplatino provoca la inhibición de la replicación y la transcripción así como el arresto del ciclo celular para poder reparar el ADN dañado y eventualmente la muerte celular por apoptosis<sup>24</sup>.

### **1.5. Mecanismos de reparación del daño al ADN inducido por cisplatino**

En la reparación de las lesiones provocadas en el ADN por el cisplatino 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 tramo de aproximadamente 23-30 bases donde se encuentra la lesión. La reparación por el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) es necesario para que el cisplatino sea tóxico. Esto ha sido explicado por el modelo de “ciclo de reparación inútil” en donde el sistema MMR elimina la base intacta recién incorporada en lugar de la base dañada, desencadenando sucesivas rondas de reparación inútil que resulta perjudicial para la célula. También cabe señalar que la reparación por MMR ocurre en las horquillas de replicación durante la síntesis del ADN y, por lo tanto, puede prevenir que se detecte el daño<sup>26</sup>. El colapso de la horquilla de replicación durante la síntesis del ADN se puede evitar traspasando las lesiones en un proceso llamado síntesis translesión (TLS). Este proceso se lleva a cabo por el cambio de las polimerasas  $\epsilon$  y  $\delta$ , que son responsables de la síntesis de la cadena conductora y rezagada, respectivamente, por polimerasas con distinta especificidad por sustratos, lo que les permitiría eludir diferentes tipos de daños en el ADN<sup>27</sup>.

Una vez que la horquilla de replicación colapsa, otras vías de reparación son necesarias para permitir la reanudación de replicación. El colapso de las horquillas de replicación es reconocido por los mecanismos de control del ciclo celular que, a su vez desencadenan el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN o la muerte celular<sup>26</sup>.

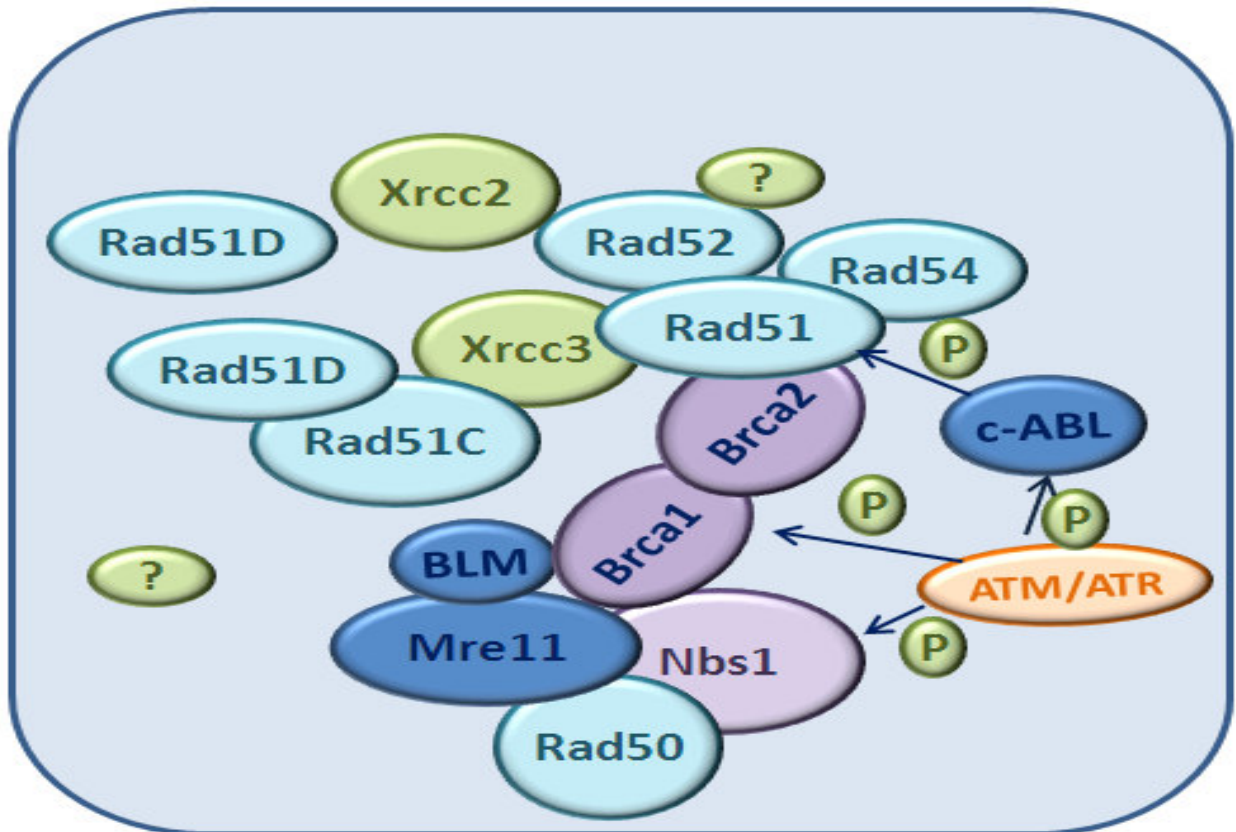
Aunque se sabe poco sobre la naturaleza de las lesiones replicativas, hay un creciente cuerpo de información relativa a sus vías de reparación. Se sabe que la RH tiene un papel central en la reparación de la mayoría de las lesiones replicativas formadas por medicamentos contra el cáncer<sup>27-32</sup>. Existen varias maneras por las cuales la RH es usada para reiniciar la replicación. La identidad de secuencias entre las dos moléculas de ADN recién sintetizadas puede ser usada para reiniciar la replicación detrás de la horquilla de replicación bloqueada. Además la recombinación puede ser usada para evitar las lesiones en el ADN en un proceso conocido como “cambio de molde” (template switching)<sup>33</sup>. Otras vías de reparación activas en las horquillas de replicación son: la vía de Fanconi (FA)<sup>34</sup>, la reparación mediada por endonucleasas, como MUS81, o la reparación mediada por RecQ, que involucra ADN helicasas conocidas como síndrome de Bloom (BLM), síndrome de Werner (WRN) y otros miembros de la familia de las helicasas Rec Q. Varias de las proteínas de estas vías han sido asociadas directamente con la RH o con la resolución de los productos de la cruz de Holliday<sup>26</sup>.

### **1.6. Mecanismo de recombinación homóloga**

La RH se considera un mecanismo preciso para la reparación de DSB durante las fases S/G2 del ciclo celular ya que emplea secuencias homólogas a los extremos rotos del ADN para reparar el daño (sean cromátidas hermanas, cromosomas homólogos o regiones con repetidos en el mismo o diferentes cromosomas). En el caso de que el molde empleado para reparar sea perfectamente homólogo la reparación puede ser 100% precisa, pero con la excepción de cromátidas hermanas, los moldes no son perfectamente homólogos y en estos casos se da una pérdida de

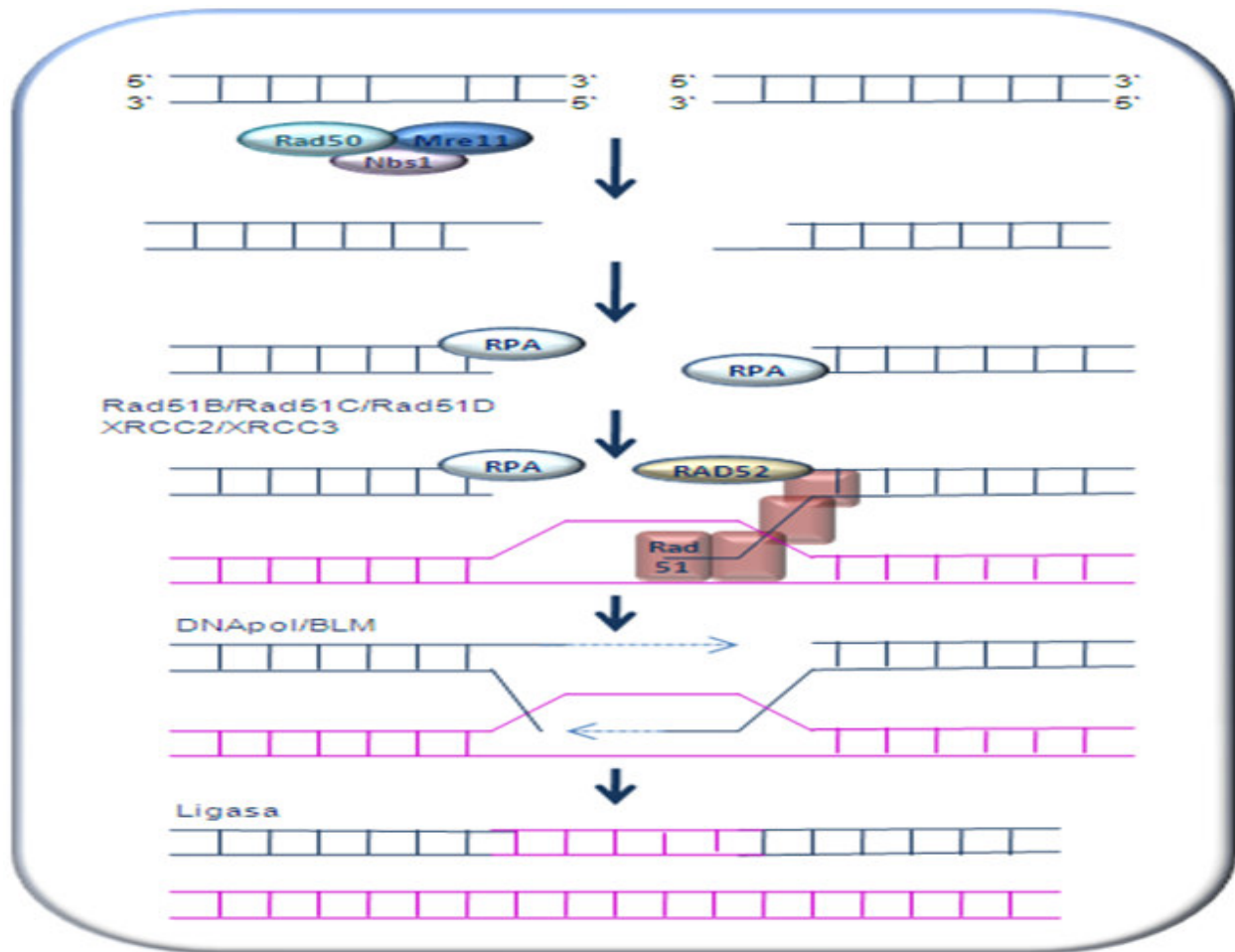
heterocigosidad<sup>35</sup>. La pérdida de heterocigosidad puede potencialmente inactivar genes supresores de tumor y subsecuentemente resultar en cáncer<sup>36</sup>.

Como se muestra en figura 2 la maquinaria de RH es compleja y los diferentes tipos de interacciones todavía no han sido definitivamente determinados. En las células eucariotas, el complejo MR formado por las proteínas MRE11 y RAD50 interactúa con un tercer polipéptido, conocido como Xrs2 en levaduras y en células de vertebrados como NBS1<sup>37</sup>. Un componente principal de la vía es la proteína RAD51 y sus parálogos (XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D). RAD51 es homóloga a la recombinasa Rec A de bacterias y a RAD51 de levaduras. En mamíferos la maquinaria de RH es más compleja, RAD51 interactúa con BRCA2 e indirectamente con BRCA1 y la inactivación de estas proteínas, hecho frecuente en CM, afecta la reparación por RH. Además, p53 interactúa con BRCA1, BRCA2 y RAD51, y reprime la RH de manera independiente del punto de control G1/S<sup>38</sup>. Otras proteínas que participan en la RH incluyen RPA, RAD52, RAD54, la helicasa BLM, etc.



**Fig.2. Proteínas que participan en el proceso de recombinación homóloga.**  
Adaptado de Fayza Daboussi. et al, 2002.

La RH inicia con un amplio procesamiento de los extremos rotos en dirección 5' a 3', que es regulado por el complejo MRN (MRE11, RAD50 y NBS1), Exo1, y al menos otra exonucleasa. Al extremo 3' simple cadena del ADN se une la proteína RPA, que es remplazada por RAD51 en una reacción mediada por RAD52 y los parálogos de RAD51. El filamento nucleoproteico resultante de Rad51 realiza la búsqueda e invasión de secuencias homólogas, un proceso facilitado por RAD54. La helicasa de ADN conocida como BLM participa en la disociación de RAD51 del ADN simple cadena, permitiendo el apareamiento de bases complementarias con la cadena molde. Posteriormente se da la extensión de la cadena por la ADN polimerasa. La cadena extendida puede disociarse e hibridar con el extremo procesado de la hebra no invasora del lado opuesto del DBS en un proceso llamado hibridación de cadena dependiente de síntesis (synthesis-dependent strand annealing, SDSA) o ambos extremos pueden invadir formándose la doble cruz de Holliday, que puede ser resuelta por la proteína BLM, para generar hebras no-recombinantes o recombinantes. Una vez que los productos intermediarios son resueltos, los huecos y rupturas del ADN simple cadena son reparados por la ADN polimerasa y la ADN ligasa<sup>35, 39</sup>. Ver fig. 3.



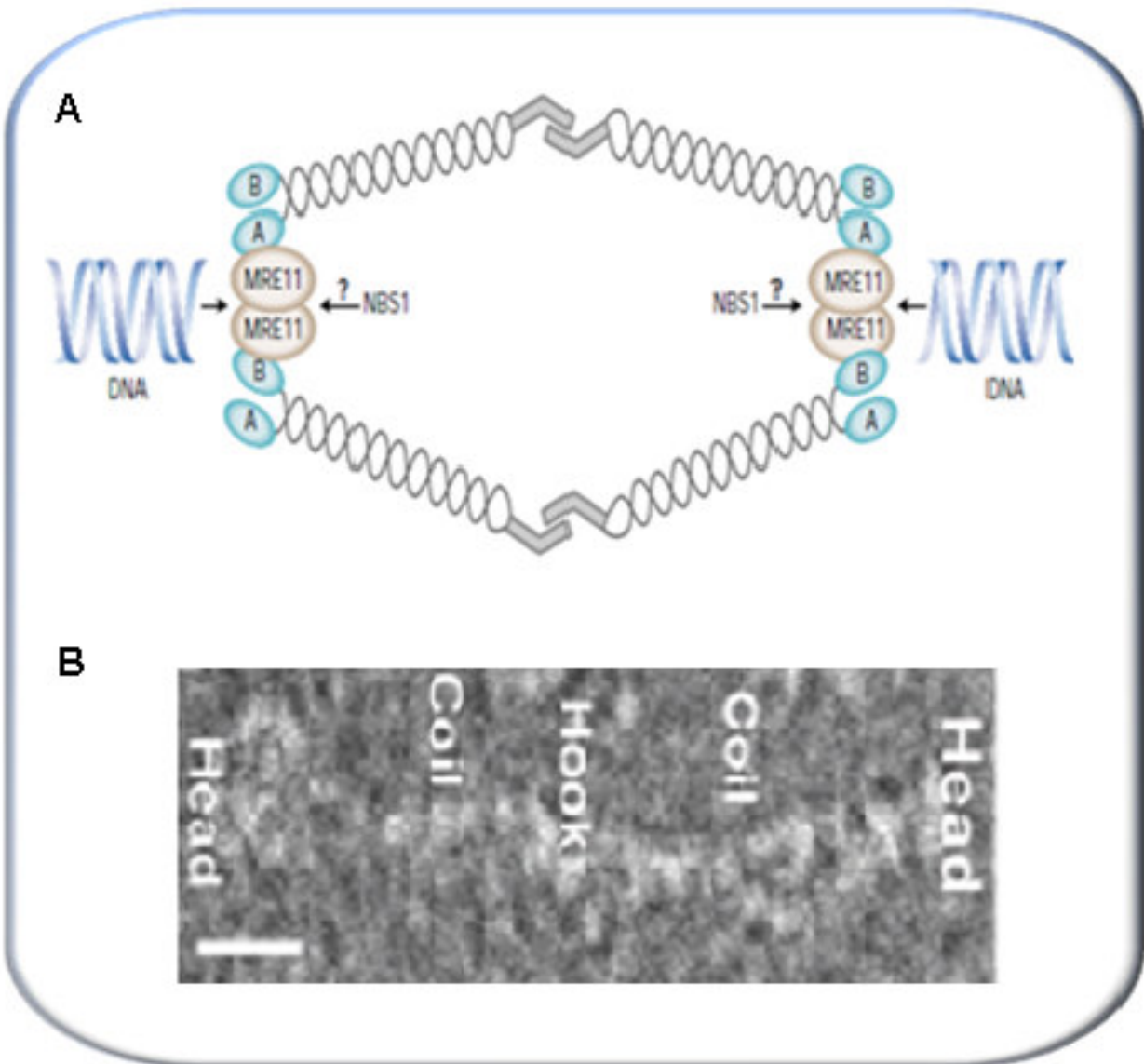
**Fig.3. Mecanismo de recombinación homóloga.** Adaptado de Fayza Daboussi. et al., 2002.



## **2. ESTADO DEL ARTE**

### **2.1. El complejo MRN**

El complejo MRN formado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 participa en la reparación de DSB, consideradas lesiones críticas que pueden causar la muerte celular o una gran variedad de alteraciones genéticas incluyendo grandes y pequeñas deleciones, pérdida de heterocigosidad, translocaciones, y pérdidas cromosómicas<sup>35</sup>. Se ha propuesto que este complejo es un actor central en respuesta al daño por DSB, incluyendo la RH, la recombinación no homóloga (non-homologous end joining), el mantenimiento del telómero y la activación de puntos de control del ciclo celular. Varias de estas funciones se explican por las inusuales actividades enzimáticas y la estructura macromolecular del complejo<sup>40</sup>. La proteína MRE11 posee actividad exonucleasa con capacidad de procesar extremos heterogéneos y largas colas de dobles hélices en el ADN. La exonucleasa MRE11 se une directamente a NBS1, al ADN, y a RAD50. RAD50 es una proteína relacionada con las proteínas de mantenimiento de la estructura de los cromosomas (SMC), la cual emplea sus dominios ATPasa ABC, hook Zn y doble alfa hélice para actuar como puente en la unión de rupturas doble cadena y facilitar el procesamiento de los extremos del ADN por MRE11. NBS 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<sup>41</sup> (ver fig. 4).



**Fig.4. Arquitectura del complejo MRN y su interacción con la ruptura doble cadena del ADN.** A) Esquema del complejo MRN, tomado de Van den Bosch et. al, 2003, B) Micrografía electrónica tenida en negativo en la que se muestra el complejo MR octamérico, tomada de R. Scott Williams et. al, 2007; Barra escala=100Å; 1Å= 0.1nm.

Mutaciones hipomórficas en el gen *mre11* causan un desorden similar a ataxia telangiectasia (ATLD) y mutaciones hipomórficas en el gen *nbs1* y en el gen *rad50* causan, el síndrome de Nijmegen breakage (NBS). Ambos desordenes son fenotípicamente relacionados al síndrome de ataxia telangiectasia (AT), causado por mutaciones en el gen *atm* y donde los pacientes presentan degeneración cerebelar que conduce a una severa disfunción motora, inmunodeficiencia, atrofia tímica y gonadal y predisposición a cáncer. Las células derivadas de pacientes con AT son extremadamente hipersensibles a agentes causantes de rupturas doble cadena, y se caracterizan por inestabilidad cromosómica y síntesis de ADN radioresistente (RDS), que es indicativo de la incapacidad para inducir eficazmente el punto de control intra-fase S. El que pacientes con ATLD y NBS presenten fenotipos similares a nivel celular y del organismo indica 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<sup>37,41</sup>.

La cinasa ATM es reclutada a sitios de DSB y dirige la respuesta al daño a través de la fosforilación de sustratos requeridos para la activación de los puntos de control del ciclo celular G1/S, intra-S y G2/M, la respuesta transcripcional, la inducción de la reparación del ADN dañado ó en caso de que la reparación no se haya completado inducir la muerte de la célula por apoptosis<sup>40</sup>. Como hemos mencionado, NBS1 interacciona con ATM y se ha establecido que ATM fosforila NBS1 en respuesta a DSB (principalmente en las Ser 278 y Ser 343), un evento que se requiere para la activación del punto de control en fase S<sup>42,43</sup>. Posteriormente se demostró que la

autoactivación de ATM y la fosforilación de sustratos río abajo es dependiente del complejo MRN<sup>44-47</sup>. Asimismo, el complejo MRN juega un papel central en la reparación de DSB cuando se bloquean las horquillas de replicación y cuando se reparan lesiones voluminosas. Se ha reportado que MRN es capaz de facilitar la activación de la proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y RAD3 (ATR) y también se requiere para que ATR fosforile sustratos río abajo, como la proteína de replicación 2 (RPA2), evento necesario para la activación del punto de control en fase S del ciclo celular<sup>40,48,49</sup>

### **3. ANTECEDENTES PARTICULARES**

#### **3.1. MRN y cáncer**

Recientemente se han publicado diversos estudios de asociación en diferentes poblaciones indicando que la presencia de mutaciones en los genes que componen el complejo MRN, aumentan la susceptibilidad a padecer CM. En una población del Norte de Finlandia se encontró asociación entre CMH y la presencia de tres mutaciones RAD50 687delT (OR 4.3 ,1.5–12.5), RAD50 IVS3-1G>A y NBS1 Leu150Phe. No observándose relación entre la tumorigénesis y la pérdida de alelos silvestres en los portadores pero sí detectaron un incremento de rearrreglos cromosómicos. Por lo que sugieren un efecto de la haploinsuficiencia de RAD50 y NBS1 sobre la integridad genómica y la susceptibilidad al cáncer<sup>50</sup>. Otro reporte que igualmente analiza las variaciones en el gen *rad50* en pacientes con CMH sugiere que mutaciones en dicho gen pueden conferir un muy pequeño riesgo en mujeres de Reino Unido y Finlandia. Habiéndose detectado una mutación que trunca la proteína (Q350X) y la delección

687delT<sup>51</sup>. Un tercer estudio realizado en mujeres blancas jóvenes de origen no hispano, en Estados Unidos, reporta que polimorfismos en el gen *nbs1* pueden contribuir a la etiología del CME (NBS1,924 CC: OR 4.55, 1.51–13.7; NBS1 8360CG: OR 1.83, 1.14–2.94)<sup>52</sup>. En una investigación realizada en mujeres taiwanesas con carcinoma ductal infiltrante se analizaron polimorfismos en los tres genes que forman el complejo MRN y observaron que un polimorfismo en el gen *nbs1* se asocia significativamente con el riesgo a padecer CM y existe una tendencia a desarrollar CM en mujeres que portan un mayor número de genotipos en los genes MRN de alto riesgo (con un odds ratio ajustado de 1,25 para cada genotipo putativo de alto riesgo, intervalo de confianza 95%, 1,10-1,44)<sup>53</sup>. En un trabajo realizado con pacientes con CM primario se detectó la presencia de alteraciones en el gen *mre11* en muestras del tejido mamario de las pacientes y no así en tejido normal. Se describieron dos mutaciones sin sentido (Mre11 A310T, S104C y G1508A R503H), además de un transcrito aberrante sin mutación en el genoma por cual sugieren que alteraciones en MRE11 tienen un papel ocasional en el desarrollo de tumores primarios<sup>54</sup>.

En estudios actuales se ha evaluado, por inmunohistoquímica, la expresión de las proteínas MRE11, RAD50 Y NBS1 en muestras de pacientes con CM comparando los resultados con el tejido mamario normal. En el estudio publicado por Karin Söderlund et. al. en el 2007 se analizó la expresión de las tres proteínas del complejo en pacientes con CM temprano observándose que la intensidad de la tinción de MRE11, RAD50, y NBS1 se redujo en una gran proporción de los tumores, lo que podría indicar que la represión o pérdida de estas proteínas de reparación del ADN es

un evento común en el CM<sup>55</sup>. En el 2009 Barkova et. al. analizaron la expresión en 1000 pacientes con CM, la intensidad de la tinción de MRE11, RAD50, y NBS1 se redujo en pacientes con CM en un 7%, 3% y 10% respectivamente. Estas alteraciones fueron encontrados más frecuentemente entre los tumores ER/PR//Her2 triple negativos, de alto grado tumoral y entre casos familiares en comparación con los esporádicos<sup>56</sup>.

Los genes *mre11*, *rad50* y *nbs1* son esenciales en vertebrados y el trabajo experimental con estos es limitado. Los experimentos que se han realizado usualmente emplean células de pacientes que presentan mutaciones hipomórficas en el gen *mre11* (ATLD), *nbs1* (NBS) y recientemente se han reportado dos mutaciones germinales de *rad50* (NBS)<sup>57</sup>. En modelos de ratón el análisis de las funciones del complejo se ha visto impedida por el fenotipo letal que desarrollan los mutantes nulos de *mre11*, *rad50* y *nbs1*. Se han caracterizado ratones portadores de alelos de RAD50 y mutaciones que mimetizan las identificadas en pacientes humanos con NBS y ATLD<sup>58</sup>. Por otro lado, se han generado líneas celulares humanas en las cuales se ha silenciado alguno de sus componentes para estudiar diversas funciones del complejo. Dentro de las líneas celulares utilizadas se encuentran las de osteosarcoma epitelial, glioblastoma, carcinoma de pulmón, cáncer cérvico-uterino y fibrosarcoma<sup>59-66</sup>.

Varios de los trabajos mencionados han silenciado por separado los tres genes del complejo MRN, observándose que al reducir los niveles de RAD50, por silenciamiento, se produce un descenso de los niveles de proteína de MRE11 y NBS1. El silenciamiento génico de *mre11* induce una severa disminución de los niveles

proteicos de los otros dos componentes el complejo MRN (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 las cercanías de DSBs. La pérdida de RAD50 o MRE11 desencadenan la desestabilización de todo el complejo MRN y la desaparición de los otros componentes<sup>60,62,65</sup>.

### **3.2. Inhibición de las vías de reparación en cáncer**

Las vías de reparación del ADN pueden permitir que las células tumorales sobrevivan al daño inducido en las moléculas de ADN por tratamientos quimioterápicos, por lo que, inhibidores específicos de vías de reparación del ADN podrían resultar eficaces cuando se utilizan en combinación con fármacos quimioterápicos que dañan el ADN. Además, alteraciones de las vías de reparación del ADN 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 ADN. Existen evidencias de que fármacos inhibidores de una de estas vías en estos tumores pueden ser útil como agente terapéutico único, con la ventaja potencial de que este enfoque podría ser selectivo de las células tumorales y con menos efectos secundarios<sup>26,67</sup>.

En el tratamiento con el agente quimioterapéutico cisplatino la resistencia a la reparación de los enlaces cruzados del ADN es una limitación importante para el éxito en el tratamiento de varios tumores sólidos<sup>68</sup>. 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 cisplatino<sup>69</sup>. Recientemente se ha demostrado la utilidad de la vía de anemia de Fanconi (FA) como blanco para terapia génica con el objetivo de sensibilizar células tumorales con cisplatino. Xenotransplantes tumorales derivados de linfoblastos con o sin FA fueron tratados con cisplatino y la respuesta tumoral fue significativamente mayor en los tumores con FA. Observándose que la generación de un vector adenoviral que codifica una forma mutante negativa de FANCA, que interfiere la interacción de FANCA con FANCG, resulta en la disrupción de la vía de FA y fue asociada con un incremento en la sensibilidad a cisplatino<sup>70</sup>. Se ha reportado sinergia entre el cisplatino y gemcitabina, análogos de nucleósidos, en líneas celulares de ovario resistentes y sensibles al cisplatino. Este sinergismo puede deberse a que la gemcitabina media la inhibición de la reparación de los aductos intracadena y enlaces cruzados intercadena<sup>71</sup>. Un patrón similar se observó en líneas celulares ovario de hámster chino deficientes en proteínas de reparación del ADN. La administración de cisplatino seguida de gemcitabina es sinérgica en las células deficientes en la vía de RH<sup>68</sup>. Por otra parte, inhibidores de la proteína RPA heterotrimérica han sido desarrolladas para potenciar la toxicidad del cisplatino<sup>73</sup>.

Una aproximación alternativa para modular la actividad reparadora del ADN y potencialmente mejorar el índice terapéutico es interferir con la señalización de los puntos de control del ciclo celular. XL844 (EXEL -9844) es una pequeña molécula inhibidora de las serin/treonin cinasas, CHK1 y CHK2. Esta droga causa inhibición del arresto del ciclo celular, daño celular progresivo, inhibición de la reparación del ADN y,



finalmente, la muerte celular por apoptosis de las células tumorales crecidas *in vitro*, aunque el resultado de la inhibición de CHK1 y CHK2 en general puede variar dependiendo del tipo celular. Si bien se han suscitado preocupaciones sobre la toxicidad potencial para las células normales de este enfoque, los datos preclínicos han sugerido que la dosificación intermitente con XL844 en combinación gemcitabina es bien tolerada por ratones desnudos usados como modelo de xenotransplante<sup>74</sup>. XL844 está actualmente a prueba en ensayos clínicos (NCT00475917) en combinación con gemcitabina, que causa normalmente arresto del ciclo celular y apoptosis por su incorporación en el ADN<sup>75</sup>. También se están evaluando inhibidores de las cinasas ATM y ATR, centrales para la respuesta celular a DSBs. El inhibidor de la actividad cinasa de ATM, KU55933 (AstraZeneca), está actualmente en desarrollo preclínico. La razón detrás del uso clínico de los inhibidores de ATM depende de la premisa de que la inhibición de ATM debe mejorar el índice terapéutico de hipersensibilización de las células tumorales a los agentes que causan DSBs. Una vez más, la viabilidad de la inhibición de la cinasa ATM en los pacientes dependerá del grado de toxicidad que estos agentes causan en los tejidos normales cuando se utilizan en combinación con radiaciones ionizantes o la quimioterapia citotóxica<sup>26</sup>.

Recientemente, se ha reportado que el compuesto 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (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, aunque no se

detectó la degradación del complejo MRN. 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 correcto funcionamiento del complejo MRN<sup>76</sup>. Otra estrategia que emplea el bloqueo de la actividad del complejo MRN se ha reportado para potenciar el tratamiento con cisplatino en células tumorales escamosas de cabeza y cuello. En este estudio, se construyó un adenovirus que expresa una mutante negativa de la proteína 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 cisplatino. El incremento en DSBs se corresponde 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<sup>77</sup>.

#### **4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA**

El CM es un problema de salud a nivel mundial, incluyendo a México, por lo que determinar el nivel de expresión de MRE11 y RAD50 en pacientes con CM nos permitirá analizar si la disminución o pérdida de la expresión de dichas proteínas es una característica significativa de algunos tipos de CM. Por otro lado, estudiar los mecanismos moleculares que puedan estar implicados en la respuesta a fármacos anticancerígenos contribuirá a entender la diversidad de respuestas frente a un tratamiento y decidir qué tipo de terapia se puede aplicar a casos particulares, así como, podría sugerir nuevos blancos terapéuticos.

## I. HIPÓTESIS

Al silenciar la expresión del gen *mre11* se interrumpirá la función del complejo MRN ocasionando que se potencie el daño inducido por el cisplatino. Esto podría aumentar la sensibilidad al tratamiento con cisplatino.

## II. OBJETIVOS

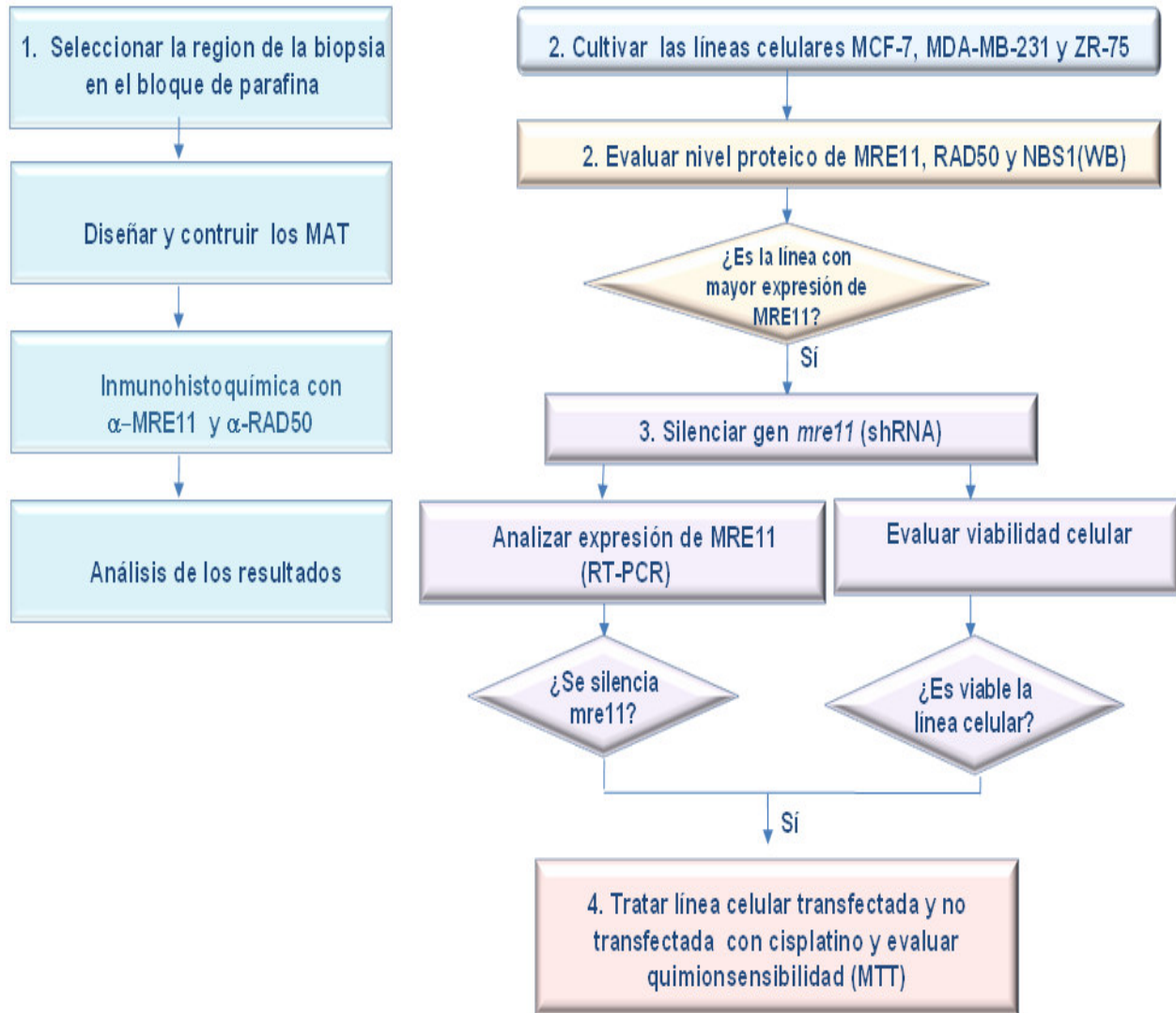
### 1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de MRE11 y RAD50 en biopsias de pacientes con CM y evaluar el efecto de silenciar la expresión del gen *mre11* en una línea celular de CM tratada con cisplatino.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar la expresión de las proteínas MRE11 y RAD50 en biopsias de pacientes con CM.
- 2) Analizar la expresión de las proteínas MRE11, NBS1 y RAD50 en las líneas celulares MCF-7, ZR-75-1 y MDA-MB-231.
- 3) Silenciar la expresión del gen *mre11* en una de las líneas celulares.
- 4) Evaluar la sensibilidad al tratamiento con cisplatino al silenciar el gen *mre11* en una línea celular de CM

#### IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **V. METODOLOGÍA**

### **1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MRE11 Y RAD50 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CM MEDIANTE EL USO DE MICROARREGLOS DE TEJIDOS**

Las biopsias se obtuvieron de pacientes con CM de la Fundación Mexicana de Fomento para la Prevención Oportuna del Cáncer de Mama, A.C. (FUCAM) o del Hospital General y fueron procesadas en la Unidad de Validación de Biomarcadores del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El ensayo se realizó por inmunohistoquímica en microarreglos de tejidos, para ello se seleccionó una región representativa del tumor en los bloques de parafina observando cortes teñidos con hematoxilina eosina (HE).

#### **1.1. Preparación de cortes histológicos y tinción con HE**

Se realizan los cortes histológicos de 0.3 micras de espesor a partir de los bloques de parafina empleando para ello un micrótopo (Leica RM 2125 RT), luego se desparafinaron las muestras incubándolas verticalmente a 60 °C durante aproximadamente 30 min, a continuación se rehidrataron los tejidos sumergiéndolos en xilol durante 10 min a 60 °C, en etanol 100% durante 5 min a TA, en etanol 69% durante 5 min y finalmente, en agua destilada durante 5 min.

Posteriormente se tiñeron los tejidos con hematoxilina-eosina durante unos segundos, luego se lavaron las laminillas con agua corriente y se quitó el exceso de HE pasando las laminillas por alcohol ácido durante unos segundos. A continuación se lavó

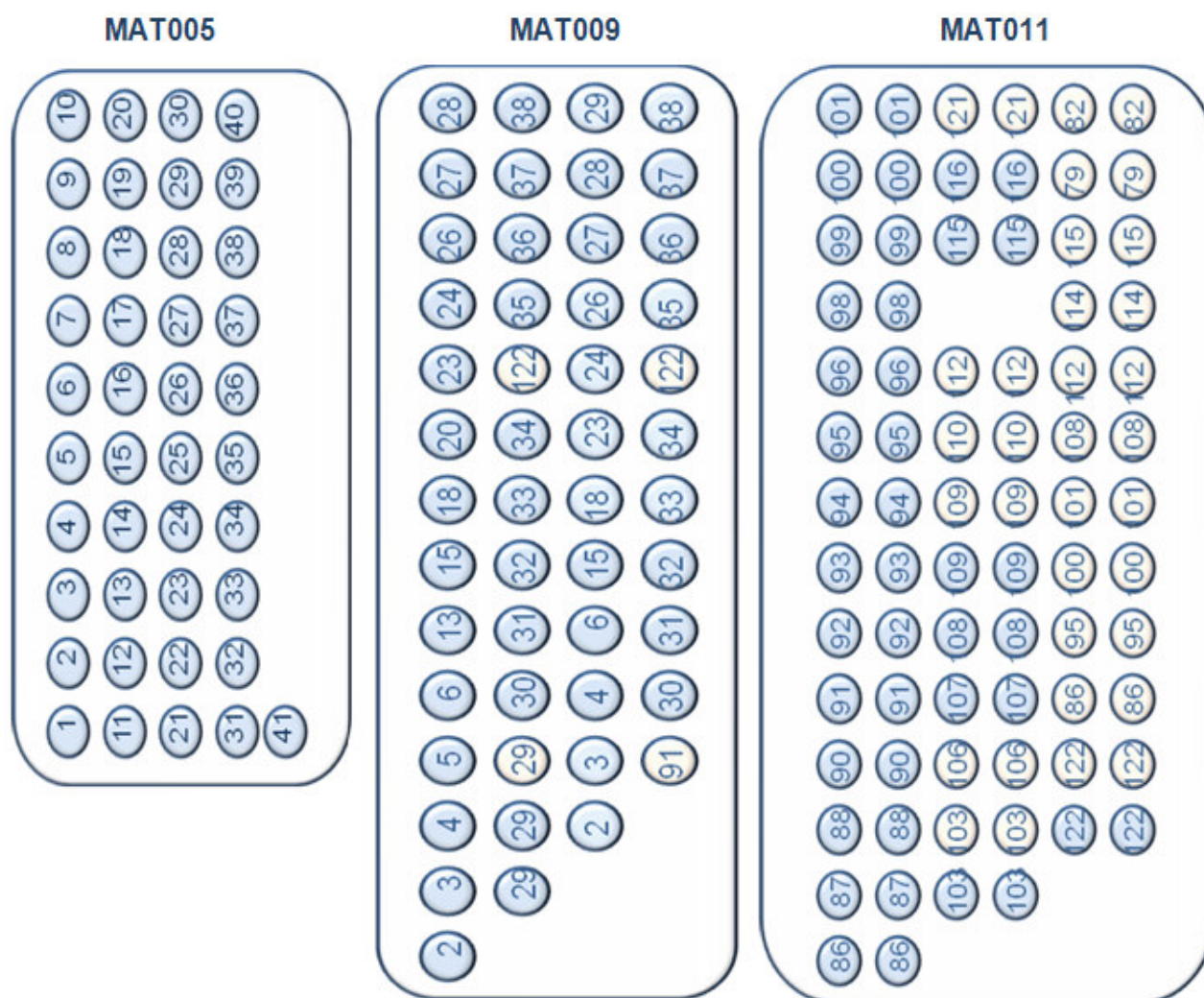
nuevamente con agua corriente y se restauró el pH de los tejidos con agua amoniacal durante 2-4 seg. Se volvió a lavar con agua corriente y se sumergieron las laminillas en alcohol al 50%. Para luego teñir con eosina durante 2-3 seg. Se enjuagó y comenzó la deshidratación del tejido sumergiendo las laminillas en etanol al 96% durante 5 min, luego en etanol 100% durante 5 min y xilol durante 10 min. Finalmente se montó el cubreobjeto a la laminillas empleando reactivo de Permont.

## **1.2. Diseño y construcción de los microarreglos**

Se diseñaron y construyeron microarreglos de las 104 muestras. La construcción se realizó empleando el Tissue Arrayer, ATA-100, Chemicon, con aguja de 1 mm y cada muestra se colocó por duplicado cuando fue posible. En la figura 6 se muestra un esquema del diseño de cada microarreglo.

## **1.3. Prueba del Ac anti-MRE11 (Cellsignaling) por Western blot**

Para probar la especificidad del Ac anti-MRE11 (Cellsignaling, cat #4847) se realizó un western blot como se describe en el inciso 3.5, empleando para dicho ensayo 100 µg de extracto total de la línea celular MDA-MB-231.



**Fig.5. Esquema del diseño de los microarreglos de tejidos MAT005, MAT009 y MAT011.** El microarreglo MAT005 fue construido con muestras procedentes del Hospital General y los microarreglos MAT009 y MAT011 con muestras de pacientes del FUCAM.

#### **1.4 Inmunohistoquímicas**

Se realizaron cortes de los microarreglos con un espesor de 0.3 micras, se montaron en portaobjetos tratados para IHQ (Dako, Cytomation silanized slides), se desparafinaron las muestras primero incubándolas verticalmente a 60 °C durante aprox. 30 min, luego para rehidratarlas se sumergieron en xilol durante 10 min a 60 °C, en etanol 100% durante 5 min a TA, en etanol 69% durante 5 min y finalmente en agua destilada durante 5 min. Posteriormente para desenmascarar el antígeno se sumergieron las muestras en solución de citrato de sodio 0.01M pH 6.0 a 95 °C durante 40 min. A continuación se dejaron enfriar y se pusieron a 4 °C durante 10 min. Para comenzar la tinción primero se lavaron las laminillas en agua destilada, luego en buffer de lavado (PBS 1x pH 7.2) durante 10 min dos veces. A continuación con un lápiz de cera se delimitó la región de la laminilla a utilizar, posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las muestras con unas gotas de solución de peróxido de hidrogeno 3% durante 30 min a TA en cámara húmeda. A continuación se lavó con buffer de lavado durante 5 min y luego con PBS 1x-Tritón 1% durante 10 min a TA. Posteriormente se bloqueó empleando albúmina 1% en PBS durante 1 h a TA. Se removió la albúmina y se agregó el Ac primario diluido en albúmina 1%. Se incubó toda la noche a 4 °C en cámara húmeda y al otro día se lavó 4 veces con buffer de lavado. Se incubó con tres gotas del Ac secundario universal (Detection System, Starr Trek, HRP universal kit, 25 ml) durante 15 min a. Luego se lavó dos veces con buffer de lavado y a continuación se agregó Trek Avidin-HRP durante 10 min a TA.



Posteriormente se lavó dos veces con buffer de lavado, se reveló agregando DAB (unos 30 seg máximo) y se detuvo la reacción lavando con agua destilada.

### **1.5 Contratación con Hematoxilina de Mayer y montaje**

Para contrateñir las muestras se sumergieron las laminillas en hematoxilina de Mayer (unos 30 seg), se lavó con agua y se incubó en agua amoniacal durante 5 min, luego se volvió a lavar con agua y a continuación se sumergió en etanol al 96% durante 5 min, luego en etanol 100% durante 5 min y xilol durante 10 min. Finalmente se montó el cubreobjeto a la laminillas empleando reactivo de Permont.

### **1.6 Procesamiento y análisis de los resultados de las inmunohistoquímicas**

Para realizar el análisis de los resultados de las inmunohistoquímicas se tomaron fotografías utilizando el microdisector Veritas, Arcturus. Se analizó la calidad de las muestras empleando un aumento de 10 x y se clasificaron las muestras en cuatro categorías, muy buena, buena, regular y mala, dependiendo de la proporción de tejido epitelial presente. En los casos en los cuales la calidad se consideró adecuada (muestras muy buenas, buenas y regulares) se tomaron fotografías a 40x para determinar el nivel de expresión de cada proteína a analizar. La expresión de cada proteína fue evaluada utilizando un sistema en el cual la intensidad de la tinción nuclear fue clasificada como nula, baja, moderada y alta.

## **2. MANTENCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CM**

### **2.1 Condiciones de cultivo de las líneas celulares**

Las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1 se cultivaron en medio Gluta-MAX-I, DMEM, alto en glucosa y glutamina (Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (Invitrogen), penicilina y estreptomycin (PISt). Se incubaron con aire, a 37 °C y con 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2 Subcultivo de líneas celulares**

Para subcultivar las células se removió el medio de cultivo y se lavaron las células con Buffer Fosfato Salino (PBS) 1x 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 e incubó 5 min. En paralelo se agregó medio de cultivo fresco a un frasco nuevo y se rotuló apuntando nombre de línea celular, número de pasaje, día y responsable. Una vez transcurridos los 5 min de incubación con tripsina se visualizó en microscopio para observar si se habían despegado las células y se dio un pequeño golpe. 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 centrifugó a 1200 rpm por 5 min a 4 °C. Luego se quitó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo fresco, para a continuación agregarlas al frasco con medio nuevo.

### **2.3 Congelamiento de líneas celulares**

En general por criotubo se emplearon aproximadamente  $2 \times 10^6$  células que se procesan 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 ul de SFB, 400 ul de medio de cultivo completo y 100 ul de DMSO). A continuación se cerró herméticamente el criotubo y se colocó en hielo durante aproximadamente 10 min, para guardar los tubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

### **2.4 Descongelamiento de las líneas celulares**

Se retiró el criotubo del Revco, se limpió con benzal y rápidamente se colocó en baño a  $37^{\circ}\text{C}$ , una vez que el medio se descongeló, se pasó a un tubo falcón y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se descartó el medio de congelamiento y se resuspendieron las células en medio fresco previamente templado a  $37^{\circ}\text{C}$ .

## **3. ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE MRE11, NBS1 Y RAD50 EN LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7, ZR-75-1 Y MDA-MB-231 MEDIANTE WESTERN BLOT**

### **3.1 Preparación de extractos proteicos**

Para preparar extractos proteicos totales se lavaron tres veces los cultivos celulares con PBS 1x frío, luego se incubó 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 (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min en

agitación. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

Para obtener los extractos nucleares y citoplasmáticos se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 min y posteriormente se eliminó el sobrenadante. A continuación se resuspendió la pastilla en 1 ml PBS y se transfirió a un eppendorf de 1.5 ml. Luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 seg y se desechó el PBS. Se resuspendió la pastilla en 400 ul de Buffer A frío (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT y 0.5 mM PMSF), se pipeteó suavemente hasta homogenizar y se incubó a 4 °C durante 15 min. Posteriormente se adicionaron 25 ul de buffer B (Nonidet NP40 solución al 10%, 20 ul Complete 4x y 1 ul E64) y se agitó vigorosamente por 10 seg. Luego se centrifugó el homogenizado 30 seg a 14.000 rpm y se transfirió el sobrenadante (con ARN y proteínas citoplasmáticas) a un nuevo tubo. El precipitado nuclear se resuspendió en 50 ul de buffer C frío (20 mM Hepes, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 10 ul de cóctel de inhibidores Roche y 1 ul E64) y se agitó vigorosamente a 4 °C durante 15 min. A continuación se centrifugó el extracto nuclear a 14.000 rpm durante 5 min a 4 °C y se recuperó sobrenadante.

### **3.2 Determinación de la concentración de proteínas**

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos proteicos se empleó el método de Bradford<sup>78</sup>. La curva patrón se construyó utilizando una solución de BSA a una concentración de 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 utilizada fue:  $y = m x + b$ , donde y es la absorbancia 595 nm, m es la pendiente, x es la concentración de proteínas y b es la ordenada al origen.

### **3.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes**

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizaron a una concentración de acrilamida del 12 % ó 10% 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.

### **3.4 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD). Para esto, los geles, las membranas, papeles whatman y esponjas se incubarán 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 a 400 mA durante 1 h en hielo ó a 40 mA durante toda la noche. Finalmente se confirmó la transferencia de proteínas a la membrana por tinción con rojo Ponceu, se lavó la membrana y se realizaron los ensayos de inmunodetección por western blot.

### **3.5 Ensayos de Western blot**

La membrana con las proteínas transferidas se incubaron en solución bloqueadora durante 1 h a temperatura ambiente (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 agregó el anticuerpo primario diluido en PBS 1x-Tween20 0.05%, ver tabla 1, y se incubó durante 1 h a TA ó toda la noche a 4 °C, en agitación. Luego las membranas se lavaron tres veces en PBS 1x -Tween20 al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido en PBS 1x-tween 20 0.05% incubándose durante 1 h a TA en agitación.

Por ultimo las membranas se lavaron tres veces con PBS 1x y se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amhersham Pharmacia Biotech, USA), incubando la membrana durante 1 min. Para detectar las proteínas las membranas fueron expuestas a placas autoradiográficas y la señal se visualizó al revelar la placa con solución reveladora. Para el análisis densitométrico se utilizó el programa ImageJ 1.41, (<http://www.lukemiller.org>).

Tabla 1. Características de los anticuerpos empleados para inmunodetección.

| Proteína         | Anticuerpo 1º                                                                                                           | Anticuerpo 2º     | TM (KDa) |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|
| MRE11            | MRE11 (H-300): sc-22767; poAc, Santa Cruz                                                                               | Anti- rabbit -HRP | 80.6     |
| MRE11            | MRE11(31H4): 4847; moAc, Cellsignaling                                                                                  | Anti- rabbit -HRP | 80.6     |
| RAD50            | Rad50 (13B3/2C6): sc-56209; moAc, Santa Cruz                                                                            | Anti- mouse-HRP   | 153.9    |
| NBS1             | Nibrin C-19): sc-8580; poAc; Santa Cruz                                                                                 | Anti- goat -HRP   | 85.0     |
| Actina           | Actin (C-2): sc-8432; moAc,Santa Cruz                                                                                   | Anti- mouse-HRP   | 41.8     |
| Control negativo | Glucosa oxidasa de <i>Aspergillus niger</i> , enzima no presente ni inducible en tejidos de los mamíferos; X 0944; Dako |                   |          |

#### **4. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *mre11* MEDIANTE INTERFERENCIA DEL ARN**

Se utilizó un método de silenciamiento que emplea una construcción plasmídica para expresar el transcrito que forma una estructura de horquilla (short hairpin RNA), conocida como shRNA. El shRNA es procesado por la célula y tiene como blanco un ARNm de secuencia complementaria que es degradado a través del proceso celular denominado interferencia del ARN (RNAi)<sup>79</sup>. Usando estos vectores de expresión de siRNA se puede reducir la expresión de genes blancos por semanas e incluso meses<sup>80</sup>.

##### **4.1 Elección de secuencia blanco**

Se trabajó con dos secuencias blanco ubicadas en diferentes regiones del gen *mre11* y utilizadas previamente por Weihang Chai et. al.<sup>61</sup> y Haruyuki Takemura et.al.<sup>62</sup> (tabla 2). Una vez diseñados los oligonucleótidos para formar el inserto se clonaron en el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion) (fig. 5).

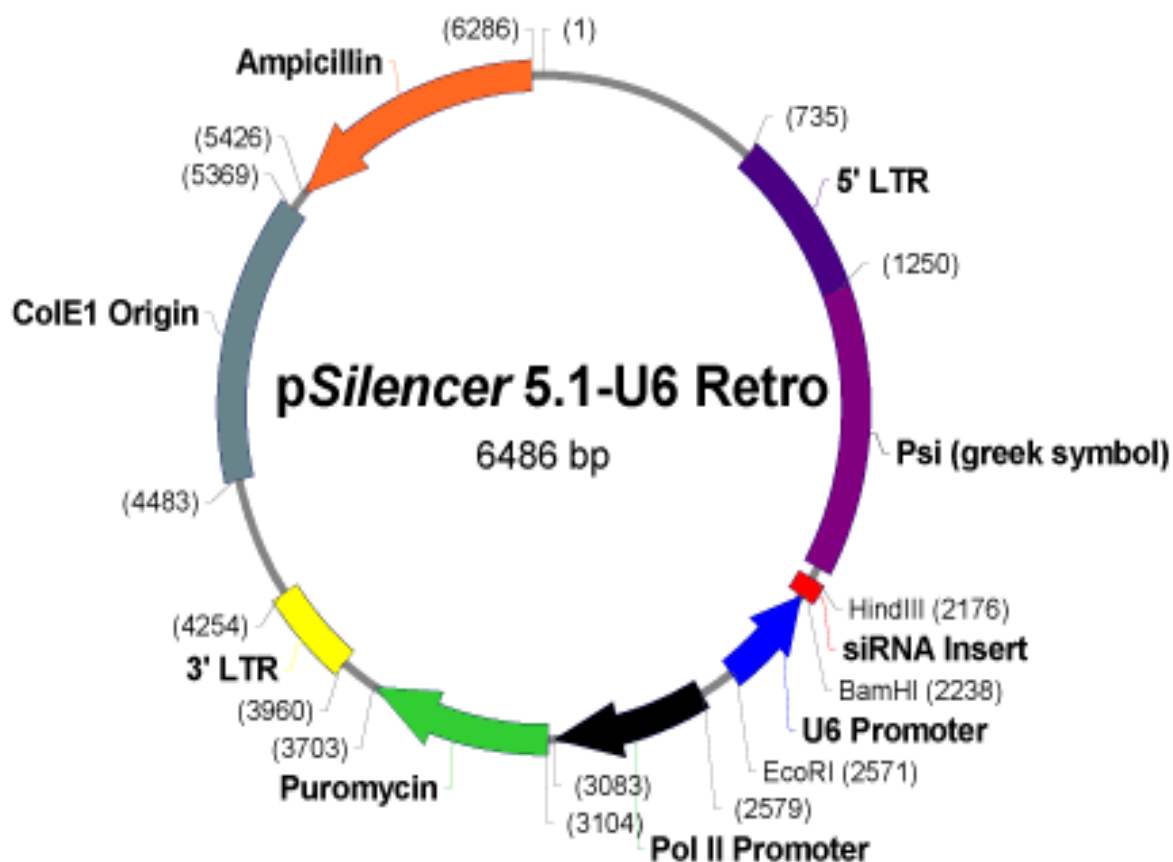
##### **4.2 Hibridación de oligonucleótidos**

Se hibridaron volúmenes iguales (2 ul) de cada uno de los oligonucleótidos, sentido y antisentido, (1 µg /µl) en solución de hibridación (Ambion). Se incubó a 90 °C durante 3 min para asegurar que los oligonucleótidos no se plieguen 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 almacenaron a -20 °C hasta la ligación.



**Tabla 2. Características de las secuencias blanco para silenciar gen *mre11*.**

| Nombre     | Secuencia blanco en el ARNm | Posición en el ARNm | Tamaño (pb) |
|------------|-----------------------------|---------------------|-------------|
| Mre11sh1.1 | GATGAGAACTCTTGGTTTAAC       | 1409-1428           | 21          |
| Mre11sh1.2 | GAGTATAGATTTAGCAGAACA       | 1591-1609           | 21          |



**Fig.6.** Mapa del vector pSilencer5.1-U6 Retro. Tomada de pSilencer<sup>TM</sup> 5.1Retro Kit, Ambion.

### 4.3 Transformación

#### 4.3.1 Prepararon bacterias competentes congeladas

Se prepararon bacterias competentes congeladas para expandir las construcciones plasmídicas. Para ello, se tomó una colonia de bacterias DH5 $\alpha$  de *E. coli* y se creció en 5 ml de medio LB a 37° C con agitación vigorosa durante toda la noche. En un matraz estéril se inocularon 500  $\mu$ l de ese cultivo, en 100 ml de LB. Se incubó a 37° C con agitación moderada, hasta que las células alcanzaron una densidad óptica (D.O.) de 0.4 a 0.5, a 595 nm. El cultivo se colectó en tubos de centrífuga de 50 ml y se mantuvo en hielo por 10-15 min. Las células se centrifugaron a 2000 rpm por 15 minutos a 4° C y la pastilla fue resuspendida en 1/3 del volumen inicial colectado de solución RF1 (RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y 15% de glicerol, pH 5.8). Se incubaron nuevamente las células en hielo por 15 minutos y se empastillaron a 2 000 rpm. La pastilla se resuspendió en 1/12 del volumen original de solución RF2 (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM y 15% de glicerol, pH 6.8), incubando otros 15 minutos en hielo. Se distribuyeron 200  $\mu$ l de bacterias en tubos eppendorf de 0.5 ml estériles, en hielo. Las alícuotas se mantuvieron a -80° C.

#### 4.3.2 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$

Para realizar la transformación se descongelaron en hielo alícuotas de células competentes *E. coli* DH5  $\alpha$  y luego se añadió la mezcla de ligación (3.0  $\mu$ 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 µl de medio Luria con ampicilina e incubó 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.

#### **4.4 Elección de las clonas DH5α con inserto**

Para determinar que clonas contenían el inserto fue necesario obtener ADN plasmídico y liberar el fragmento de ~55 pb digiriendo el ADN plasmídico de cada clona con *Bam*H I y *Hind* III.

##### **4.4.1 Extracción del plásmido por lisis alcalina (Miniprep)**

Para propagar las clonas se escogieron de 10-20 colonias aisladas e inocularon cada clona en alícuotas de 3 ml de medio Luria con ampicilina, se incubaron a 37 °C en agitador durante 16 h. Luego se tomaron 1.5 ml y sedimentaron las células por centrifugación a 8000 rpm durante 3 min y se aspiró el sobrenadante. Se lavaron con PBS 1x y centrifugaron, luego se aspiró el sobrenadante. A la pastilla se le extrajo el plásmido por lisis alcalina, según el método que se explica a continuación brevemente. 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 mezclaron por inversión y se incubaron 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 y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, 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. Los ADN se resuspendieron en 50 ul de agua estéril y el ARN se degradó con 1ul de RNAsa A (10 mg/ml) durante 30 min a 37 °C.

#### **4.4.2 Liberación del inserto con *BamHI* y *HindIII***

Previo a la liberación del inserto mediante digestión enzimática con las enzimas *BamHI* y *HindIII* 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 *BamH I* y *Hind III* durante 2 h a 37 °C. El producto de la digestión se analizó en geles de acrilamida 6% teñidos con BrEt. Posteriormente se seleccionó una de las clonas positivas para cada construcción y se secuenció 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.

#### **4.5. Curva de muerte celular mediante selección con Puomicina**

Para poder determinar la concentración mínima de puomicina requerida para seleccionar a las células transfectadas que incorporaron el vector pSilencer 5.1-U6 retro se trataron células no transfectadas con diferentes concentraciones de puomicina analizando la viabilidad de las células empleando el ensayo de MTT. La puomicina es un antibiótico que inhibe la síntesis proteica, pues su estructura es similar a la

terminación aminoacil de un aminoacil ARNt. De esta manera libera las cadenas de pre-ARN antes de que se complete su síntesis

El ensayo MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para la realización de los ensayos se cultivaron las células y luego de 24 hr se descartó el medio y se agregó medio fresco conteniendo diferentes concentraciones de Puromicina (0-1000 ng/ml). Se analizó la viabilidad celular los días indicados analizando la capacidad de reducir el MTT a formazan. Para ello, se descartó el medio con puromicina, se añadió MTT (0.5 mg/ml en DMEM) y se incubó el tiempo indicado en cada caso. Posteriormente se agregó Isopropanol-HCl-NP40, se colectó el formazan en tubos y se centrifugó a 13.000 rpm por 2 min a TA. Se tomaron 100 ul de sobrenadante, se colocaron en placa de ELISA y se leyó la absorbancia a 595 nm en el lector de ELISA (ELx800, Bio-tek). Como blanco se utilizó isopropanol-HCl-NP40 y se realizaron los cálculos, promedio de las lecturas y desvío estándar, en Excel.

#### **4.6 Transfección de pSilencer5.1 retro-mre11sh en una línea celular de CM**

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 el ADN plasmídico por espectrofotometría y en gel de agarosa 1% teñido con BrEt.

Las transfecciones se efectuaron empleando lipofectamina 2000. En una placa de 24 pozos se cultivó en cada pozo  $1.5 \times 10^5$  células MDA-MB-231, al día siguiente se mezclaron el ADN con Opti-MEM y en otro tubo la lipofectamina 2000 con el Opti-MEM. Posteriormente se incubó 5 min la lipofectamina con el Opti-MEM, para luego combinar el ADN con la lipofectamina, ver tabla 4. Se mezcló suavemente y se incubó unos 20-30 min a TA. Mientras que se forman los complejos se lavaron las células con 250  $\mu$ l de Opti-MEM, dos veces, posteriormente se retiró el Opti-MEM y se agregaron los complejos a cada pocillo mezclando suavemente balanceando la placa durante 1-2 min, luego se agregaron 100  $\mu$ l de DMEM (sin SFB, ni PISf) e incubó a 37 °C durante 2 h. Finalmente retiró el medio, agregó DMEM- Glutamina con SFB 10% e incubó hasta evaluar transfección.

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 *E.coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido y se expandió el mismo para luego purificarlo empleando kit miniprep de Promega, se cuantificó el ADNp y se transfectó en células MDA-MB-231. La evaluación se realizó por microscopía confocal (Leica Micosystems) luego de fijar las células con paraformaldehído al 2% durante 20 min, teñir los núcleos con DAPI y montar las laminillas con vectashield.

**Tabla 3. Cantidades de ADN, lipofectamina y medio de cultivo empleados en las transfecciones con placas de 24 pozos.**

| ADNp        | DNA (ng) | Volumen de Medio de cultivo (μl) | Volumen de ADN (μl) en Opti-MEM (μl) | Volumen de lipofectamina (μl) en Opti-MEM (μl) |
|-------------|----------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|
| Mre11.1     | 800      | 100                              | 3.1 en 50                            | 2 en 50                                        |
| Mre11.2     | 800      | 100                              | 3.3 en 50                            | 2 en 50                                        |
| Scramble    | 800      | 100                              | 5.2 en 50                            | 2 en 50                                        |
| Ciclofilina | 800      | 100                              | 13 en 50                             | 2 en 50                                        |
| s/DNA       | 0        | 100                              | 0 en 50                              | 0 en 50                                        |



#### 4.7 Análisis de la expresión del ARNm del gen *mre11*

El análisis de la expresión del gen *mre11* para evaluar los ensayos de transfección se realizó por RT-PCR. Como control de carga se empleó el análisis de la expresión de *ciclofilina A*.

##### 4.7.1 Aislamiento del ARN total

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  $\mu$ l de TRIzol, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se le agregó 40  $\mu$ l de cloroformo. Después de mezclar vigorosamente a mano para homogenizar, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min para obtener la fase acuosa y el ARN de la fase acuosa se precipitó con 100  $\mu$ 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 ARN se lavó con etanol al 75%, nuevamente se centrifugó 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 ARN 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  $\mu$ g/ml de ARN de cadena sencilla, la concentración de RNA pudo estimarse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{ARN } \mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 44.19 \times \text{factor de dilución.}$$

#### 4.7.2 Síntesis del ADN complementario

Para sintetizar el ADN complementario 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 eliminar 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 e incubándolos a 65 °C durante 15 min. Éste último paso es muy importante debido a que esta mezcla de ARN total se utiliza en los pasos siguientes para la síntesis del ADNc y del amplificado de ADN durante la reacción de PCR. En seguida se le agregaron una mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 2 mM de c/u, 100 ng de oligonucleótido dT<sub>18</sub>, buffer de reacción para la enzima Superscript II<sup>TM</sup> de Invitrogen (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 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 Unidades 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.

#### 4.7.3 Prueba de los oligonucleótidos para PCR

Una vez diseñados los 2 pares de oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de *mre11* y el otro par de oligonucleótidos que amplifica un fragmento de *ciclofilina A* se efectuó la cuantificación. Para ello se realizó su corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X y la tinción 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<sub>260nm</sub>, 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  $\mu\text{g}$ , por lo tanto, la concentración puede determinarse bajo la siguiente ecuación:

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

Se realizaron PCR con ADN genómico de la línea celular MCF-7 extraído con el kit de Promega Wizard Genomic DNA Purification para establecer las condiciones de la 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  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), 1U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 100 ng de ADN genómico de MCF-7, agua, 0.4  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido en el caso de *mre11* y en el caso de *ciclofilina* 0.4  $\mu\text{M}$  para el oligonucleótido sentido y 0.8  $\mu\text{M}$  para el antisentido. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C/ 3 min de desnaturalización inicial, luego 35 ciclos de 94 °C/45 seg, 55 °C/30 seg y 72 °C/30 seg y el paso de extensión final de 72°C/10 min.

#### **4.7.4. PCR con ADN complementario**

Para las reacciones de PCR, se tomó 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  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido en el caso de *mre11* y en el caso de *ciclofilina* 0.4  $\mu\text{M}$  para el oligonucleótido sentido y 0.8  $\mu\text{M}$  para el antisentido, 2.7 mM  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen) y agua. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C/ 3 min de desnaturalización inicial, luego 35 ciclos de 94 °C/30 seg, 55 °C/30 seg y 72 °C/30 seg y el paso de extensión final de 72°C/10 min. Cada reacción de

RT- PCR, tanto para *mre11* como para *ciclofilina*, 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 ARN tratado correspondiente en vez del ADNc, esto con el fin de detectar contaminación por ADN.

#### **4.7.5 Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)**

Los productos amplificados correspondientes al gen *mre11* y *ciclofilina*, así como sus correspondientes controles - (RT-) fueron resueltos mediante PAGE al 6% en amortiguador TBE 1X. El gel posteriormente fue teñido con BrEt y visualizado en un transiluminador de luz UV. La intensidad de las bandas resultantes se cuantificó mediante análisis densitométrico utilizando el programa Multigauge (Fujifilm).

### **5. EVALUACIÓN DE QUIMIOSENSIBILIDAD AL CISPLATINO (ENSAYO MTT)**

Para realizar este ensayo un día previo a la transfección se cultivaron las células ( $1.5 \times 10^5$  células/pocillo en placa de 24 pozos). Al día siguiente se realizó la transfección como se describió en el inciso 4.6. Posteriormente se incubó un periodo de tiempo indicado en cada caso para que se exprese el transcripto y luego se agregó el CDDP en la concentración y tiempo indicado en cada caso. 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 añadieron 300 µl de

MTT (0.5 mg/ml de medio de cultivo s/ SFB, s/ PIS<sub>t</sub>). Se incubó a 37 °C durante 30 min y posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 µl de isopropanol-HCl-NP-40 en cada pocillo a analizar, se colectó el formazan, se centrifugó y se midió la absorbancia en placa de 96 pozos empleando el lector de ELISA (ELx800, Bio-tek), utilizando como blanco la solución de isopropanol-HCl-NP-40.

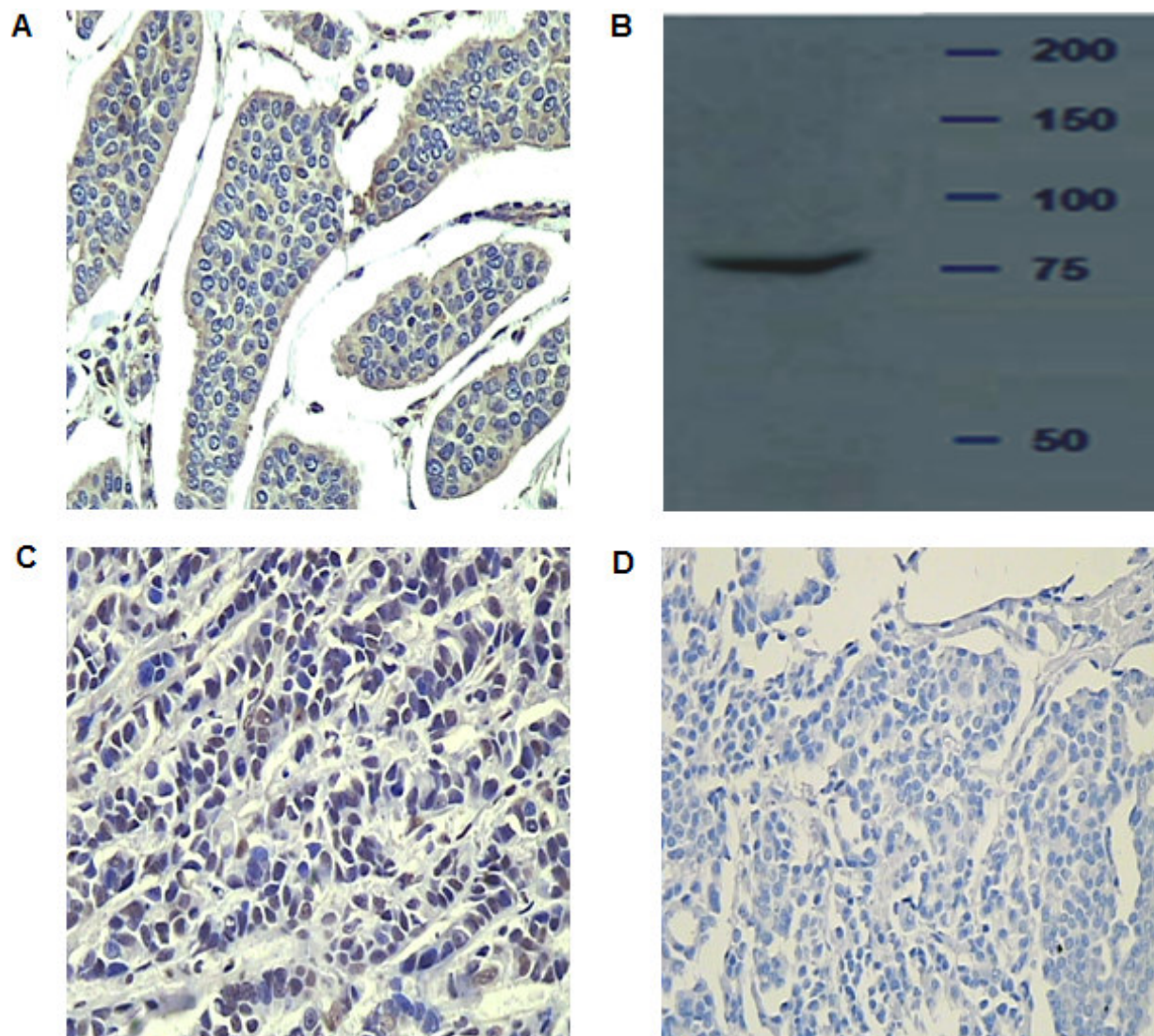
## VI. RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MRE11 Y RAD50 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CM

Se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ) con cortes del microarreglo MAT005 utilizando los anticuerpos de Santa Cruz  $\alpha$ -MRE11 y  $\alpha$ -RAD50 descritos en la tabla 1. En las figura 7 A y B se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos. En la figura 7 A se observa que el anticuerpo anti-MRE11 da señal principalmente citoplasmática por lo que no es útil para realizar IHQ. Posteriormente se analizó por western blot la especificidad del anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 de Cellsignaling y como se observa en la imagen B, utilizando un extracto de proteínas totales de la línea celular MDA-MB-231 el anticuerpo reconoce una única banda con masa molecular esperada para la proteína MRE11. En la IHQ empleando el anticuerpo  $\alpha$ -RAD50 se observó intensa señal nuclear (imagen C). Como control negativo se empleo un anticuerpo dirigido contra la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, un enzima que no está presente ni es inducible en los tejidos de los mamíferos. Este control se realizó con un corte del microarreglo MAT011 y como se esperaba no se detecta señal (imagen D).

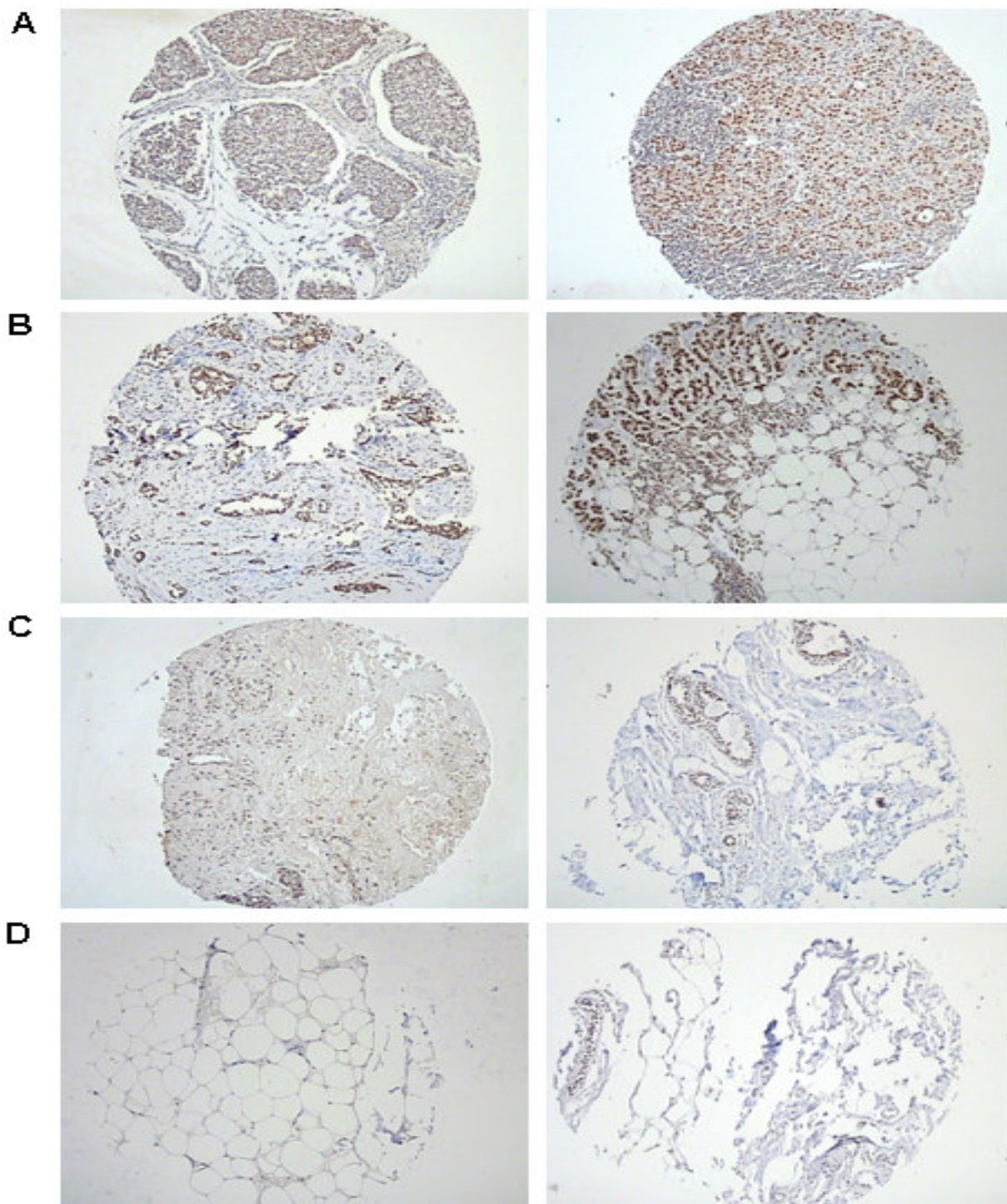
A continuación se realizaron las IHQ con cortes de los microarreglos MAT005, MAT009 y MAT011 empleando los anticuerpos  $\alpha$ -MRE11 de Cellsignaling y  $\alpha$ -RAD50 de Santa Cruz. Se analizó la calidad de las muestras clasificando las muestras en cuatro categorías: muy buena, buena, regular y mala, dependiendo de la proporción de

tejido epitelial presente, en la figura 8 se muestran imágenes representativas. En la tabla 4 se representa la proporción de spots de biopsias de tejido mamario tumoral (T) y tejido mamario normal (N) que se encuentran en cada categoría en las IHQ con el anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 y en la tabla 5 con el anticuerpo  $\alpha$ -RAD50.



**Fig.7 Western blot con anticuerpo  $\alpha$ -MRE11 de Cellsignaling e imágenes representativas de inmunohistoquímicas con anticuerpos  $\alpha$ -MRE11 y  $\alpha$ -RAD-50 de Santa Cruz y control negativo de Dako. A) Inmunohistoquímica con  $\alpha$ -MRE11 (Santa Cruz), MAT005, B) Western blot con  $\alpha$ -MRE11 (Cellsignaling), C) Inmunohistoquímica con  $\alpha$ -RAD50 (Santa Cruz), MAT005 y D) Inmunohistoquímica con anticuerpo control negativo (Dako), MAT011. Imágenes de inmunohistoquímicas tomadas con aumento 40x.**





**Fig.8** Imágenes representativas de la clasificación de las muestras empleadas en las inmunohistoquímicas según su calidad. Se clasificaron en cuatro categorías: muy buena, buena, regular y mala. A) Muestra de biopsia muy buena, B) Buena, C) Regular y D) Mala. Imágenes tomadas con aumento 10x.

**Tabla 4.** Se representa la proporción de spots de las biopsias de tejido mamario tumoral (T) y tejido mamario normal (N) que se encuentran en las categorías muy buena, buena, regular o mala según su calidad en las inmunohistoquímicas con el anticuerpo  $\alpha$ -MRE11.

| Nº de biopsias | MAT005 |   | MAT009 |   | MAT011 |    | Total |    |
|----------------|--------|---|--------|---|--------|----|-------|----|
|                | T      | N | T      | N | T      | N  | T     | N  |
| Muy buenas     | 15     | 0 | 13     | 1 | 14     | 0  | 42    | 1  |
| Buenas         | 8      | 0 | 6      | 0 | 4      | 7  | 18    | 7  |
| Regulares      | 3      | 0 | 3      | 0 | 1      | 7  | 7     | 7  |
| Malas          | 14     | 0 | 1      | 1 | 2      | 3  | 17    | 4  |
| NA             | 1      | 0 | 0      | 0 | 0      | 0  | 1     | 0  |
| Total          | 41     | 0 | 23     | 2 | 21     | 17 | 85    | 19 |

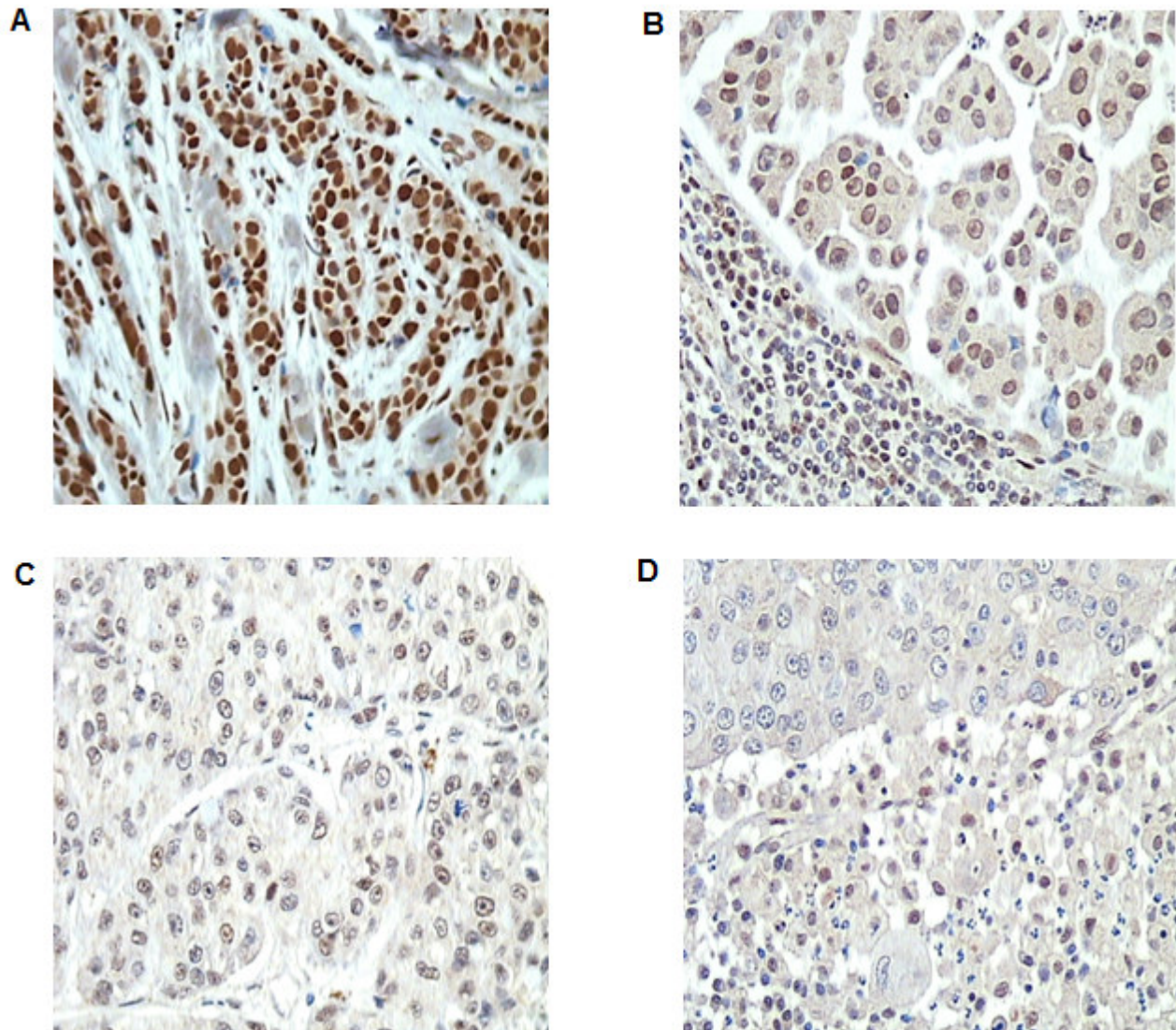
**Tabla 5.** Se representa la proporción de spots de las biopsias de tejido mamario tumoral (T) y tejido mamario normal (N) que se encuentran en las categorías muy buena, buena, regular o mala según su calidad en las inmunohistoquímicas con el anticuerpo  $\alpha$ -RAD50.

| Nº de biopsias | MAT005 |   | MAT009 |   | MAT011 |    | Total |    |
|----------------|--------|---|--------|---|--------|----|-------|----|
|                | T      | N | T      | N | T      | N  | T     | N  |
| Muy buenas     | 14     | 0 | 11     | 0 | 14     | 0  | 39    | 0  |
| Buenas         | 8      | 0 | 9      | 0 | 3      | 6  | 20    | 7  |
| Regulares      | 6      | 0 | 2      | 1 | 3      | 6  | 11    | 7  |
| Malas          | 12     | 0 | 1      | 1 | 1      | 5  | 14    | 5  |
| NA             | 1      | 0 | 0      | 0 | 0      | 0  | 1     | 0  |
| Total          | 41     | 0 | 23     | 2 | 21     | 17 | 85    | 19 |

Para determinar el nivel de expresión de las proteínas MRE11 y RAD50 se utilizaron aquellos spots donde las muestras se clasificaron como muy buenas, buenas y regulares y la expresión de cada proteína fue evaluada clasificando la intensidad de la tinción nuclear como nula, baja, moderada y alta. En la figura 9 se muestran imágenes representativas de biopsias con expresión alta, moderada, débil y nula de la proteína MRE11 y en la tabla 6 se resume el número de biopsias tanto en tejido mamario normal como tumoral dentro de las diferentes categorías. En las biopsias de tejido tumoral el 79% tuvieron una intensidad de expresión fuerte de MRE11, el 16% moderada, el 3% débil y un 2% no expresan MRE11. En las biopsias de tejido normal el 100% tuvieron una intensidad de expresión fuerte. Al comparar la expresión de MRE11 en las biopsias de los pacientes que se cuenta con el resultado tanto en tejido normal con tumoral no se encontraron diferencias en el nivel de expresión de MRE11 (tabla 7).

El nivel de expresión de RAD50 basada en la intensidad de la tinción nuclear también fue categorizado como nulo, bajo, moderado y alto. En la figura 10 se muestran en imágenes representativas y en la tabla 8 se resume el número de biopsias en cada categoría. En las biopsias de tejido mamario tumoral el 43% tuvieron una intensidad de expresión fuerte, el 29% moderada, el 24% débil y un 4% no expresan RAD50. En las biopsias de tejido mamario normal el 57% tuvieron una intensidad de expresión fuerte, el 21% moderada, el 21% débil y ninguna nula. Al comparar la expresión de RAD50 en las biopsias que se cuenta con el resultado tanto en tejido normal con tumoral se observó que dos pacientes presentan expresión moderada de RAD50 en tejido normal y débil en tejido tumoral (tabla 9).





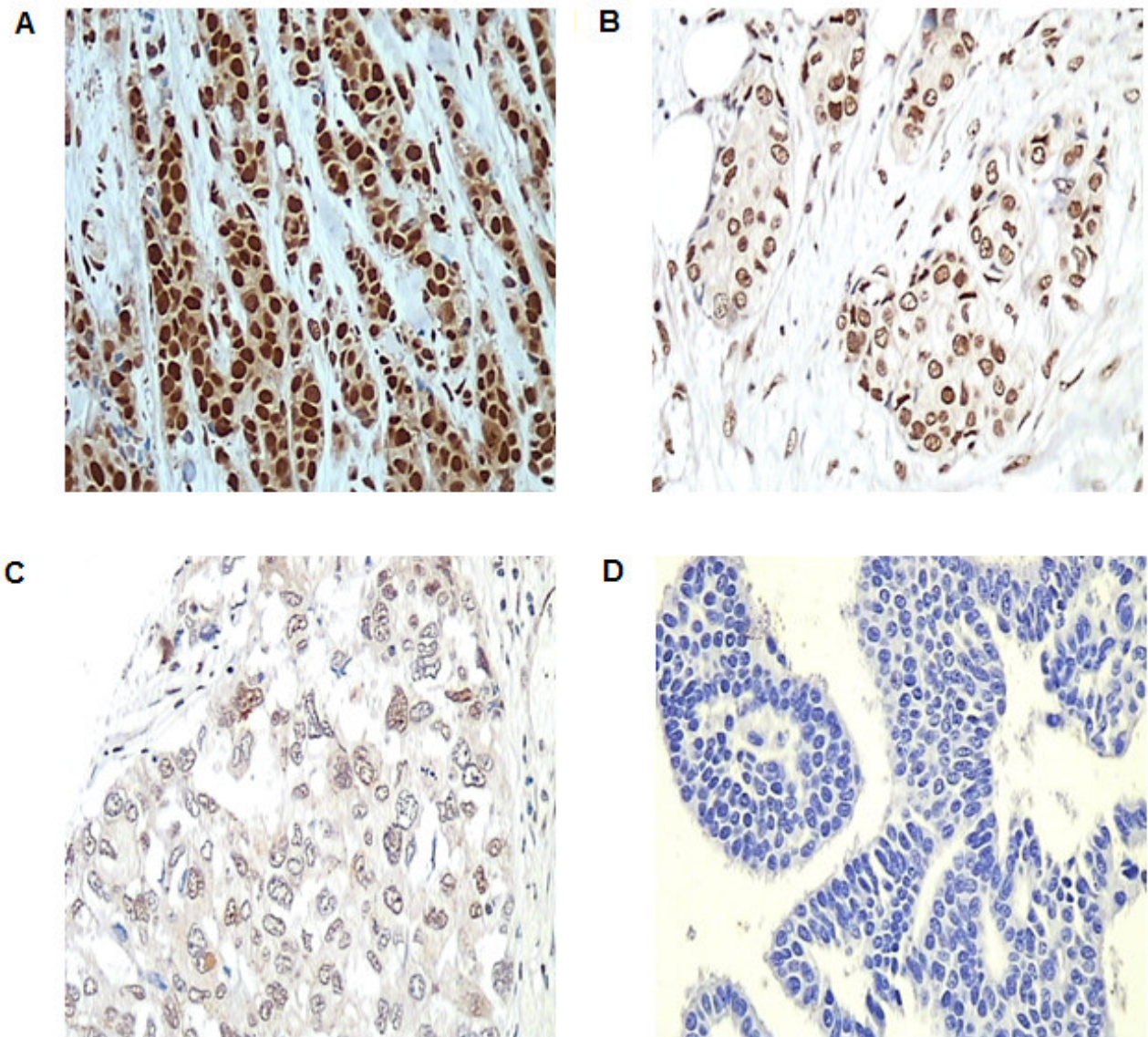
**Fig.9 Imágenes representativas de biopsias con expresión nula, baja, moderada y alta de la proteína MRE11. A) Expresión alta, B) Moderada, C) Débil y D) Nula. Imágenes tomadas con aumento 40x.**

**Tabla 6. Resumen del nivel de expresión de MRE11 en biopsias de tejido mamario normal y tumoral.**

|          | <b>T (%)</b> | <b>N (%)</b> |
|----------|--------------|--------------|
| Fuerte   | 51 (76)      | 15 (100)     |
| Moderada | 13 (19)      | 0 (0)        |
| Débil    | 2 (3)        | 0 (0)        |
| Nula     | 1 (2)        | 0 (0)        |

**Tabla 7. Comparación del nivel de expresión de MRE11 en las biopsias de los pacientes que se cuenta con el resultado tanto en tejido normal como tumoral.**

| <b>N° DE MUESTRA</b> | <b>TEJIDO</b> | <b>NIVEL DE EXPRESIÓN DE MRE11</b> | <b>N° DE MUESTRA</b> | <b>TEJIDO</b> | <b>NIVEL DE EXPRESIÓN DE MRE11</b> |
|----------------------|---------------|------------------------------------|----------------------|---------------|------------------------------------|
| 95C                  | NORMAL        | FUERTE                             | 095                  | TUMORAL       | FUERTE                             |
| 100C                 | NORMAL        | FUERTE                             | 100                  | TUMORAL       | FUERTE                             |
| 101C                 | NORMAL        | FUERTE                             | 101                  | TUMORAL       | FUERTE                             |
| 108C                 | NORMAL        | FUERTE                             | 108                  | TUMORAL       | FUERTE                             |
| 109C                 | NORMAL        | FUERTE                             | 109                  | TUMORAL       | FUERTE                             |
| 115C                 | NORMAL        | FUERTE                             | 115                  | TUMORAL       | FUERTE                             |
| 122C                 | NORMAL        | FUERTE                             | 122                  | TUMORAL       | FUERTE                             |



**Fig.10. Imágenes representativas de biopsias con expresión nula, baja, moderada y alta de la proteína RAD50. A) Expresión alta, B) Moderada, C) Débil y D) Nula. Imágenes tomadas con aumento 40x.**



**Tabla 8. Resumen del nivel de expresión de RAD50 en biopsias de tejido mamario normal y tumoral.**

|          | Nº de biopsias T (%) | Nº de biopsias N (%) |
|----------|----------------------|----------------------|
| Fuerte   | 30 (43)              | 8 (57)               |
| Moderada | 20 (29)              | 3 (21)               |
| Débil    | 17 (24)              | 3 (21)               |
| Nula     | 3 (4)                | 0 (0)                |

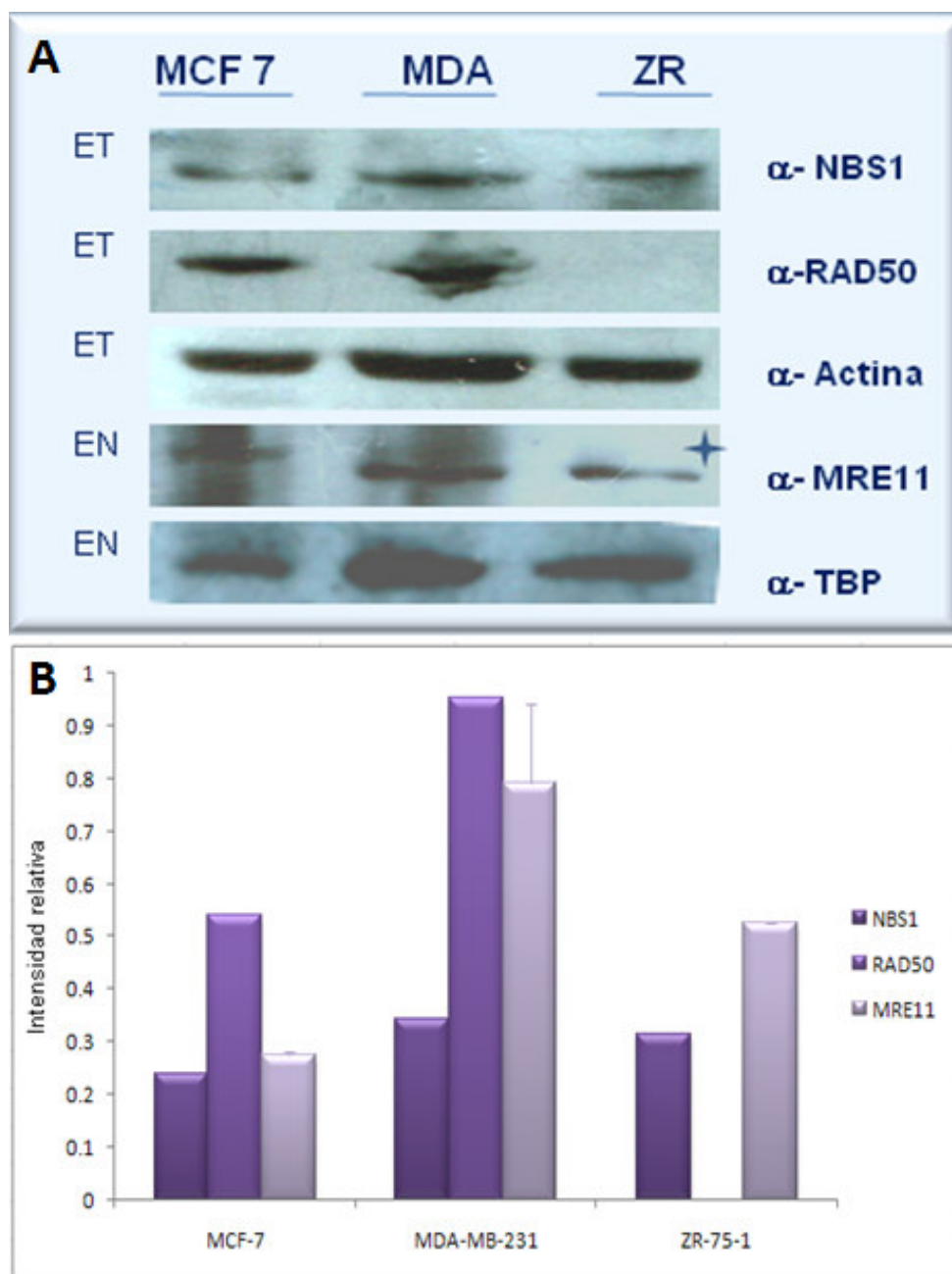
**Tabla 9. Comparación del nivel de expresión de RAD50 en las biopsias de los pacientes que se cuenta con el resultado tanto en tejido normal como tumoral.**

| Nº DE MUESTRA | TEJIDO | NIVEL DE EXPRESIÓN DE MRE11 | Nº DE MUESTRA | TEJIDO  | NIVEL DE EXPRESIÓN DE MRE11 |
|---------------|--------|-----------------------------|---------------|---------|-----------------------------|
| 091C          | NORMAL | MODERADA                    | 091           | TUMORAL | DEBIL                       |
| 100C          | NORMAL | FUERTE                      | 100           | TUMORAL | FUERTE                      |
| 101C          | NORMAL | FUERTE                      | 101           | TUMORAL | FUERTE                      |
| 108C          | NORMAL | FUERTE                      | 108           | TUMORAL | FUERTE                      |
| 115C          | NORMAL | MODERADA                    | 115           | TUMORAL | MODERADA                    |
| 122C          | NORMAL | MODERADA                    | 122           | TUMORAL | DEBIL                       |

## **2 ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE MRE11, NBS1 Y RAD50 EN LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7, ZR-75-1 Y MDA-MB-231**

El análisis por western blot de la expresión de los componentes del complejo MRN se muestra en la fig.11. Como se puede observar la expresión de NBS1 es similar en todas las líneas celulares, en cambio la expresión de RAD50 parece ser muy baja en la línea ZR-75-1, puesto que no fue posible detectar su expresión. Como control de carga se empleó actina en los casos donde se utilizaron extractos totales (NBS1 y RAD50). En el caso de MRE11 dado que en extractos totales se visualizaba mayoritariamente una banda de menor peso molecular que el esperado se realizó un fraccionamiento celular separando extractos nucleares de citoplasmáticos. De esta forma se pudo observar en la fracción nuclear una banda mayoritaria de la talla esperada. En cuanto al nivel de expresión, las líneas MDA-MB-231 y ZR-75-1 expresan niveles similares de MRE11 y en comparación con la línea MCF-7 son notoriamente mayores. Como control de carga de las fracciones nucleares se utilizó TBP.





**Fig.11. Análisis por western blot de las proteínas del complejo MRN en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1.** A) Western blot. Para detectar NBS1, RAD50 y actina se emplearon para cada línea celular 100  $\mu$ g de extractos totales (ET), para detectar MRE11 y TBP en las fracciones nucleares (EN) de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se utilizaron 100  $\mu$ g de EN y para la línea ZR se emplearon 58  $\mu$ g. B) Análisis densitométrico de las bandas en A) empleando programa ImageJ 1.41

### 3. SILENCIAMIENTO DEL GEN *mre11* MEDIANTE INTERFERENCIA DEL ARN

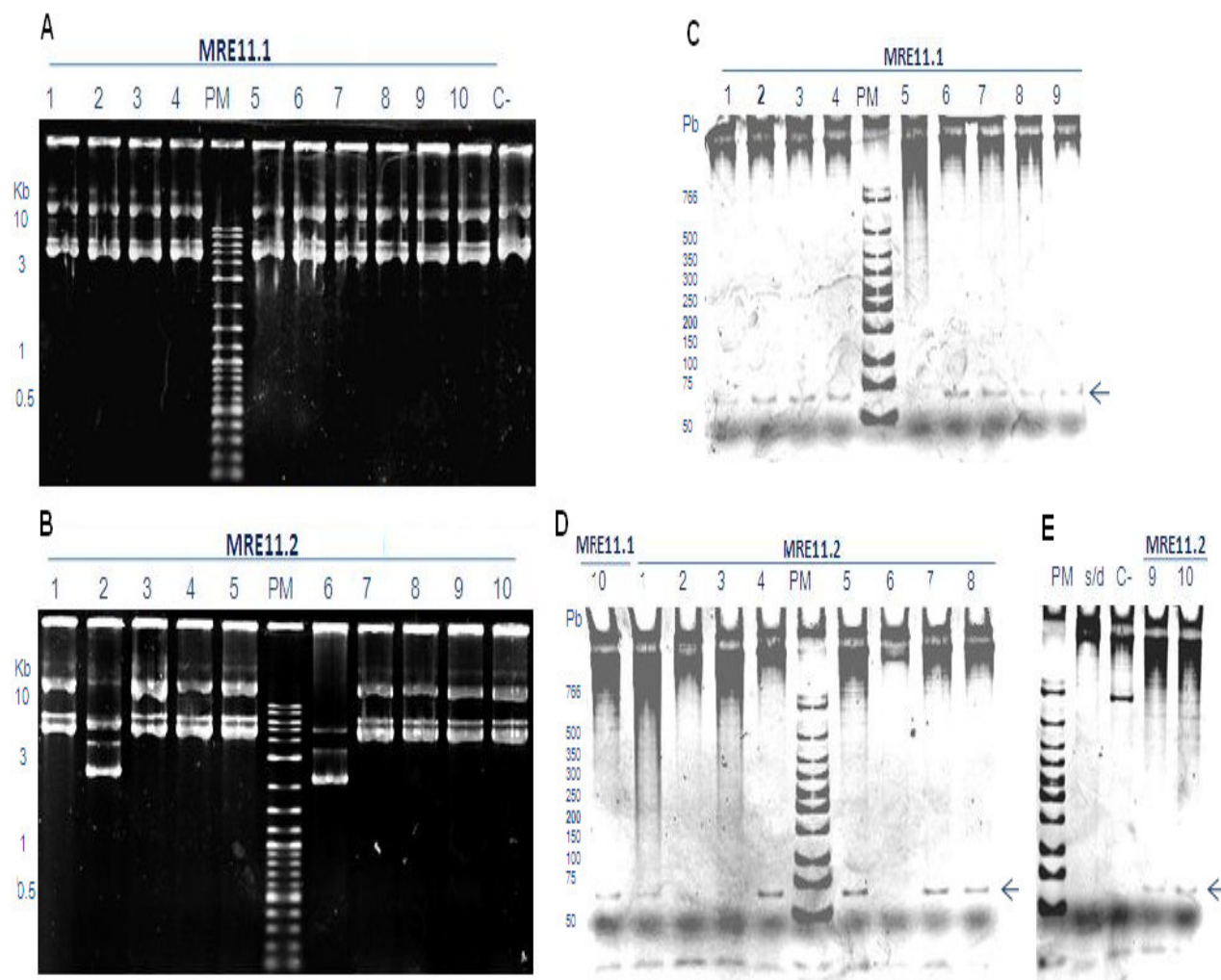
Para el diseño de los insertos se seleccionaron las secuencias blanco reportadas por W. Chai et. al.<sup>61</sup> y H. Takemura et.al<sup>62</sup> y se empleo el convertidor online de Ambion<sup>81</sup>, recomendado para el diseño de insertos a clonar en el vector pSilencer 5.1-U6 retro (Ambion). Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 10.

Para determinar si las clonas obtenidas liberaban el inserto del tamaño esperado (~55 pb) necesario para expresar los transcritos capaces de silenciar la expresión del gen *mre11* se purificó el ADN plasmídico de 10 clonas para cada una de las dos construcciones con distintas regiones blanco en el gen *mre11* (fig. 12 A y B), y se realizó una doble digestión para liberar el inserto (fig. 12 C y D).

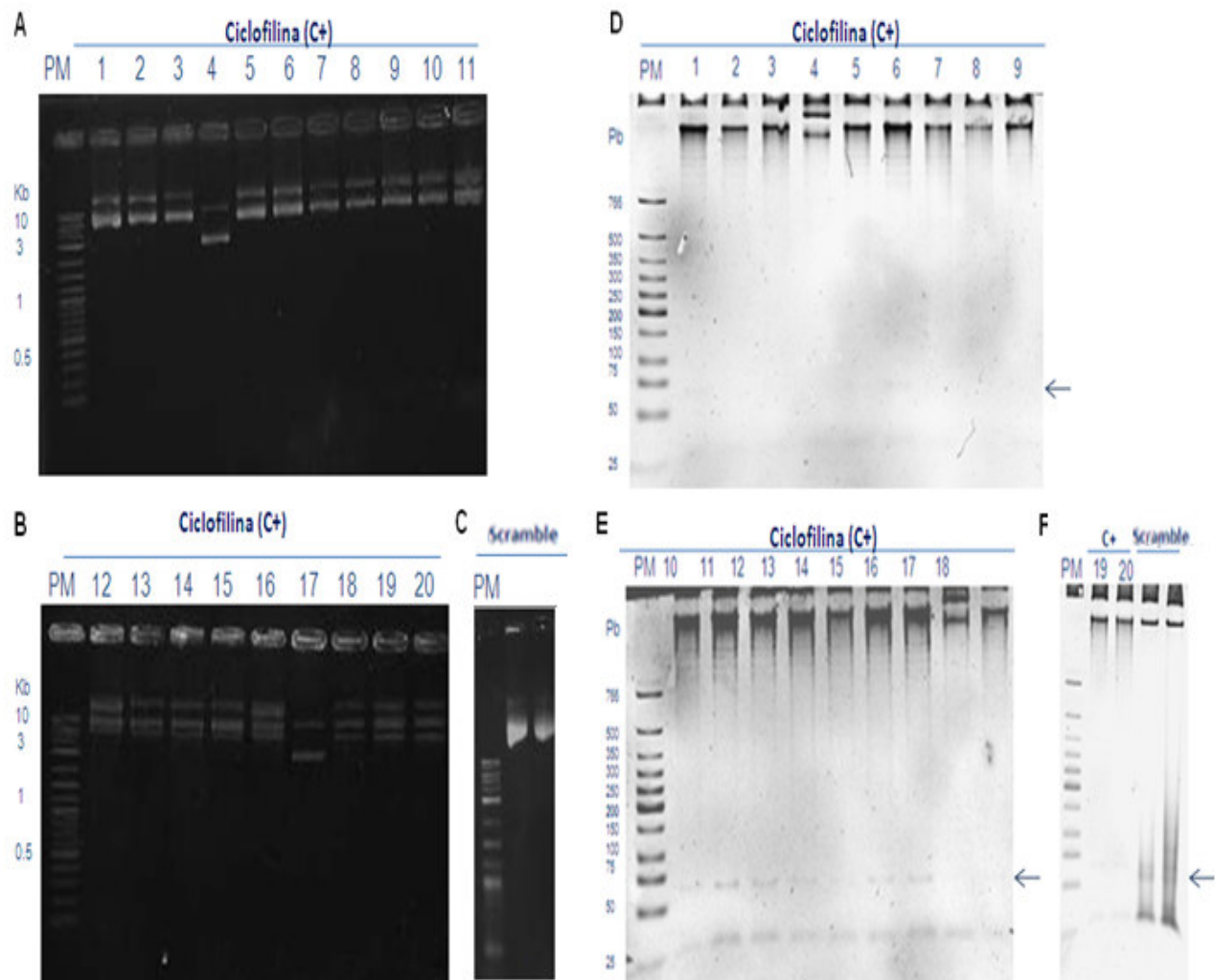
Para generar la construcción que silencia el gen de *ciclofilina A* (C+), se ligó el inserto de ciclofilina al vector psilencer 5.1 retro y se transformaron bacterias de *E coli* DH5 $\alpha$ , de las clonas obtenidas se purificaron 20 ADNp por lisis alcalina, ver fig. 13 A y B. Por otro lado, se transformaron bacterias con un plásmido que se emplea como control negativo, este transcribe un transcrito sin homología con ninguna secuencia codificante del genoma humano (scramble, C-). En la fig. 13 C se muestra el ADN plasmídico purificado por lisis alcalina de una clona scramble. Para analizar que clonas liberaban el inserto de ~55 pb se realizó la doble digestión, ver fig. 13 D y E. Posteriormente se secuenció el ADNp de la clona 2 MRE11.1 y la clona 5 MRE11.2 que liberaron el inserto del tamaño esperado. También se secuenció el ADNp de la clona 16 de ciclofilina y la clona scramble que liberaron el inserto (fig.14).

**Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos que se emplearon para silenciar gen *mre11*.**

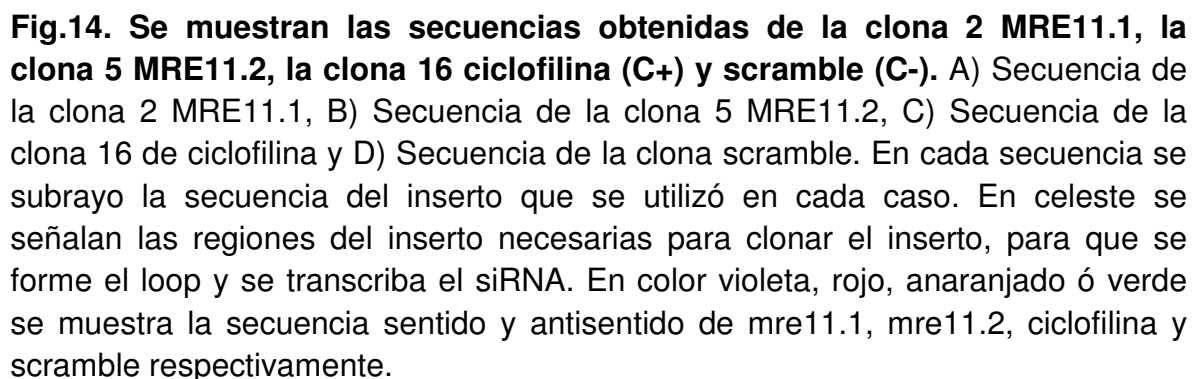
| Nombre            | Oligonucleótido sentido                                                           | Oligonucleótido antisentido                                                  |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mre11sh1.1</b> | 5'-GATCC ACAGGAGAAGAGATCAACT<br>TTCAAGAGA AGTTGATCTCTTCTCCTGTTT<br>TTTTGGAAA-3'   | 5'-AGCTTTTCCAAAA AACAGGAGAAGAGATCAACT<br>TCTCTTGAA AGTTGATCTCTTCTCCTGT G-3'  |
| <b>Mre11sh1.2</b> | 5'-GATCC.GATGCCATTGAGGAATTAG.<br>TTCAAGAGA CTAATTCCTCAATGGCATCTT.<br>TTTTGGAAA-3' | 5'-AGCTTTTCCAAAA AAGATGCCATTGAGGAATTAG<br>TCTCTTGAA CTAATTCCTCAATGGCATC G-3' |



**Fig.12. Purificación del ADN plasmídico de clones MRE11.1 y MRE11.2 y liberación de inserto de ~55 pb por doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III de las clones MRE11.** A) Se observa el resultado de purificar por lisis alcalina el ADNp de 10 clones MRE11.1. B) Se visualiza el ADNp de 10 clones MRE11.2, resueltos en gel de agarosa 1% teñido con BrEt. C) Resultado de la digestión de los plásmidos MRE11.1, D) Digestión de construcciones MRE11.2 E) Se visualizan los controles de digestión: ADNp sin digerir (s/d) y la digestión del vector vacío (C-), así como dos digestiones de MRE11.2, resueltos en gel acrilamida 6% teñidos con BrEt.



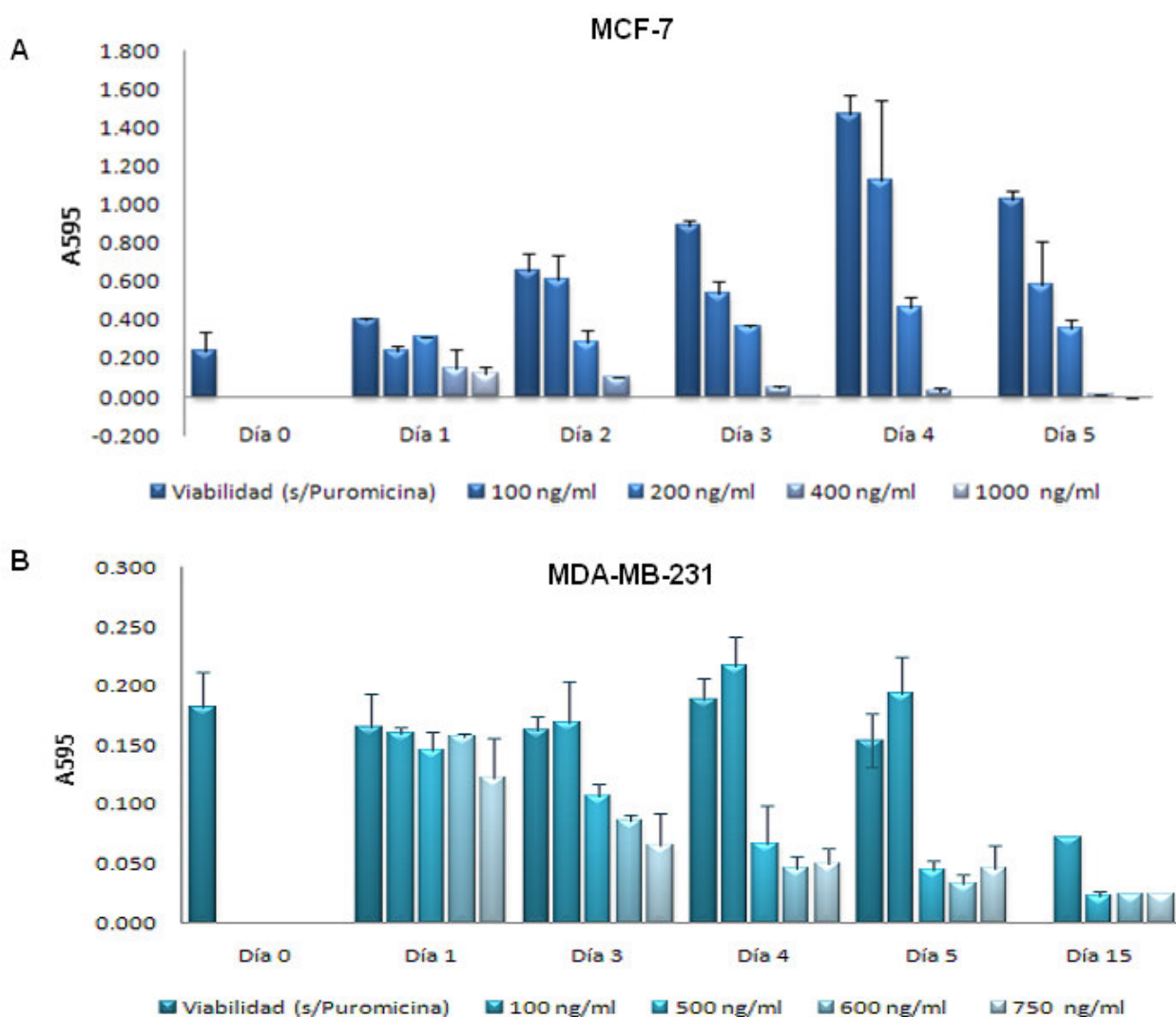
**Fig.13. Purificación del ADN plasmídico de clonas ciclofilina (C+) y scramble (C-) y liberación de inserto de ~55 pb por doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III de las clonas ciclofilina y scramble.** En A y B) se observa el resultado de purificar por lisis alcalina el ADNp de 20 clonas ciclofilina. En C) se visualiza el ADNp de 2 clonas scramble. En D y E se muestran los resultados de la digestión de los plásmidos ciclofilina y en F) la digestión de construcciones ciclofilina y scramble. A, B y C fueron visualizados en agarosa 1% teñido con BrEt y D, E y F fueron visualizados en gel acrilamida 6% teñidos con BrEt.





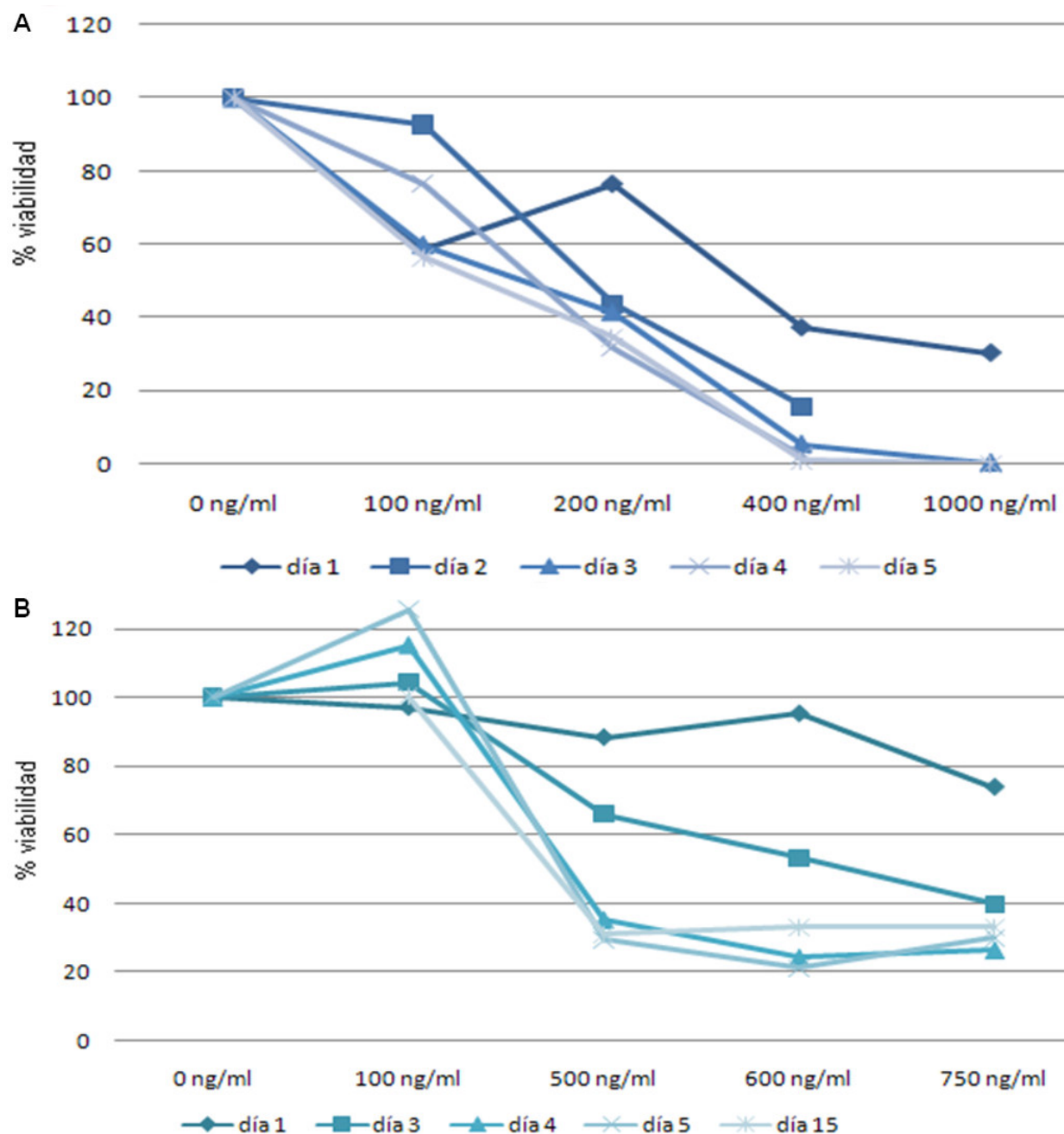
Para realizar las transfecciones, los plásmidos de la clonas 2 MRE11.1, la clona 5 MRE11.2, la clona 16 ciclofilina y una clona scramble se expandieron y purificaron usando kits. Asimismo, previo a realizar las transfecciones para obtener líneas celulares estables se determinó la concentración mínima de puromicina que mataba a las células no transfectadas ya que el vector empleado para transfectar (psilencer 5.1 retro) contiene un gen de resistencia para el antibiótico puromicina. Para determinar la viabilidad de las células tratadas con diferentes concentraciones de puromicina y en el transcurso de los días se empleó el reactivo MTT. Se realizaron los ensayos para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 por duplicado, en la figura 12 se grafican los valores de absorbancia a 595 nm obtenidos al reducirse metabólicamente el MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color violeta (formazan).

Para analizar el porcentaje de viabilidad en relación al control sin puromicina en cada día y así poder determinar la concentración adecuada de puromicina a utilizar en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se construyeron los gráficos de la figura. 16. En el caso de las células MCF-7 400 ng/ml de puromicina es suficiente para provocar una muerte masiva antes del quinto día, ya que al cuarto día de tratamiento sobrevivió el 2% y al quinto ya han muerto todas las células (fig. 16 A). En el caso de las células MDA-MB-231 con 500 ng/ml de puromicina parece ser suficiente para provocar una muerte masiva al cuarto día, ya que únicamente sobrevivió el 35% de las células. Además con las concentraciones mayores probadas no parecen aumentar significativamente la toxicidad de la puromicina a lo largo del tiempo (fig 16 B).



**Fig.15. Determinación de la concentración óptima de puromicina para selección en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.** Se representa la absorbancia a 595 nm obtenida al reducirse el MTT en las distintas concentraciones empleadas a lo largo de los días. A) Ensayo para la línea celular MCF-7. B) Ensayo para la línea celular MDA-MB-231. El ensayo se realizó por duplicado.



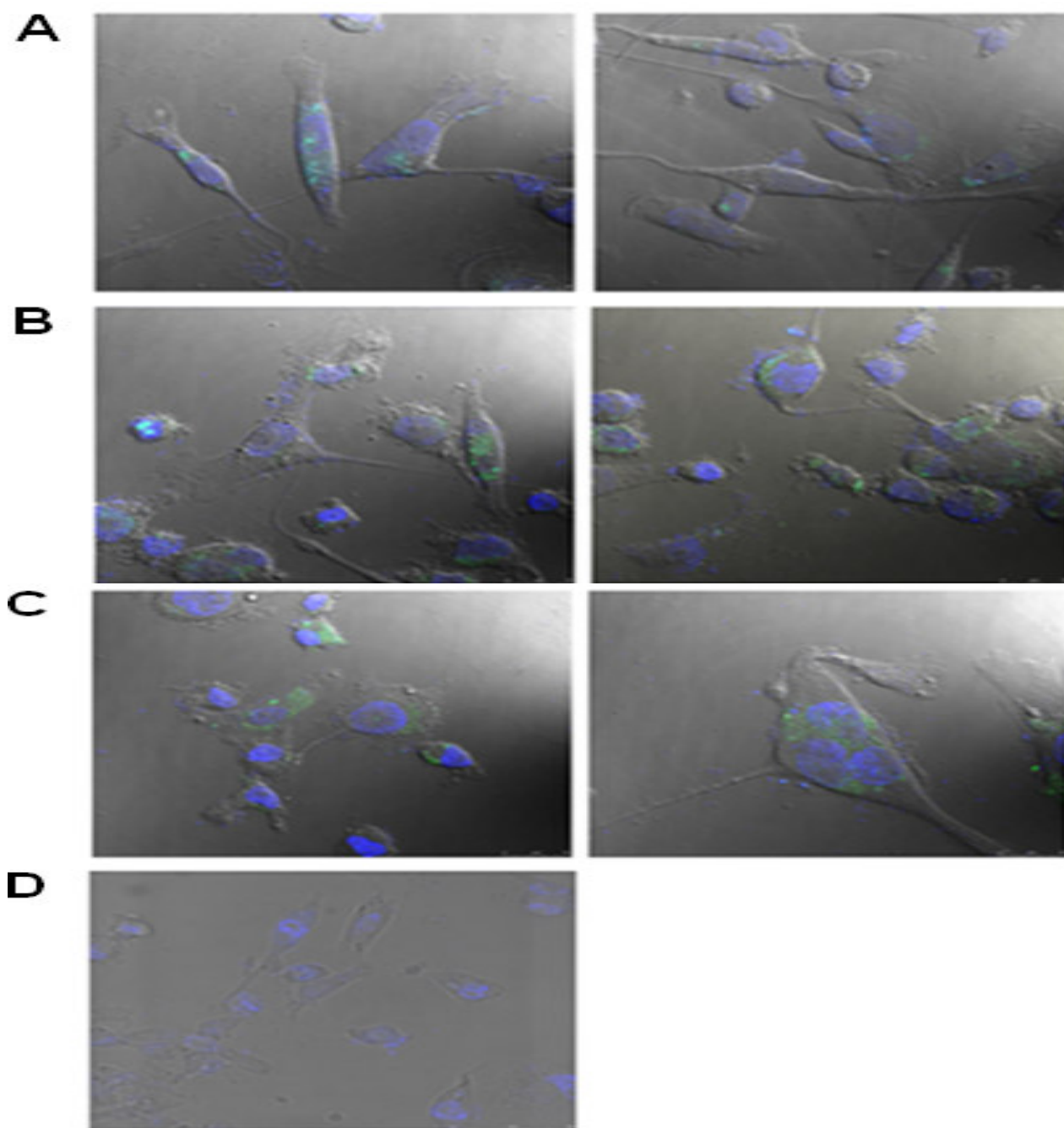


**Fig.16. Muestra el porcentaje de viabilidad de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con las diferentes concentraciones de puromicina en relación al control no tratado para cada día. A) MCF-7 y B) MDA-MB-231**

El silenciamiento del gen *mre11* se realizó en la línea celular MDA-MB-231 por el alto nivel de expresión de la proteína MRE11 en dichas células. Además, resulta interesante como modelo para evaluar el efecto de silenciar el gen *mre11* en respuesta al tratamiento con cisplatino ya que este quimioterapéutico es utilizado frecuentemente en pacientes que al igual que las células MDA son ER/PR//Her2 triple negativos.

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables de MDA-MB-231 con el gen *mre11* silenciado se realizó el primer ensayo de transfección siguiendo las recomendaciones del agente de transfección empleado, lipofectamina 2000, para placas de 24 pocillos. Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células por pozo el día previo de la transfección y al otro día se transfectó durante 6 h, a las 24h posteriores a la transfección se observaron claras diferencias en la cantidad de células adherida entre las no transfectadas, las transfectadas con las construcciones ciclofilina, scramble y las transfectadas con MRE11.1 y MRE11.2, siendo mayor la cantidad de células adheridas en las no transfectadas y en orden descendente las transfectadas con ciclofilina, scramble y finalmente en las que se transfectaron las construcciones MRE11. Durante la selección con puromicina las células no transfectadas murieron, mientras que en las transfectadas se observaron algunas células pero a lo largo de las dos semanas de selección no se propagaron y finalmente murieron por lo que decidimos evaluar el efecto de silenciar el gen *mre11* utilizando un protocolo de transfección transitoriamente, sin selección con puromicina.

Para evaluar si el método de transfección empleado era eficaz se transfectó el plásmido pEGFP-C2 que expresa la proteína GFP. Para ello se transformaron *E.coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido y se expandió el mismo para luego purificarlo empleando kit de miniprep de Promega, se cuantificó el ADNp y se transfectó en células MDA-MB-231. La evaluación se realizó por microscopía confocal (fig. 17). Con el microscopio confocal se observó que una gran proporción de las células expresan GFP y que con 2 h de transfección es suficiente para que penetre el vector, además las células se encuentran menos dañadas en relación a las células con 4 o 6 h de transfección. Por lo que las transfecciones con el vector pSilencer 5.1-U6 retro se realizarán durante 2 h y con las condiciones empleadas en este ensayo.



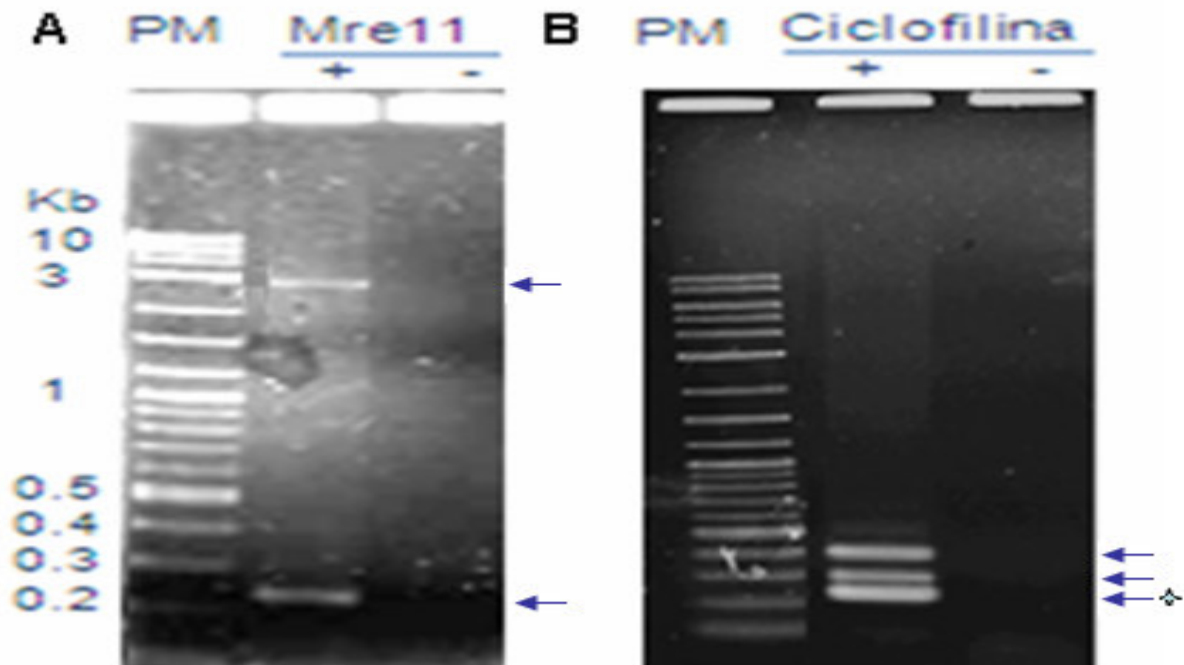
**Fig.17. Evaluación del método de transfección midiendo la expresión de GFP por microscopía confocal.** Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 en cada pozo, en placa de 24 pozos. Al día siguiente se transfectaron 800 ng de ADNp empleando lipofectamina 2000 durante 2-6 h. A las 48 h de cada transfección se fijaron (PFA 2%) y montaron (Vectashield + DAPI) las células para evaluar la expresión de GFP por microscopía confocal. A) 2 h de transfección, B) 4 h de transfección, C) 6 h de transfección y D) Control negativo, células tratadas con lipofectamina. Para cada muestra se realizó un duplicado. El manejo de las imágenes se realizó con el programa LAS AF Versión 1.8.0, Leica Micosystems.

En un principio se consideró evaluar el efecto de silenciar el gen *mre11* por western blot pero a causa de la desventaja que representa el requerir gran cantidad de proteínas para detectar la expresión de MRE11 (mínimo 100 µg) se optó por medir la expresión de *mre11* a nivel de transcrito, por RT-PCR. Para la amplificación por PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de *mre11* empleando el programa OLIGO, para lo cual se consideró que la longitud y el valor de T<sub>m</sub> de ambos oligos fueran muy cercanos, que sus secuencias no favorecieran la hibridización entre sí, ni la formación de estructuras secundarias estables y que fueran específicos, es decir, que no sean complementarios a otras secuencias presentes en el genoma de *homo sapiens*. También se sintetizaron oligonucleótidos que amplifican *ciclofilina A* según la recomendación de Ambion (ver tabla 11).

Para probar los oligonucleótidos se realizaron PCR con ADN genómico de la línea celular MCF-7. En la figura 18A se muestran los resultados de dicha amplificación observándose el producto del tamaño esperado de aprox. 2813 pb y un producto adicional de aprox. 236 pb. Este último producto se debe a la amplificación de un pseudogen procesado del gen *mre11* ubicado en el cromosoma 3. Por lo cual pese a que los oligonucleótidos fueron diseñados flanqueando un intrón del gen, el ARN que se utiliza para realizar las RT-PCR debe ser tratado con DNasa I. En la figura 18 B se muestra la amplificación del gen de *ciclofilina A*, según el análisis de la secuencia se esperaba que el ADN genómico no amplificará pero como dicho gen también presenta pseudogenes se observan productos en el entorno de los 216 pb, por lo que en este caso también es necesario tratar al ARN con DNasa I.

**Tabla 11. Muestra la secuencia de oligonucleótidos empleados para analizar la expresión de *mre11* y *ciclofilina*.**

| Gen                | Oligonucleótido sentido | Oligonucleótido antisentido   | Producto con ADNg (pb) | Producto con cDNA (pb) |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>mre11</i>       | 5'-CATGTTGGTTTGCTGCGT   | 5'-GGCTTCTCTGGCTGGTGA         | 2813                   | 236                    |
| <i>ciclofilina</i> | 5'-ATGGTCAAGGTCGCAAGCTT | 5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAACTT | No amplifica           | 216                    |

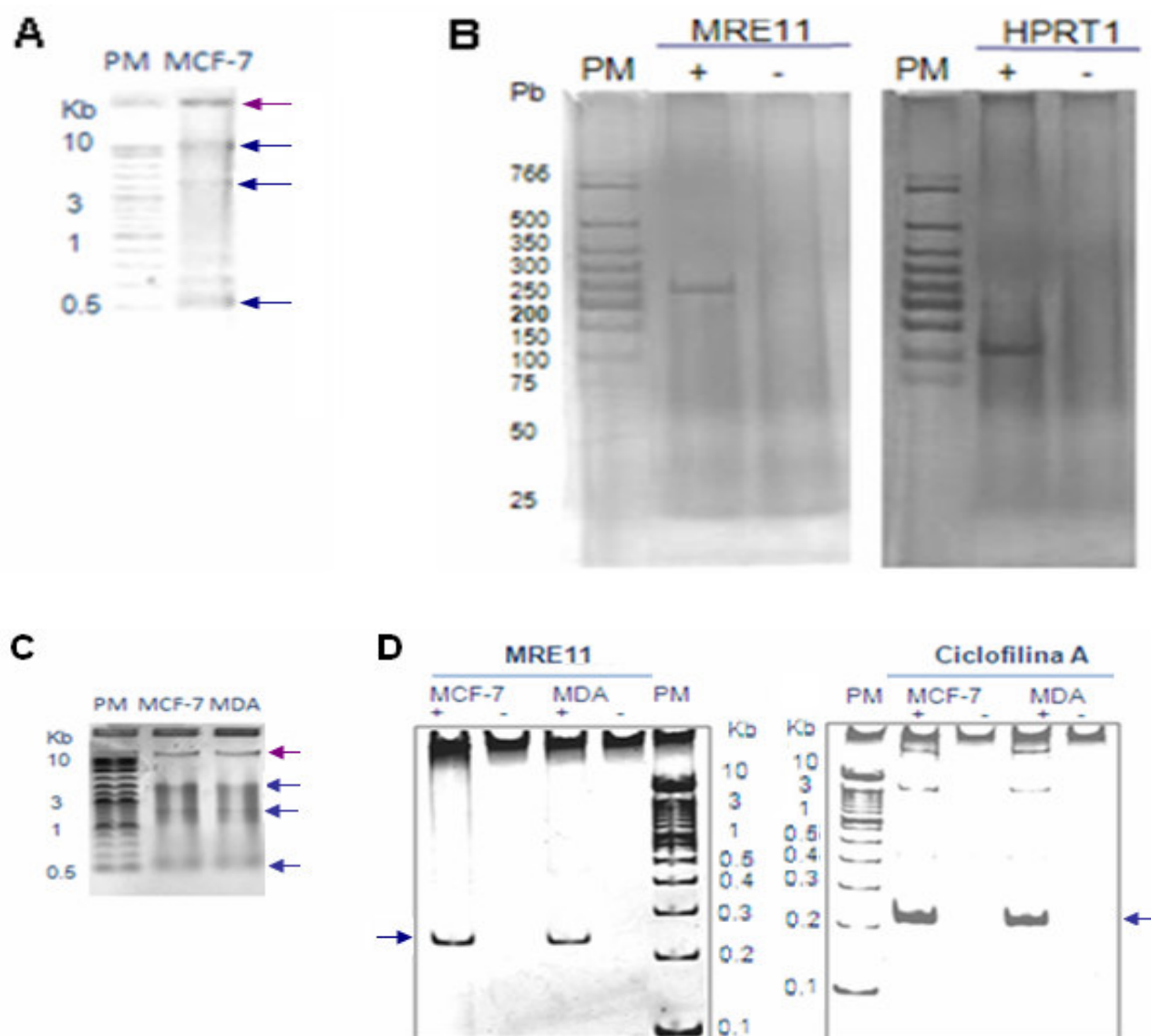


**Fig.18. Prueba de los oligonucleótidos por PCR con ADN genómico.**

A) Para amplificar el producto de PCR del gen *mre11* se realizó la PCR a una  $T_a = 55^\circ\text{C}$  y 35 ciclos. En el carril (+) se adicionaron 325 ng de ADN genómico y en el carril (-) no se adicionó ADN, B) Para amplificar el producto de PCR de ciclofilina se emplearon las mismas condiciones que en A. Agarosa 1% teñida con BrEt. Con flechas se indican los productos obtenidos y la flecha con el asterisco indica el producto de 216 pb

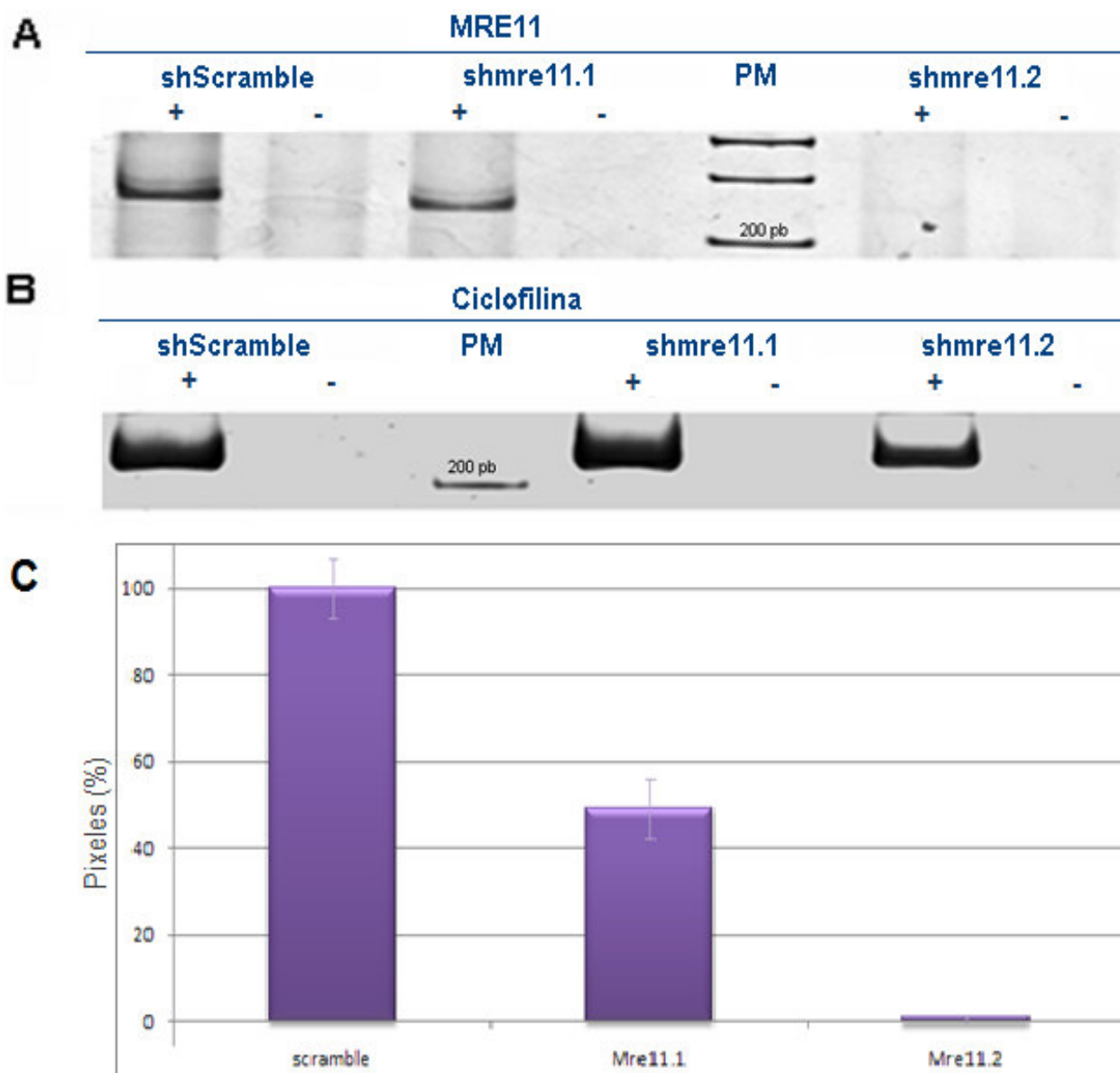
Luego de probar que los oligonucleótidos funcionan se extrajo ARN por el método de TRIzol de la línea MCF-7, se analizó la integridad del ARN, se cuantificó y posteriormente se realizó la RT-PCR, usando como control de carga la expresión del gen *hprt1* (fig. 19 A y B). Posteriormente se realizó la RT-PCR con las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (fig. 19 C y D), usando como control de carga la expresión del gen de *ciclofilina A*. En ambas líneas celulares se detectó el transcrito *mre11* a un nivel similar.





**Fig.19. Prueba de los oligonucleótidos por RT-PCR para medir la expresión de *mre11* en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.** A) ARN total de la línea celular MCF-7; B) RT-PCR, se utilizó el ARN total que se muestra en A) y oligo dT para sintetizar el ADNc. Para amplificar el ADNc de *mre11* y *hprt1* se emplearon primers específicos. En el caso de *mre11* la PCR se realizó a una Ta= 55 °C y 35 ciclos, para *hprt1* a una Ta= 62 °C y 35 ciclos. En cada carril del gel de acrilamida 6% se cargaron 10  $\mu$ l y se detectó tiñendo con nitrato de plata; B) ARN total de MCF-7 y MDA-MB-231, en cada pocillo del gel de agarosa 1% teñido con BrEt se cargaron 2  $\mu$ l de ARN, C) RT-PCR, para amplificar transcritos de *mre11* y *ciclofilina*. Para sintetizar el ADNc se empleó oligo dT y posteriormente primers específicos para el PCR. En ambos casos se realizó la PCR a una Ta= 55 °C y 35 ciclos. En cada carril del gel de acrilamida 6% se cargaron 10  $\mu$ l y se tiñó con BrEt. Los carriles (+) indican que se realizó la PCR con ADNc y los carriles (-), que se realizó la PCR con ARN total tratado con DNasa I

Debido al largo periodo (más de 16 días) que lleva realizar un ensayo de transfección para establecer una línea celular estable se decidió evaluar la capacidad de silenciamiento de las construcciones MRE11.1 y 2 de manera transitoria evaluando su efecto a las 24 h, empleando para ello RT-PCR. En la figura 20 A y B se muestra uno de los ensayos realizados y en la figura 20 C se presentan los resultados del análisis densitométrico y la normalización. Como se puede observar ambas construcciones silencian la expresión del gen *mre11*, la construcción MRE11.1 disminuye hasta un 51% la expresión y la construcción MRE11.2 hasta el 99%. Se repitió el experimento observándose que la construcción MRE11.1 disminuye la expresión en un 49% y en el caso de la construcción MRE11.2 no se obtuvo el ARN suficiente para realizar la RT-PCR porque se contó con un menor número de células debido a la menor viabilidad de las células transfectadas con dicho vector.

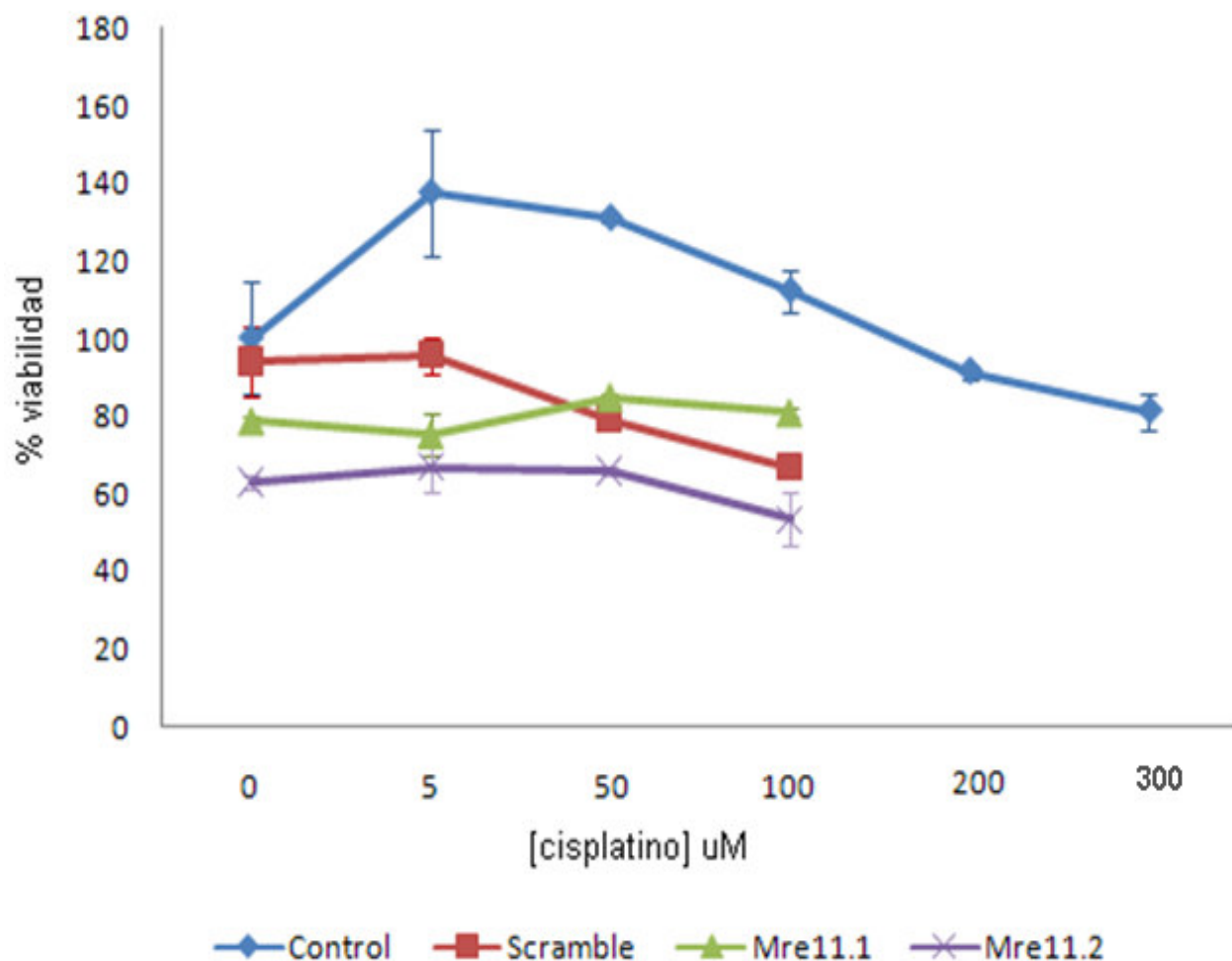


**Fig.20. Silenciamiento transitorio de la expresión de *mre11* en la línea celular MDA-MB-231.** Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 por pozo en una placa de 24 pozos. Al día siguiente se transfectaron los ADNp con lipofectamina 2000 durante 2 h, a las 24 h se despegaron las células, se juntaron dos pocillos con el mismo tratamiento y se contaron las células. Posteriormente se extrajo el ARN total con TRIzol, se cuantificó el ARN y se realizaron las RT-PCR para analizar la expresión de *ciclofilina* A A) y *mre11* B). En cada carril del gel de acrilamida 6% se cargaron 20  $\mu$ l y se tiñó con BrEt. En los carriles (+) se realizó la PCR con ADNc y en los carriles (-) se realizó la PCR con ARN total tratado con DNasaI. En C) se grafica los píxeles (%) de la expresión de *mre11* normalizado con *ciclofilina* A y en relación al scramble obtenida en las RT-PCR de la fig. 17 A y B, el análisis densitométrico se realizó con el programa Multigauge (Fujifilm).

#### **4. Evaluación de la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en las células MDA-MB-231 al silenciar el gen *mre11***

Se evaluó la sensibilidad al cisplatino midiendo la viabilidad celular de las células transfectadas con las distintas construcciones y tratadas con cisplatino, comparando los resultados con células MDA-MB-231 tratadas con lipofectamina pero sin ADN. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 21, donde se graficó el porcentaje de viabilidad celular de las células transfectadas con ADN plasmídico (scramble, *mre11.1* ó *mre11.2*) en relación a las transfectadas sin ADN para cada concentración de cisplatino. Como se había observado previamente cuando no se tratan las células con cisplatino la viabilidad de las células en las que se silencia *mre11* es menor que la viabilidad de las células en las que no se silencia dicho gen, en particular es significativamente menor la viabilidad al emplear el vector *mre11.2*.

En las condiciones evaluadas en este ensayo las células tratadas con cisplatino en las cuales se silenció el gen *mre11* empleando el vector *psilencer5.1* retro-*mre11.1* no se observó un efecto notorio en la viabilidad celular, porque si bien hay diferencias significativas en la viabilidad celular de las células transfectadas con lipofectamina sin ADN esta diferencia también se da con las células en las que se transfectó el scramble. Por otro lado, al silenciar el gen *mre11* con el vector *psilencer5.1* retro-*mre11.2* sí presentó menor viabilidad que las células tratadas con cisplatino al compararlas con el control y también con el control scramble, esta última diferencia es significativa aunque pequeña (ANOVA, comparación scramble vs *mre11.2*, diferencia de medias: 0.1700, t: 3.640,  $p < 0.05$ ).

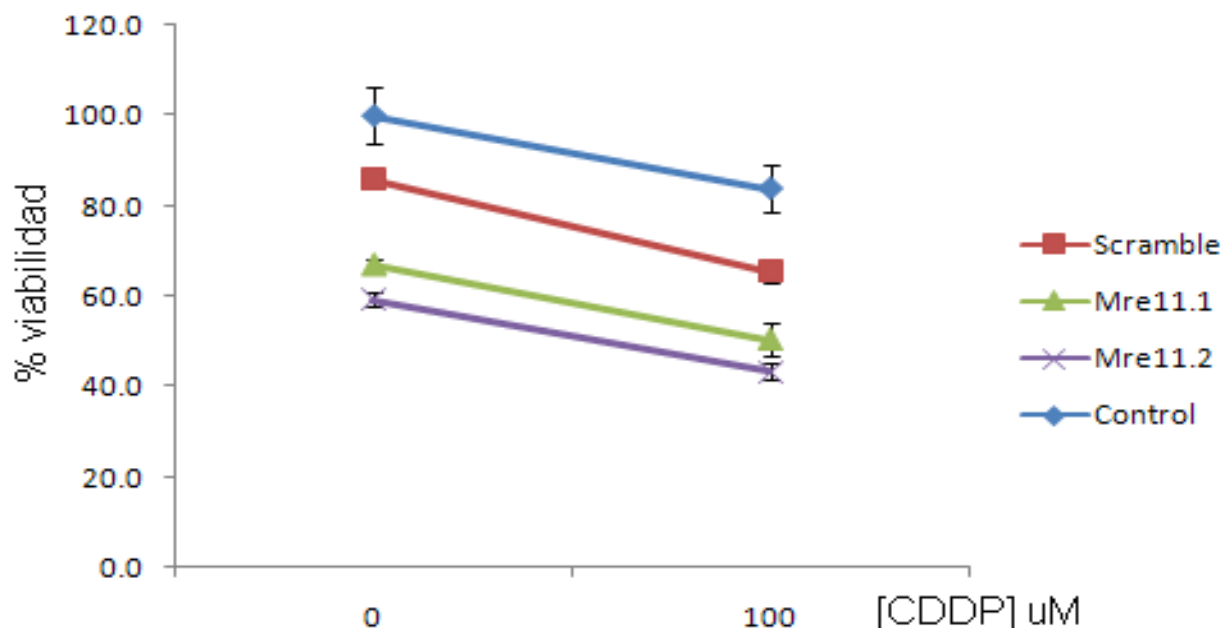


**Fig.21. Evaluación de las consecuencias de silenciar el gen *mre11* luego del tratamiento de células MDA-MB-231 con distintas concentraciones de cisplatino en términos de sensibilidad al quimioterapéutico.** Se realizó la transfección transitoria de los plásmidos scramble, *mre11.1* y *mre11.2* como se describe en la metodología, como control se emplearon células de MDA-MB-231 tratadas con lipofectamina pero sin ADN. Luego de 20 h de la transfección se trataron las células con las concentraciones indicadas de cisplatino durante 4 h y posteriormente se dejó recuperar las células durante 24 h. A las 24 hr se realizó el análisis de la viabilidad empleando MTT. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Como en las condiciones analizadas el silenciar el gen *mre11* en las células tratadas con cisplatino no tuvo un efecto notorio en la viabilidad celular se modificaron las condiciones para analizar si el efecto se hacía más evidente. Para esto se estudió el efecto de tratar a las células con 100  $\mu$ M de CDDP, ya que fue la concentración probada anteriormente con mayor efecto, se aumento el periodo de incubación con CDDP (de 4h a 23 h) y se omitió el tiempo de recuperación luego del tratamiento. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 22, donde se graficó el porcentaje de viabilidad celular de las células transfectadas con ADN plasmídico (scramble, *mre11.1* ó *mre11.2*) en relación a las transfectadas sin ADN. Como se había observado previamente cuando no se tratan las células con cisplatino la viabilidad de las células en las que se silencia *mre11* es menor que la viabilidad de las células en las que no se silencia dicho gen, en particular es significativamente menor la viabilidad al emplear el vector *mre11.2*.

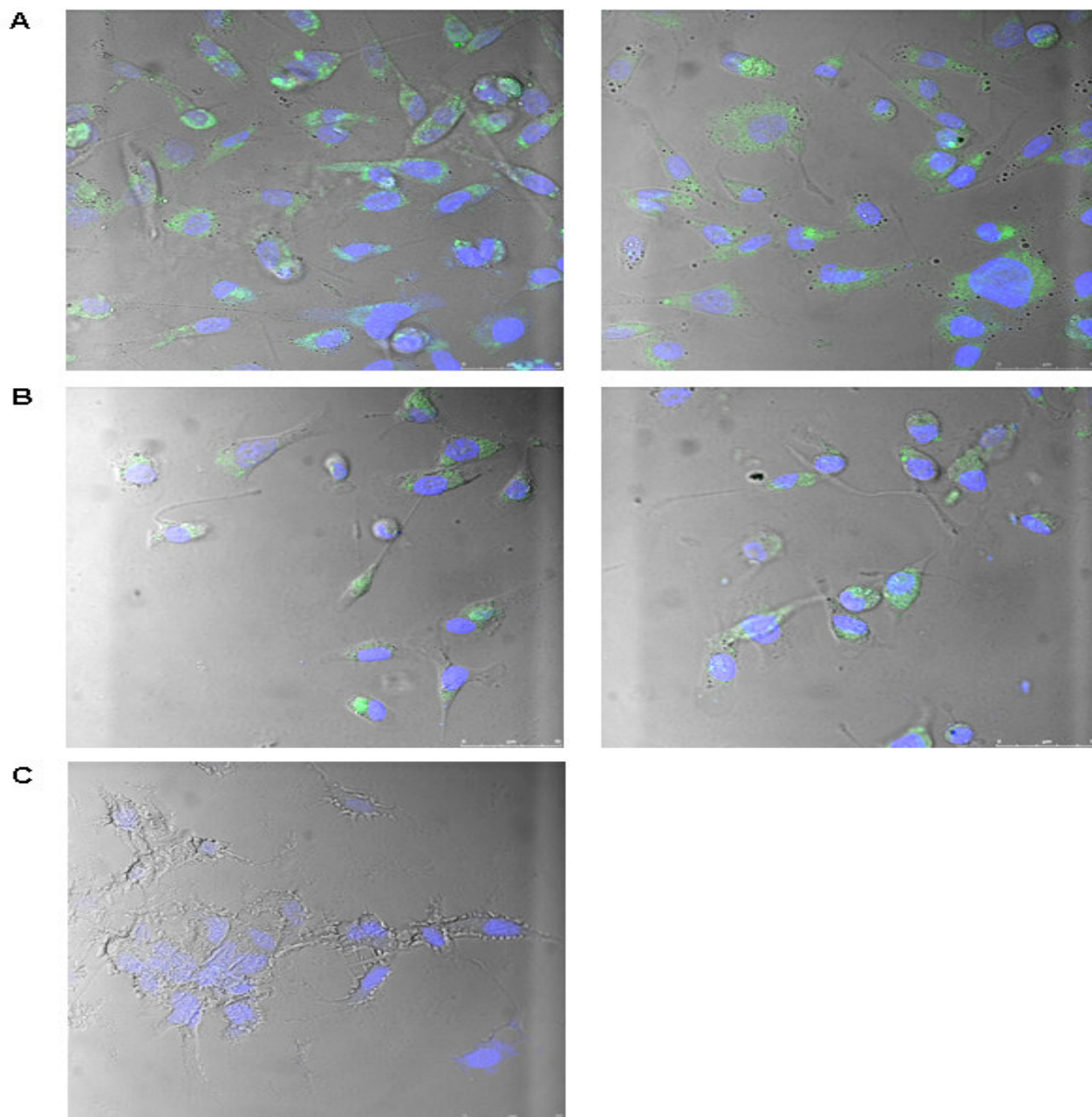
Como observamos anteriormente al emplear el vector *psilencer5.1* retro-*mre11.1* en las células tratadas con cisplatino no se observó un efecto notorio en la viabilidad celular porque si bien hay diferencias significativas en la viabilidad celular de las células transfectadas con lipofectamina sin ADN, esta diferencia también se da con las células en las que se transfectó el scramble. Al silenciar el gen *mre11* con el vector *psilencer5.1* retro-*mre11.2* las células tratadas con cisplatino sí presentaron menor viabilidad al compararlas con el control y también con el control scramble (comparación scramble vs *mre11.2*,  $p < 0.05$ ). Por lo cual el silenciar el gen *mre11* con el vector *psilencer5.1* retro-*mre11.2* aumenta la sensibilidad de las células al tratamiento con CDDP.

Para controlar que el método de transfección empleado fue eficiente se cotransfectó el vector psilencer5.1 retro-scramble con un vector que expresa GFP en las mismas condiciones empleadas para transfectar las construcciones psilencer5.1 retro-mre11.1 y 2. Se evaluó la expresión de GFP por microscopía confocal obteniéndose que la eficiencia de transfección fue de un  $92\% \pm 2\%$ , por lo cual el método de transfección es eficiente. En la figura 23 se muestran imágenes representativas de dicho ensayo.



**Fig.22. Evaluación de las consecuencias de silenciar el gen *mre11* luego del tratamiento de células MDA-MB-231 con cisplatino en términos de sensibilidad al quimioterapéutico.** Se realizó la transfección transitoria de los plásmidos scramble, mre11.1 y mre11.2 como se describe en la metodología, como control se emplearon células de MDA-MB-231 tratadas con lipofectamina pero sin ADN. Luego de 12 h de la transfección se trataron las células con las concentraciones indicadas de cisplatino durante 23 h. Una vez transcurridas las 23 hr se realizó el análisis de la viabilidad empleando MTT. El ensayo se realizó por duplicado y cada tratamiento se realizó por triplicado.





**Fig.23. Evaluación de la eficiencia de transfección midiendo la expresión de GFP por microscopía confocal.** Se cultivaron  $1.5 \times 10^5$  células MDA-MB-231 en cada pozo, en placa de 24 pozos. Al día siguiente se transfectaron 800 ng de pEGFP-C2 y/ o 400 ng de psilencer5.1 retro-scramble empleando lipofectamina 2000 durante 2. A las 47 h de cada transfección se fijaron y montaron (Vectashield + DAPI) las células para evaluar la expresión de GFP por microscopía confocal. A) y B) Imágenes representativas de la cotransfección con pEGFP-C2 y psilencer5.1 retro-scramble C) Control negativo, células transfectadas con 400 ng de psilencer5.1 retro-scramble. Cada transfección se realizó un duplicado. El manejo de las imágenes se realizó con el programa LAS AF Versión 1.8.0, Leica Microsystems.

## VII. DISCUSIÓN

La realización de este proyecto permitió determinar que la alteración de la expresión de MRE11 y RAD50 en pacientes mexicanas con CM es frecuente. Al analizar la expresión de MRE11 en biopsias de pacientes con CM se observó que un 79% de los tejidos mamarios tumoral evaluados tuvieron una intensidad de expresión de MRE11 fuerte, el 16% moderada, el 3% débil y un 2% no expresan MRE11, en cambio, en las biopsias de tejido mamario normal el 100% tuvieron una intensidad de expresión fuerte. Esto indica que hubo una reducción de la expresión de MRE11 en el tejido tumoral del 24% si consideramos los tumores con intensidad fuerte MRE11. En el estudio publicado por Bartkova et. al, 2008 observaron que la expresión de MRE11 en los tumores de los pacientes con CM se redujo en un 7%.

En el caso de RAD50 se observó que el 43% de los tejidos tumoral analizados presentaron una intensidad de expresión fuerte de RAD50, el 29% moderada, el 24% débil y un 4% no expresan RAD50. Mientras que en las biopsias de tejido mamario normal el 57% tuvieron una intensidad de expresión fuerte, el 21% moderada, el 21% débil y ninguna nula. Por lo cual hubo una reducción de la expresión de RAD50 en el tejido tumoral del 14% si consideramos los tumores con intensidad fuerte. En el estudio publicado por Bartkova et. al, 2008 observaron que la expresión de RAD50 en los tumores de los pacientes con CM se redujo en un 3%. Cabe destacar que las características tanto patológicas como poblacionales de las muestras son diferentes pero pese a dichas diferencias en ambos estudios se observa una reducción en la expresión de MRE11 y RAD50 en el tejido de mama tumoral por lo cual sería

interesante evaluar la relevancia de la alteración de la expresión de dichas proteínas como marcadores pronósticos y/ o predictivos.

Al analizar la expresión de las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 en las líneas celulares de cáncer da mama MCF-7, MDA-MB-231 y ZR-75-1 se observó que dichas líneas celulares presentan un patrón de expresión diferencial, lo cual resulta interesante porque estas diferencias podrían explicar algunas diferencias fenotípicas en dichas líneas celulares, como por ejemplo, la mayor sensibilidad de la línea celular MCF-7 al tratamiento con cisplatino comparado con la línea celular MDA-MB-231<sup>84</sup>. Además hasta la fecha no hay reportes que sean de nuestro conocimiento, de estudios donde se haya analizado la expresión de estas proteínas en líneas celulares de cáncer de mama por western blot.

Por otro lado, al silenciar el gen *mre11* en la línea celular MDA-MB-231 se observaron diferencias en viabilidad celular de las células transfectadas con la construcción MRE11.1 en comparación con la construcción MRE11. 2 (79% vs 63 %) no tratadas con cisplatino. Esta diferencia se podría explicar por el mayor grado de silenciamiento observado al utilizar la construcción MRE11.2, que disminuye la expresión del transcrito de *mre11* hasta en un 99% aprox. en comparación con la construcción MRE11.2 que la disminuye en aprox. 51%, ya que el gen *mre11* es esenciales en vertebrados debido a su relevante papel en la mantención de la integridad del genoma<sup>63</sup>.

En cuanto a la evaluación de las consecuencias de silenciar el gen *mre11* luego del tratamiento de células MDA-MB-231 con cisplatino empleando el vector psilencer5.1 retro-mre11.1 no se observó un efecto notorio en la viabilidad celular en las condiciones analizadas. En cambio utilizando el vector psilencer5.1 retro-mre11.2 las células transfectadas sí presentaron una menor viabilidad al compararlas con el control y con el control scramble por lo cual disminuir fuertemente la expresión del gen *mre11* hace a las células MDA-MB.231 más sensibles al tratamiento con cisplatino. Estos resultados sugieren la posibilidad de que en aquellos pacientes donde el nivel de expresión de MRE11 en el tejido mamario tumoral sea bajo podrían ser más sensibles al tratamiento con cisplatino, por lo cual sería interesante analizar si esta respuesta se observa en modelos *in vivo*.

## VIII. APÉNDICE (soluciones).

### **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%, PIS<sub>t</sub> (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  $\beta$ -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 Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O. 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. 1 L.

**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

**Amortiguadores para la obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos:**

- Amortiguador A: HEPES 10 mM, pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 10 mM, DTT 1 mM

- Solución B: Nonidet NP40 solución al 10%, 20 ul Complete 4x y 1 ul E64

- Amortiguador C: HEPES 20 mM, pH 7, NaCl 0.4M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1mM.

**PBS pH 7.4:**

NaCl 137 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.47 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  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.

**Solución MTT:**

Se pesan 0.5 mg de MTT por cada ml de DMEM, se filtra con filtro y se guarda en oscuridad.

**Solución solvente del MTT:**

Al isopropanol se le agrega 4 mM HCl y 0.1% Nondet P-40 (NP40).

**Solución stock de Cisplatino:**

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.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
2. Cotran RS, Robbins SL, y Kumar V, Patología Estructural y Funcional, Mc-Graw Hill, 6ª ed., 1999.
3. Rubino A, Fissi S, Secreto G. Ann Ital Chir. *"Bilateral breast cancer in a male patient with hepatocellular carcinoma. A case report"* Ann Ital Chir. 2008;79(2):117-9.
4. CancerStats: Worldwide cancer. London: Cancer Research UK. April 2005.
5. World Health Organization. Fact sheet No. 297. Cancer. WHO, Geneva: February 2006.
6. 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.
7. Martínez-Montañez OG, Uribe-Zúñiga P, Hernández-Ávila M. *"Public policies for the detection of breast cancer in Mexico"*. Salud Publica Mex 2009; 51(2):S350-S360.
8. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología, Anuarios de Morbilidad, Secretaría de Salud, 2000-2006.
9. <http://www.cancer.org/>
10. Marion Kiechle, Alfons Meindl. *"Predisposition for Breast Cancer"*. Jeffrey S. Ross, Gabriel N. Hortobagyi (ed). Molecular Oncology of Breast Cancer. Sudbury, Massachusetts 2004; 48-59.

11. King, M.C., Marks, J.H., Mandell, J.B. *"Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2"*, Science 2003; 302: 643-646.
12. 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.
13. Elston C, Ellis I. *"Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long- term follow-up"*. Histopathology 1991; 19 : 403-10.
14. Bloom H, Richardson W. *"Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 had been followed for 15 years"*. Br J Cancer 1957; 9: 359-77.
15. Jeffrey S. Ross, Nadia Harbeck. *"Prognostic and Predictive factors overview"*. Jeffrey S. Ross, Gabriel N. Hortobagyi (ed). Molecular Oncology of Breast Cancer. Sudbury, Massachusetts 2004; 128-141.
16. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *"p53 mutations in human cancers"*. Science 1991, 253:49-53.
17. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, et al. *"Molecular portraits of human breast tumours"*. Nature 2000; 406:747–752.
18. Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G. *"Genomic basis for breast cancer: advances in personalized medicine"*. Salud Publica Mex 2009; 51(2): S197-S207.
19. Deng, C. X., and Brodie, S. G. *"Roles of BRCA1 and its interacting proteins"*. Bioessays 2000; 22: 728-737.

- 20.** Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. *"BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures"*. Genes Dev 2000; 14: 927-939.
- 21.** Steven A. Narod. *"Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer"* Nature Reviews Cancer 2002; 2: 113-123.
- 22.** Simpson JF, Gray R, Dressler LG, et al. *"Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189"*. J Clin Oncol 2000 .18 (10): 2059-69.
- 23.** M. P. Decatris, S. Sundar and K. J. O'Byrne. *"Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status"*. Cancer Treatment Reviews 2004. 30 (1): 53-81.
- 24.** Cara A. Rabik and M. Eileen Dolan. *"Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents"* Cancer Treat Rev. 2007; 33(1): 9–23.
- 25.** Zahid H Siddik. *"Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance"*. Oncogene 2003; 22: 7265–7279.
- 26.** 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.
- 27.** 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.

- 28.** Anamitra Bhattacharyya, Uy S. Ear, Beverly H. Koller, Ralph R. Weichselbaum, and Douglas K. Bishop. *"The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Is Required for Subnuclear Assembly of Rad51 and Survival following Treatment with the DNA Cross-linking Agent Cisplatin"*. J. Biol. Chem., 2000; 275 (31): 23899-23903.
- 29.** Lundin, C. et al. *"Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells"*. Mol. Cell Biol 2002; 22: 5869–5878.
- 30.** Saintigny, Y. et al. *"Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells"*. EMBO J. 2001; 20: 3861–3870.
- 31.** Arnaudeau, C., Lundin, C. & Helleday, T. *"DNA doublestrand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells"*. J. Mol. Biol 2001; 307: 1235–1245.
- 32.** 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.
- 33.** 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.
- 34.** Patel, K. J. & Joenje, H. *"Fanconi anemia and DNA replication repair"*. DNA Repair 2007; 6: 885–890.
- 35.** Meena Shrivastav<sup>1</sup>, Leyma P De Haro<sup>1</sup>, Jac A Nickoloff. *"Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice"*. Cell Research 2008; 18:134-147.

- 36.** Thomas Helleday. "*Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells*". Mutation Research 2003; 532: 103–115.
- 37.** Michael van den Bosch, Ronan T. Bree & Noel F. "*The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes*". EMBO reports 2003; 4(9): 844-849.
- 38.** Fayza Daboussi, Anne Dumay, Fabien Delacôte and Bernard S. Lopez. "*DNA double-strand break repair signalling: The case of RAD51 post-translational regulation*". Cellular Signalling 2002; 14(12): 969-975.
- 39.** Jian-Min Chen, David N. Cooper, Nadia Chuzhanova, Claude Férec & George P. Patrinos. "*Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease*". Nature Reviews Genetics 2007; 8: 762-775.
- 40.** Nora Assenmacher . Karl-Peter Hopfner. "*MRE11/RAD50/NBS1: complex activities*". Chromosoma 2004; 113: 157–166.
- 41.** R. Scott Williams, Jessica S. Williams, and John A. Tainer. "*Mre11–Rad50–Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template*". Biochem Cell Biol 2007; 85(4): 509–520.
- 42.** 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.
- 43.** Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD. "*The Mre11 complex is required for ATM activation and the G(2)/M checkpoint*". EMBO 2003; J 22: 6610–6620.

44. 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.
45. Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. *"Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation"*. Oncogene 2004; 23: 3122–3127.
46. Lee JH, Paull TT. *"Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/RAD50/Nbs1 complex"*. Science 2004; 304: 93–96.
47. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. *"Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage"*. EMBO J 2003; 22: 5612–5621.
48. Erin Olson, Christian J. Nievera, Alan Yueh-Luen Lee, Longchuan Chen, and Xiaohua Wu. *"The Mre11-Rad50-Nbs1 Complex Acts Both Upstream and Downstream of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related Protein (ATR) to Regulate the S-phase Checkpoint following UV Treatment"*. J. Biol. Chem 2007; 282: 22939-22952.
49. Mark O'Driscoll and Penny A. Jeggo. *"The role of double-strand break repair - insights from human genetics"*. Nature Reviews 2006; 7: 45-54.
50. Katri Heikkinen . *"RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability"*. Carcinogenesis 2006; 27 (8): 1593–1599.
51. J. Tommiska et.al. *"Evaluation of RAD50 in familiar breast cancer predisposition"*. Int.J.Cancer 2006; (118): 2911-2916.
52. Jiachun L. *"Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women>55 years"*. Carcinogenesis 2006; 27 (11): 2209–2216.

- 53.** Huan-Ming Hsu. *“Breast Cancer Risk Is Associated with the Genes Encoding the DNA Double-Strand Break Repair Mre11/Rad50/Nbs1 Complex”*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16(10): 2024-2032.
- 54.** Toshikatu Fukuda. *“Alterations of the Double-Strand Break Repair Gene MRE11 in Cancer”*. Cancer Research 2001; 61: 23–26.
- 55.** Karin Söderlund, M.Sc., Olle Stål, et. al. *“Intact Mre11/Rad50/Nbs1 Complex Predicts Good Response To Radiotherapy In Early Breast Cancer”*. Int J of Radiation Oncology Biol Phys 2007; 68 (1): 50-58.
- 56.** J Bartkova, J. Tommiska, L. Oplustilova et. al. *“Aberrations of the MRE11–RAD50–NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene”*. Molecular Oncology 2008; 2: 296–316.
- 57.** Gennery,A.R. *“Primary immunodeficiency syndromes associated with defective DNA double-strand break repair”*. Br. Med. Bull. 2006; 71–85.
- 58.** 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.
- 59.** Erin Olson, Christian J. Nievera, et. al. *“The Mre11 Complex Mediates the S-Phase Checkpoint through an Interaction with Replication Protein A”*. Molecular and Cellular Biology 2007; 27 (17): 6053-6067.
- 60.** Alan Yueh-Luen Lee, Enbo Liu, and Xiaohua Wu. *“The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex Plays an Important Role in the Prevention of DNA Rereplication in Mammalian Cells”*. J. Biol. Chem. 2007; 282 (44): 32243-32255.

- 61.** 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.
- 62.** Haruyuki Takemura, V. Ashutosh Rao et. Al. *"Defective Mre11-dependent Activation of Chk2 by Ataxia Telangiectasia Mutated in Colorectal Carcinoma Cells in Response to Replication-dependent DNA Double Strand Breaks"*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2006; 281 (41) : 30814–30823.
- 63.** 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.
- 64.** Anthony T. Vo, Fengxue Zhu, XilingWu. et. al. *"hMRE11 deficiency leads to microsatellite instability and defective DNA mismatch repair"*. EMBO reports 2005; 6 (5): 438-444.
- 65.** D. S. F. Biard. *"Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones"*. Nucleic Acids Research 2007; 35 (11): 3535–3550.
- 66.** Ze-Huai Zhong, Wei-Qin Jiang, Anthony J. Cesare , et. al. *"Disruption of Telomere Maintenance by Depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 Complex in Cells That Use Alternative Lengthening of Telomeres"* J. Biol. Chem. 2007; 282 (40): 29314-29322.
- 67.** Srinivasan Madhusudan, Mark R. Middleton. *"The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer"* Cancer Treatment Reviews 2005; 31: 603–617.



68. Siddik ZH. "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance". *Oncogene* 2003; 22: 7265–79.
69. 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.
70. Ferrer M, de Winter JP, Mastenbroek DC, et. al. "Chemosensitizing tumor cells by targeting the Fanconi anemia pathway with an adenovirus overexpressing dominant-negative FANCA". *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 539–46.
71. 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.
72. Crul M, van Waardenburg RC, Bocxe S, van Eijndhoven MA, Pluim D, Beijnen JH, et al. "DNA repair mechanisms involved in gemcitabine cytotoxicity and in the interaction between gemcitabine and cisplatin". *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 275–82.
73. Matthews, D. J. et al. "Pharmacological abrogation of S-phase checkpoint enhances the anti-tumor activity of gemcitabine in vivo". *Cell Cycle* 2007; (6):104–110.
74. <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00475917?sessionid=94D09AADF5BBF70FC2857F92FBE6C03A?order=12>
75. Hideaki Dote William E. Burgan, Kevin Camphausen and Philip J. Tofilon. "Inhibition of Hsp90 Compromises the DNA Damage Response to Radiation". *Cancer Res* 2006; 66 (18): 9211-20.

76. Hideaki Dote William E. Burgan, Kevin Camphausen and Philip J. Tofilon. *"Inhibition of Hsp90 Compromises the DNA Damage Response to Radiation"*. Cancer Res 2006; 66 (18): 9211-20.
77. Hao Mimi Tran, Guoli S. *"Mutant Nbs1 enhances cisplatin-induced DNA damage and cytotoxicity in head and neck cancer"*. Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 131: 477-84.
78. Bradford MM. *"A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding"*. Anal Biochem 1976, 72: 248–254.
79. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. *"Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells"*. Nature 2001; 411: 494–498.
80. Brummelkamp RT, Bernards R, Agami R. *"A system of stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells"*. Science. 2002;296:550–553.
81. [http://www.ambion.com/techlib/misc/psilencer\\_converter.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html)
82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=geo>. Para **MCF-7**: Títulos: GDS847 / 8278 / MRE11A / Homo sapiens, GDS2744 / 209349\_at / RAD50 / Homo sapiens, GDS2744 / 217299\_s\_at / NBN / Homo sapiens. Para **ZR-75-1**: GDS848 / 8278 / MRE11A / Homo sapiens, GDS848 / 17251 / RINT1 / Homo sapiens (Rad50) y GDS848 / 1330 / NBN / Homo sapiens(Nbs1). MDA-MB-231: GDS483 / 205395\_s\_at / MRE11A / Homo sapiens, GDS848 / 17251 / RINT1 / Homo sapiens (Rad50) y GDS483 / 218598\_at / RINT1 / Homo sapiens (Nbs1).

- 83.** Marlis Frankenberg-Schwager, Dorothea Kirchermeier, Goetz Greif, et. al. "*Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae**". *Toxicology* 2005; 212: 175–184.
- 84.** Niels Eckstein, Kati Servan, Luc Girard, Di Cai, Georg von Jonquieres et. al. "*Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Analysis Identifies Amphiregulin as a Key Factor for Cisplatin Resistance of Human Breast Cancer Cells*". *The Journal of Biological Chemistry* 2008; 283 (2): 739–750.