



VNIVERSITAT D'VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Fisiología

“Relevancia de la vía de aurora quinasa y su papel como diana en la resistencia a platino e inhibidores de PARP en cáncer de ovario de alto grado y cáncer de mama triple negativo”

Junio 2024

Juan José Martínez Pretel

Dirigida por:

Dra. Begoña Pineda Merlo

Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo

Dra. Begoña Pineda Merlo, profesora permanente laboral del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

Dr. José Alejandro Pérez Fidalgo, médico adjunto del Servicio de oncología del Hospital Clínico de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Relevancia de la vía de aurora quinasa y su papel como diana en la resistencia a platino e inhibidores de PARP en cáncer de ovario de alto grado y cáncer de mama triple negativo”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Juan José Martínez Pretel, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 10 de julio de 2024.

Fdo.

Agradecimientos

Pues aquí estamos, escribiendo los agradecimientos de una tesis que tantas veces me he replanteado terminar y que tantos dolores de cabeza me ha provocado durante todos estos años. La gente siempre dice que la tesis doctoral es algo “insufrible” y razón no les falta, pero ahora que lo miro todo con perspectiva creo que también es de lo más bonito que he hecho nunca. Estos años me ha permitido, no solo crecer como persona y hacer lo que creo que es una pequeña aportación a la ciencia, sino conocer gente maravillosa por el camino, que al final siempre es lo más importante.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Begoña y Alejandro por permitirme haber cumplido este sueño que es poder ser doctor, sé que el camino no ha sido siempre de rosas, pero estaré siempre en deuda con vosotros por la confianza depositada en mí.

En segundo lugar, aunque no menos importante, a Paloma, la estudiante del ARA que hace 3 años vino para hacer unas prácticas y que nunca imaginé que se convertiría en una persona tan importante para mí. Bien podría aparecer tu nombre en esta tesis junto al mío, aunque no creo me dejen ponerlo. Solo tú sabes todos los momentos que hemos pasado juntos, tantas risas, tanta oreja de Van Gogh, tantas tardes que nos dejaban el cerebro que no podíamos decir dos palabras juntas... Yo termino aquí, pero tu empiezas la tesis ahora, aunque conociéndote (y creo que te conozco bien) no se me ocurre una persona mejor para hacerla.

Agradecimientos

Agradecer también a todas las personas que han pasado por el laboratorio durante todos estos años: Karina, María, Jan, Marta, Lorena, Lidia, Miriam, Rafa, Ana, Santi, Julia ... Por vuestro apoyo y compañía, espero que también os haya servido para aprender algo, aunque sea poco.

A mi querido labo 2: Iris, Anna, Sandra, Meiri, Edu, Ray, Birli y Anna Agreda. Me acogisteis cuando no era más que un chaval de 21 años que no sabía hacer ni un pase y me hicisteis ver que la vida en el laboratorio tampoco estaba tan mal.

A todos mis compañeros de la facultad de medicina que he conocido en el camino, no os puedo nombrar a todos, pero esta tesis no sería posible sin vosotros.

A mis amigos, los viejos y los nuevos, los cuales han sido la única razón por la que he mantenido la cordura durante estos años. Siempre seréis lo mejor de mi vida.

A mis padres y familia, por apoyarme incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado y ser un ejemplo de vida para mí. Nunca podré agradecerlos lo suficiente todo lo que habéis hecho por mí.

De todo corazón, gracias.

Índice

1.	<i>INTRODUCCIÓN.</i>	1
1.1.	El cáncer como enfermedad.	3
1.2.	El cáncer de ovario.	3
1.2.1.	Epidemiología.	4
1.2.2.	Etiología.	5
1.2.3.	Factores de riesgo.	7
1.2.4.	Clasificación.	8
1.2.4.1.	Clasificación histológica.	9
1.2.4.1.1.	Cáncer de ovario de células germinales.	9
1.2.4.1.2.	Cáncer de ovario del estroma del cordón sexual.	9
1.2.4.1.3.	Cáncer de ovario epitelial.	10
1.2.4.2.	Clasificación anatómica estadificada.	14
1.2.5.	Detección y diagnóstico.	19
1.2.6.	Tratamiento.	20
1.2.6.1.	Cirugía citorreductora.	21
1.2.6.2.	Quimioterapia.	22
1.2.6.3.	Terapia dirigida para el tratamiento del cáncer de ovario.	23
1.2.6.3.1.	Bevacizumab.	24
1.2.6.3.2.	Inhibidores de PARP.	25
1.2.7.	Enfermedad recurrente y aparición de resistencias en el cáncer de ovario.	28
1.2.7.1.	Tratamiento de los tumores resistentes a inhibidores de PARP.	32
1.3.	El cáncer de mama.	34
1.3.1.	Clasificación patológica.	34
1.3.2.	Tratamiento.	35

1.3.2.1. Nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.	37
1.3.3. Resistencia a inhibidores de PARP en cáncer de mama triple negativo.	38
1.4. Auroras quinasas como dianas para el tratamiento del CO y el CM.	39
1.4.1. Clasificación.	40
1.4.1.1. Aurora quinasa A.	40
1.4.1.2. Aurora quinasa B.	41
1.4.1.3. Aurora quinasa C.	41
1.4.2. Estructura.	42
1.4.2.1. Dominio quinasa.	42
1.4.2.2. Dominios no catalíticos.	43
1.4.3. Aurora quinasa A en el cáncer.	44
1.4.4. Inhibidores de aurora quinasa A para el tratamiento del cáncer.	47
1.4.4.1. Utilización de MLN8237 en monoterapia.	48
1.4.4.2. Combinación de alisertib con otras terapias.	50
1.4.4.2.1. Combinación de alisertib con quimioterapia y radioterapia.	50
1.4.4.2.2. Combinación de alisertib con terapias dirigidas.	51
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	53
2.1. Hipótesis.	55
2.2. Objetivos.	57
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	59

3.1.	Líneas celulares y cultivo celular.	61
3.1.1.	Líneas celulares.	61
3.1.2.	Mantenimiento de los cultivos celulares.	63
3.1.3.	Generación de stock celular y congelación.	65
3.1.4.	Descongelación de líneas celulares.	65
3.2.	Fármacos utilizados.	66
3.3.	Ensayo de viabilidad celular “<i>in vitro</i>”.	67
3.4.	Generación de líneas celulares resistentes.	68
3.4.1.	Líneas celulares resistentes a olaparib.	68
3.4.2.	Líneas celulares resistentes al carboplatino.	69
3.5.	Secuenciación comparativa de las líneas celulares sensibles y resistentes.	70
3.6.	Análisis de expresión génica.	72
3.6.1.	Extracción y cuantificación de ARN.	73
3.6.2.	Transcripción inversa a ADN complementario.	74
3.6.3.	PCR cuantitativa en tiempo real.	75
3.7.	Análisis de la expresión proteica.	76
3.7.1.	Extracción y cuantificación de proteínas.	76
3.7.2.	Western blot.	77
3.7.3.	Ánalisis cuantitativo del Western Blot.	80
3.8.	Silenciamiento de la expresión génica mediante ARN pequeño de interferencia.	80
3.9.	Ensayo de apoptosis por citometría de flujo.	82
3.10.	Ensayo de combinación de olaparib y alisertib.	84
3.11.	Estudios “<i>in silico</i>”.	85

3.12. Análisis estadístico.	86
4. RESULTADOS.	89
4.1. Generación de líneas celulares resistentes a olaparib.	91
4.2. Generación de líneas celulares resistentes a carboplatino.	94
4.3. Resistencia cruzada entre olaparib y carboplatino en las líneas celulares resistentes.	95
4.4. Secuenciación de las líneas celulares sensibles y resistentes a olaparib y carboplatino.	100
4.5. Expresión de aurora quinasa A en las líneas celulares parentales y resistentes a olaparib y carboplatino.	103
4.5.1. Expresión de aurora quinasa A a nivel de ARNm.	103
4.5.2. Expresión de aurora quinasa A a nivel de proteína.	105
4.6. Inhibición de la aurora quinasa A para el tratamiento de resistencias a olaparib y carboplatino.	108
4.6.1. Inhibición farmacológica.	108
4.6.2. Inhibición mediante silenciamiento de ARNm.	116
4.7. Combinación de olaparib con alisertib para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario de alto grado sensible y resistente a olaparib y carboplatino.	124
4.8. Determinación del posible valor pronóstico de la aurora quinasa A en pacientes de cáncer de ovario y cáncer de mama triple negativo.	133
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	137

6. BIBLIOGRAFIA.	<hr/> 151
7. ANEXOS.	<hr/> 189

Abreviaturas

AAM	Administración de Alimentos y Medicamentos
ADNc	ADN complementario
AJCC	Comité Conjunto Americano del Cáncer
ALI	Alisertib
ARID1A	Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1
ARNpi	ARN pequeño de interferencia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	Ataxia-telangiectasia mutada
AURKA	Aurora quinasa A
AURKB	Aurora quinasa B
AURKC	Aurora quinasa C
AURKs	Auroras quinasas
BCA	Ácido bicinconínico
BRCA1	Gen del cáncer de mama 1
BRCA2	Gen del cáncer de mama 2
BRD4	Proteína 4 que contiene un bromodomino
CA125	Antígeno canceroso 125
CBP	Carboplatino
CC	Cirugía citorreductora
CDC20	Proteína del ciclo de división celular 20
CDH1	Cadherina 1
CHK1	Quinasa de control 1
CI	Índice de combinación

CM	Cáncer de mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
C-MYC	Proteína reguladora génica C
CO	Cáncer de ovario
COAG	Cáncer de ovario de alto grado
COCC	Carcinoma de ovario de células claras
COCG	Cáncer de ovario de células germinales
COE	Cáncer de ovario epitelial
COECS	Cáncer de ovario del estroma de cordón sexual
COEN	Carcinoma de ovario endometrioide
COM	Carcinoma de ovario mucinoso
COS	Cáncer de ovario seroso
COSAG	Cáncer de ovario seroso de alto grado
COSBG	Cáncer de ovario seroso de bajo grado
CPC	Complejo pasajero cromosómico
Ct	Valor umbral del número de ciclos
DLP	Doxorrubicina liposomal pegilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DS	Desviación estándar
Fa	Fracción afectada por la dosis
Fc	Umbral crítico comparativo
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>

Abreviaturas

HDAC	Proteína histona deacetilasa
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano de tipo 2
HM	Homocigótica
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HT	Heterocigótica
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IHQ	Inmunohistoquímica
ILP	Intervalo libre de platino
ILT	Intervalo libre de tratamiento
IP	Yoduro de propidio
iPARP	Inhibidores de PARP
KRAS	Oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten
LPCT	Linfoma periférico de células T
Mad2	<i>Mothers Against Decantaplegic 2</i>
MDM2	Murino doble minuto 2
MLL3	Histona-lisina N-metiltransferasa 2C
MLL4	Histona-lisina N-metiltransferasa 2B
MMEJ	Unión de extremos mediada por micro-homología
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MRE11	Proteína reparadora de doble cadena
MTT	Reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)
MYC	Proteína reguladora génica
NRAS	Homólogo del oncogén viral RAS del neuroblastoma

OLA	Olaparib
OMS	Organización mundial de la salud
P53BP1	Proteína 1 de unión a P53
PARG	PAR glicohidrolasa
PARP-1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1
PARP-2	Poli (ADP-ribosa) polimerasa-2
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la enzima polimerasa
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PDX	Xenoinjerto derivado de pacientes
PI3KCA	Gen de la fosfoinositol 3-quinasa
POLQ	ADN polimerasa θ
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
PTIP	Proteína que interactúa con el dominio de transactivación Pax2
Rb	Retinoblastoma
RDC	Rotura de doble cadena
RE	Receptor hormonal de estrógenos
REB	Reparación por escisión de bases
RH	Recombinación homóloga
RP	Receptor hormonal de progesterona
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SBF	Suero bovino fetal
SCHMO	Síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario

Abreviaturas

SG	Supervivencia global
SLiMS	Motivos lineales cortos
SLP	Supervivencia libre de progresión
TAC	Tomografía axial computarizada
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline con 0,1% de Tween-20</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas Program</i>
TP53	Gen de la proteína tumoral p53
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice de figuras

Figura 1: Incidencia y mortalidad del cáncer en mujeres de todas las edades a nivel mundial en 2020.	4
Figura 2: Representación esquemática de la estructura del ovario.	5
Figura 3: Evaluación y tratamiento del COE y la enfermedad recurrente.	20
Figura 4: Mecanismo molecular de muerte celular por letalidad sintética inducida por los iPARP.	26
Figura 5: Mecanismos de resistencia a iPARP.	31
Figura 6: Localización de las AURKs durante las diferentes fases de la mitosis.	40
Figura 7: Representación esquemática de la estructura de las AURKs y sus diferentes SLiMS.	44
Figura 8: Representación esquemática del mecanismo a través del cual la sobreexpresión de la AURKA está implicada en la generación del tumor.	47
Figura 9: Representación esquemática del proceso de secuenciación realizado por la Unidad de Medicina de Precisión del IIS INCLIVA.	72
Figura 10: Esquema de la estrategia de análisis citométrico de la apoptosis.	84
Figura 11: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA.	93
Figura 12: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con CBP entre las líneas celulares parentales y resistentes a CBP.	94
Figura 13: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con CBP entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA.	97

Figura 14: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares parentales y resistentes a CBP.	99
Figura 15: Análisis de la expresión de ARNm de AURKA entre las líneas celulares de CMTN y COAG parentales y resistentes a OLA.	104
Figura 16: Análisis de la expresión de ARNm de AURKA entre las líneas celulares de CMTN y COAG parentales y resistentes a CBP.	105
Figura 17: Análisis de la expresión proteica de AURKA entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA.	107
Figura 18: Análisis de la expresión proteica de AURKA entre las líneas celulares parentales y resistentes a CBP.	107
Figura 19: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con ALI entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente.	110
Figura 20: Porcentaje de células apoptóticas en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente.	114
Figura 21: Análisis de la expresión proteica de γ-H2AX tras el tratamiento con ALI en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente.	115
Figura 22: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares parentales tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc).	119
Figura 23: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares resistentes a OLA tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc).	122
Figura 24: Curva de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre la línea celular de CMTN resistentes a CBP tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc).	123

- Figura 25:** Valores del CI entre OLA y ALI a diferentes concentraciones de los fármacos, en todas las líneas celulares. _____ 126
- Figura 26:** Porcentaje de células apoptóticas en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. _____ 131
- Figura 27:** Análisis de la expresión proteica de γ-H2AX en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. ____ 132

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación histológica del CO.	14
Tabla 2: Clasificación FIGO 2014 y su correspondiente TNM del cáncer de ovario, las trompas de Falopio y el peritoneo.	16
Tabla 3: Clasificación patológica del CM.	35
Tabla 4: Características de las líneas celulares seleccionadas.	63
Tabla 5: Descripción de la preparación de la mezcla para la transcripción inversa de las muestras de ARN.	74
Tabla 6: Descripción de la preparación de la mezcla de reactivos para la RT-qPCR.	75
Tabla 7: Lista de anticuerpos con la dilución utilizada, la fuente y la referencia.	79
Tabla 8: Valores de la IC ₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a OLA y las líneas celulares parentales.	93
Tabla 9: Valores de la IC ₅₀ para CBP de las líneas celulares resistentes a CBP y las líneas celulares parentales.	95
Tabla 10: Valores de la IC ₅₀ para CBP de las líneas celulares resistentes a OLA y las líneas celulares parentales.	98
Tabla 11: Valores de la IC ₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a CBP y las líneas celulares parentales.	100
Tabla 12: Resumen de las mutaciones identificadas en los genes BRCA1, BRCA2 y TP53 en las líneas celulares parentales y resistentes de COAG.	101
Tabla 13: Resumen de las mutaciones identificadas en los genes BRCA1, BRCA2 y TP53 en las líneas celulares parentales y resistentes de CMTN.	102

Tabla 14: Valores de la IC ₅₀ para ALI de las líneas celulares parentales y las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, respectivamente. _____	111
Tabla 15: Valores de la IC ₅₀ para OLA de las líneas celulares parentales tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc). _____	119
Tabla 16: Valores de la IC ₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a OLA tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc). _____	122
Tabla 17: Valores de la IC ₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a CBP tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc). _____	123
Tabla 18: Valores de CI entre OLA y ALI en Fa ₂₅ , Fa ₅₀ y Fa ₇₅ en las líneas celulares parentales y las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, respectivamente. _____	127
Tabla 19: Resumen de la regresión de Cox teniendo en cuenta la expresión de AURKA, la edad y el estadio del tumor en pacientes de CMTN. _____	134
Tabla 20: Resumen de la regresión de Cox teniendo en cuenta la expresión de AURKA, la edad y el estadio del tumor en pacientes de CO. _____	135

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. El cáncer como enfermedad.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo desarrollado y constituye un importante problema de salud pública en nuestra sociedad. Se caracteriza por un proceso de crecimiento, proliferación y diseminación descontrolados de diferentes tipos celulares que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Entre sus características distintivas se encuentran la evasión del sistema inmune y supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la vascularización de la zona afectada y la reprogramación del metabolismo celular (Hanahan, 2022).

Según el *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), se presentaron 19,3 millones de nuevos casos y 10 millones de fallecimientos en 2020, convirtiéndose en una de las principales causas de mortalidad a nivel global (Sung et al., 2021). Debido a la gran relevancia de esta enfermedad, surge la necesidad de entender su origen, así como sus características moleculares con la finalidad de poder desarrollar terapias efectivas que mejoren el pronóstico de los pacientes.

1.2. El cáncer de ovario.

El cáncer ginecológico es el cuarto tumor más frecuente en las mujeres, algunos de estos tumores como el cáncer de ovario (CO) son tumores de muy elevada letalidad y con diagnóstico en edades tempranas. El cáncer ginecológico se caracteriza por afectar a los órganos y tejidos del sistema reproductor femenino. Existen 5 tipos principales de cáncer ginecológico:

cáncer de útero o endometrio, cáncer de ovario, cáncer de vagina, cáncer de vulva y cáncer de cuello uterino (Ledford & Lockwood, 2019).

1.2.1. Epidemiología.

Dentro de los diferentes tipos de cáncer ginecológicos, el cáncer de cuello uterino es el más común, mientras que el CO es el más letal. El CO también se sitúa en el octavo lugar en términos de incidencia y el séptimo en mortalidad entre las mujeres a nivel mundial (**Figura 1**). La alta mortalidad y el mal pronóstico del CO se deben, en gran medida, al diagnóstico tardío en aproximadamente el 80% de los casos. Esto se debe a la falta de síntomas específicos y la ausencia de métodos de diagnóstico precoz eficientes. Sin embargo, las mujeres diagnosticadas con CO en etapas tempranas tienen una tasa de supervivencia global (SG) del 90% a los 5 años (Ledford & Lockwood, 2019). El diagnóstico en etapas tempranas resulta, por tanto, crucial para la reducir la mortalidad de las pacientes.

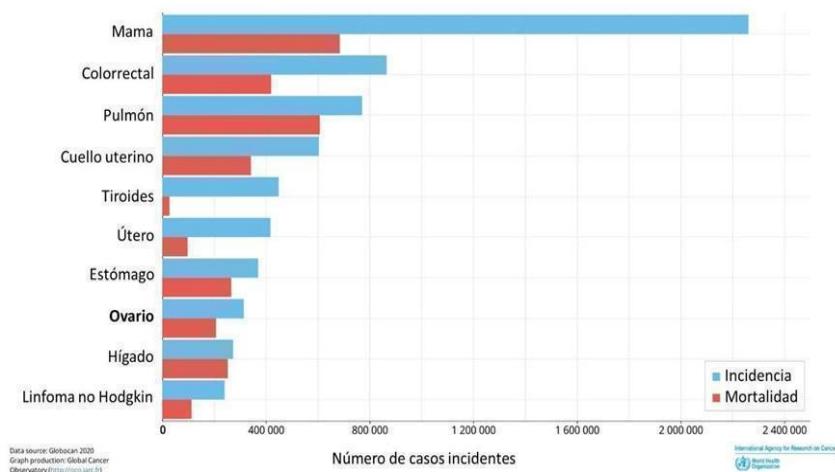


Figura 1: Incidencia y mortalidad del cáncer en mujeres de todas las edades a nivel mundial en 2020. Adaptada de GLOBOCAN, 2020.

1.2.2. Etiología.

El ovario es el órgano femenino responsable de la generación de las células sexuales denominadas óvulos. Los ovarios se encuentran ubicados en las fosas ováricas, pequeñas depresiones a cada lado del útero en las paredes laterales de la cavidad pélvica, conectados al útero a través de las trompas de Falopio (**Figura 2**) (Islam et al., 2023).

Debido a la localización intraabdominal del ovario y a que el CO suele encontrarse en un estado avanzado en el momento del diagnóstico, existe gran controversia sobre la etiología y los eventos moleculares y genéticos asociados a etapas tempranas de la enfermedad (Hunn & Rodriguez, 2012).

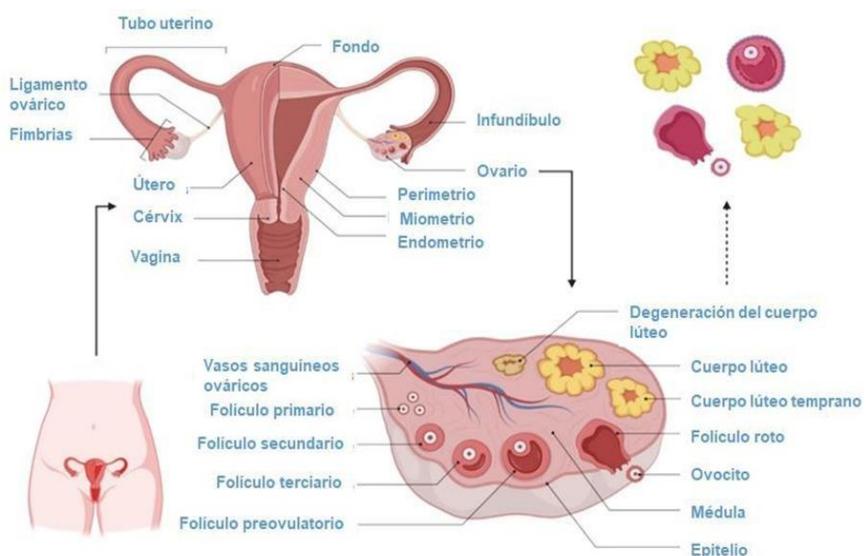


Figura 2: Representación esquemática de la estructura del ovario. Adaptada de Islam et al., 2023.

La hipótesis más aceptada, pero no demostrada, sobre el origen del CO es que este surge debido a la agrupación de células en el tejido que cubre el ovario, denominado epitelio (Islam et al., 2023). Las evidencias que apoyan esta hipótesis son las siguientes:

- Detección de cambios moleculares, como la pérdida de la actividad supresora tumoral y la sobreexpresión de proteínas que favorecen la proliferación celular, como la ciclooxygenasa 2, en el epitelio ovárico de mujeres que presentan un riesgo alto de sufrir CO (Yang et al., 2002).
- La detección de alteraciones displásicas premalignas, cambios en la morfología celular, en el epitelio ovárico utilizando técnicas patológicas convencionales (Shih et al., 2021).
- La evolución de un epitelio ovárico no maligno a uno canceroso en algunos CO en etapas tempranas de la enfermedad (Imai et al., 2018).

Por otro lado, existe una hipótesis alternativa sobre el origen del CO. Según esta teoría, se origina en células procedentes del extremo fimbriado de las trompas de Falopio que posteriormente migran al epitelio ovárico (Islam et al., 2023). Las evidencias que apoyan esta hipótesis son las siguientes:

- La similitud histológica entre las células del CO y las de las trompas de Falopio (Hunn & Rodriguez, 2012).
- La elevada incidencia de características histológicas y moleculares asociadas a la displasia en las trompas de Falopio

en muestras tomadas de mujeres con alto riesgo de sufrir CO (Roh et al., 2010).

- El riesgo de sufrir cáncer de las trompas de Falopio es elevado en mujeres con un alto riesgo hereditario de sufrir CO relacionado con mutaciones en el gen supresor de tumores *BRCA* (Crum et al., 2007).
- La detección de mutaciones en el gen de reparación del ADN *TP53* en muestras de las trompas de Falopio sanas en mujeres con alto riesgo de sufrir CO (Shaw et al., 2009).

1.2.3. Factores de riesgo.

El CO puede ocurrir esporádicamente en cualquier mujer, sin embargo, existen una serie de factores que pueden incrementar el riesgo de sufrir dicha patología. Estos factores pueden ser genéticos, hormonales, reproductivos y relacionados con el estilo de vida (Stewart et al., 2019).

- Dentro de los factores genéticos, se estima que el 15% de las pacientes que sufren CO son portadoras de una mutación hereditaria. La presencia de mutaciones de genes de supresión tumoral, como *BRCA1* y *BRCA2*, y de genes involucrados en la reparación del ADN, como los genes *MMR*, son las más frecuentes. Dichas mutaciones pueden aumentar el riesgo de sufrir CO de un 1,6% a un 40% y de un 10% a un 18%, respectivamente (Tschernichovsky & Goodman, 2017). Por otro lado, se ha demostrado que tener antecedentes familiares de CO y de cáncer de mama aumentan la probabilidad de sufrir CO. Esto es conocido como síndrome

de cáncer hereditario de mama y ovario (SCHMO) (Slatnik & Duff, 2015).

- Considerando los factores hormonales y reproductivos, diversos estudios han demostrado que la probabilidad de sufrir CO aumenta conforme las mujeres completan más ciclos ovulatorios. Debido a esto, se conoce que determinados factores que interrumpen la ovulación como son los anticonceptivos orales, la lactancia o el embarazo pueden ayudar a disminuir el riesgo de CO (Walker et al., 2015).
- La edad y los hábitos de vida también son factores de riesgo. La edad es un factor determinante que afecta al riesgo de padecer CO ya que esta enfermedad se manifiesta habitualmente en edades avanzadas. La obesidad o el sobrepeso también están relacionados con el aumento en el riesgo de CO, pero esto ocurre en la mayoría de los cánceres (Stewart et al., 2019).

Finalmente, determinados trastornos uterinos como la endometriosis, la cual se caracteriza por el crecimiento de tejido propio del interior del útero fuera de este, también han sido relacionados con un incremento del riesgo de sufrir CO en mujeres jóvenes, presentando un pronóstico favorable (Stewart et al., 2019).

1.2.4. Clasificación.

El CO engloba un conjunto de neoplasias con características clínico-patológicas y moleculares muy heterogéneas. Por ello, se han

desarrollado diferentes sistemas de clasificación con el objetivo de entender la biología del tumor y así poder identificar vías tumorales y posibles biomarcadores para diseñar estrategias terapéuticas más efectivas (Kossaï et al., 2018).

1.2.4.1. Clasificación histológica.

El CO se puede clasificar a nivel histológico en tres grupos principales: CO de células germinales (COCG), CO del estroma de cordón sexual (COECS) y CO epitelial (COE) (**Tabla 1**) (Stewart et al., 2019).

1.2.4.1.1. Cáncer de ovario de células germinales.

Estos tumores derivan de células germinales del ovario embrionario. Se trata de tumores poco comunes, representando únicamente el 3% de los casos, debido a que suelen aparecer a edades tempranas (entre los 10 y los 30 años) (Stewart et al., 2019). Los síntomas que presentan son similares a otros tipos de CO, destacando la hinchazón abdominal y el sangrado vaginal irregular. La tasa de SG de este tipo de tumores en estadios iniciales es elevada, presentando un pronóstico favorable (Gică et al., 2022).

1.2.4.1.2. Cáncer de ovario del estroma del cordón sexual.

El origen de este tipo de tumores se encuentra en las células del estroma del ovario, cuya función es sostener los elementos celulares que lo conforman. Al igual que el COCG, se trata de tumores poco comunes que representan en torno al 2% del total de los casos. Este tipo de tumores afectan desde mujeres en edades tempranas hasta algunos casos que se han descrito en torno a los 50-55 años (Stewart et al., 2019). En cuanto a

la sintomatología suelen presentar afecciones similares al resto de tumores de CO, sin embargo, presentan una serie de síntomas característicos como son la aparición de características asociadas a la producción de hormonas masculinas, como el hirsutismo, cambios menstruales y pubertad precoz (Schultz et al., 2016).

1.2.4.1.3. Cáncer de ovario epitelial.

El COE deriva de las células procedentes del tejido epitelial que cubre los ovarios. Se trata del CO más común, representando el 95% de todos los casos a nivel global y colocándose como la segunda causa de muertes más común por cáncer ginecológico. El porcentaje de SG de las pacientes es bastante bajo, situándose entre el 20% y el 40% dependiendo del subtipo de tumor que presenten. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen cinco subtipos de COE dependiendo del tipo de célula que presentan y del grado de diferenciación de las células tumorales (Kossaï et al., 2018; Sambasivan, 2022):

- El carcinoma de ovario seroso de alto grado (COSAG) es el COE más común, englobando el 70% de los casos globales y el 90% de los casos de cáncer de ovario seroso (COS). Suele aparecer en edades avanzadas, originándose en las trompas de Falopio con una consiguiente diseminación a los ovarios y el peritoneo. Presenta un mal pronóstico, con una tasa de mortalidad del 70% a los diez años (Stewart et al., 2019). Morfológicamente, está compuesto por células ciliadas y columnares que forman masas sólidas con atipia nuclear (Kossaï et al., 2018). En cuanto a las características moleculares de este tipo de tumores, se

caracterizan por mutaciones en genes supresores de tumores como *TP53*, *BRCA1* y *BRCA2*, lo cual conduce a fallos en la recombinación homóloga y la consiguiente replicación celular (Sambasivan, 2022).

- El carcinoma de ovario seroso de bajo grado (COSBG) es menos común que el COSAG ya que engloba el 5% de los casos de COE y entre un 10% y un 15% de los casos de COS. Suele aparecer en edades medias-tempranas, originándose en el ovario principalmente. Presenta un pronóstico mejor que el COSAG con una tasa de mortalidad del 50% a los diez años (Stewart et al., 2019). Morfológicamente es similar al COSAG, pero sin atipia nuclear (Kossaï et al., 2018). En cuanto a las características moleculares, no presenta mutaciones en *TP53*, *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, este tipo de tumor se caracteriza por mutaciones que provocan la amplificación de los oncogenes KRAS y NRAS, los cuales se caracterizan por dar lugar a proteínas que estimulan las vías de señalización que controlan la división celular, estando asociadas a un peor pronóstico las mutaciones en *KRAS* que en *NRAS*. Por otro lado, los COSBG expresan los receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP), por lo que son más susceptibles a terapias hormonales que los COSAG (Sambasivan, 2022).
- El carcinoma de ovario mucinoso (COM) es el COE menos común, englobando entre un 2% y un 3% de los casos. Este tipo de tumores se origina en el ovario y presenta un pronóstico

excelente tras la cirugía. No obstante, este empeora en casos de recaída y metástasis en el tracto gastrointestinal, propio de su histología mucinosa (Stewart et al., 2019). Morfológicamente está compuesto por células columnares y estratificadas que presentan un citoplasma de gran tamaño. Además, suelen formar tumores multiquísticos, con una gran cantidad de moco y que frecuentemente tienen áreas sólidas (Kossaï et al., 2018). En cuanto a las características moleculares, presentan mutaciones en el gen *KRAS* en el 50% de los casos y amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano de tipo 2 (HER2) en el 18% de los casos. Siendo, este último, clave en las vías de señalización celular que controlan la multiplicación y supervivencia celular (Sambasivan, 2022).

- El carcinoma de ovario endometrioide (COEN) engloba en torno al 10% de los casos de COE. Su origen se asocia a una endometriosis, diagnosticándose en la mayoría de los casos en etapas tempranas, por lo que presenta un buen pronóstico (Stewart et al., 2019). En cuanto a su morfología, suelen presentar una arquitectura glandular con diferenciación hacia células escamosas, formando normalmente masas sólidas unilaterales. Molecularmente, se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes supresores de tumores implicados en la modulación del ciclo celular, como *ARID1A* y *PTEN*, pudiendo llegar a presentar también mutaciones en *TP53* en los casos más avanzados de la enfermedad (Kossaï et al., 2018; Sambasivan, 2022).

- El carcinoma de ovario de células claras (COCC) engloba el 10% de los casos de COE. Se trata de un tumor muy similar al COEN, ya que su origen se suele asociar a una endometriosis y se detecta en etapas tempranas. Sin embargo, si se diagnostica en etapas avanzadas de la enfermedad presenta un peor pronóstico, similar al COSAG (Stewart et al., 2019). Morfológicamente, como su propio nombre indica, está formado por células claras, las cuales reciben este nombre debido a su gran tamaño y citoplasma abundante. Este tipo de tumores presentan un crecimiento sólido, aunque en algunos casos pueden crecer formando quistes tubulares. En cuanto a las características moleculares, cabe destacar la mutación de *ARID1A*, presente en el 50% de los casos, y una mutación activadora del oncogén *PI3KCA*, el cual está implicado en la transducción de señales para controlar el crecimiento, proliferación y metabolismo celular. (Kossaï et al., 2018).

Tabla 1: Clasificación histológica del CO.

Grupo	Subgrupo
Cáncer de ovario de células germinales	
Cáncer de ovario del estroma de cordón sexual	
Cáncer de ovario epitelial	Cárcinoma de ovario de alto grado
	Cárcinoma de ovario de bajo grado
	Cárcinoma de ovario mucinoso
	Cárcinoma de ovario endometrioides
	Cárcinoma de ovario de células claras

1.2.4.2. Clasificación anatómica estadificada.

Además de la clasificación histológica, el CO también se puede clasificar en función de su estadio siguiendo dos sistemas: el sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y el sistema TNM del Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC) (**Tabla 2**). Según el sistema FIGO, la estadificación del CO se basa en hallazgos obtenidos principalmente por exploración quirúrgica, mientras que según el sistema TNM, se realiza teniendo en cuenta 3 factores: el tamaño del tumor (T), la propagación a los ganglios linfáticos (N) y la metástasis a zonas distantes (M). A cada uno de los factores mencionados se les asigna un valor en función del estado del tumor, de forma que los estadios con un

Introducción

valor más alto están relacionados con un cáncer más avanzado y de peor pronóstico (Berek et al., 2021).

Tabla 2: Clasificación FIGO 2014 y su correspondiente TNM del cáncer de ovario, las trompas de Falopio y el peritoneo. Adaptada de Berek et al., 2021.

Estadio I: Tumor limitado a los ovarios o a las trompas de Falopio		T1-N0-M0
IA	Tumor limitado a 1 ovario (cápsula intacta) o trompa de Falopio; no hay tumor en la superficie; no hay células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales	T1a-N0-M0
IB	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsulas intactas) o a las trompas de Falopio; sin tumor en la superficie; sin células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales	T1b-N0-M0
Tumor limitado a 1 o a ambos ovarios o trompas de Falopio, con cualquiera de las siguientes características:		
IC 1	Derrame quirúrgico	T1c1-N0-M0
IC 2	Ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie del ovario o de la trompa de Falopio	T1c2-N0-M0
IC 3	Células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales	T1c3-N0-M0

Estadio II: El tumor afecta a 1 o ambos ovarios o a las trompas de Falopio con extensión pélvica o cáncer peritoneal			T2-N0-M0
IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o las trompas de Falopio y/o los ovarios		T2a-N0-M0
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales		T2b-N0-M0
Estadio III: El tumor afecta a 1 o ambos ovarios o a las trompas de Falopio, o a un cáncer peritoneal, con una extensión citológica o histológica confirmada al peritoneo fuera de la pelvis y/o metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales			T1-3/N0-1/M0
IIIA	1	Ganglios linfáticos retroperitoneales positivos únicamente (probados citológica o histológicamente):	T1/T2-N1- M0
		IIA1(i) Metástasis < 10 mm en su mayor dimensión	
	IIA1(ii)	Metástasis > 10 mm en su mayor dimensión	

		Afectación peritoneal extrapélvica (por encima del borde de la pelvis) microscópica con o sin ganglios linfáticos retroperitoneales positivos	T3a2-N0/N1-M0
IIIB		Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis < 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis en los ganglios linfáticos retroperitoneales	T3b-N0/N1-M0
IIIC		Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis > 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales	T3c-N0/N1-M0
Estadio IV: Metástasis a distancia, excluyendo las metástasis peritoneales			
IVA		Derrame pleural con citología positiva	Cualquier T, cualquier N y M1
IVB		Metástasis parenquimatosas y metástasis en órganos extraabdominales	

1.2.5. Detección y diagnóstico.

La detección y el diagnóstico del CO siempre ha sido complicada debido a la inespecificidad y variabilidad de los síntomas, por ello el 60% de todos los COE se diagnostican en estadios avanzados. Algunos de estos síntomas son el dolor o malestar abdominal, irregularidades menstruales, dispepsia y otras alteraciones digestivas leves. A medida que la enfermedad progresá, los síntomas suelen empeorar, y puede asociarse a condiciones respiratorias por el aumento de la presión intraabdominal o de la trasudación de líquido a las cavidades pleurales (Berek et al., 2021).

Uno de los marcadores más utilizados para el diagnóstico del CO es el antígeno canceroso 125 (CA125), ya que se encuentra en la superficie de la mayoría de las células del CO. No obstante, diferentes estudios han demostrado que carece de especificidad ya que su expresión aumenta también en casos de tumores benignos y puede dar lugar a falsos positivos y cirugías innecesarias. Para aumentar la especificidad del CA125 se ha planteado su combinación con otras técnicas de detección de CO, como son la ecografía transvaginal mediante ultrasonido y la detección de otros marcadores que expresan las células del CO como la proteína 4 del epidídimo humano (Slatnik & Duff, 2015). La combinación de estos métodos aumenta la especificidad del diagnóstico del CO, aunque el método de diagnóstico más fiable es la biopsia percutánea y posterior estudio del tejido ovárico (Stewart et al., 2019).

1.2.6. Tratamiento.

Tradicionalmente, el tratamiento para el CO se basa en la combinación de cirugía y quimioterapia (Jayson et al., 2014). Sin embargo, para determinar el tratamiento contra un CO, independientemente del tipo, es necesario estadificarlo y estudiar las características clínico-patológicas de la paciente. Las diferentes estrategias utilizadas pueden encontrarse en la **Figura 3** y se detallan a continuación.

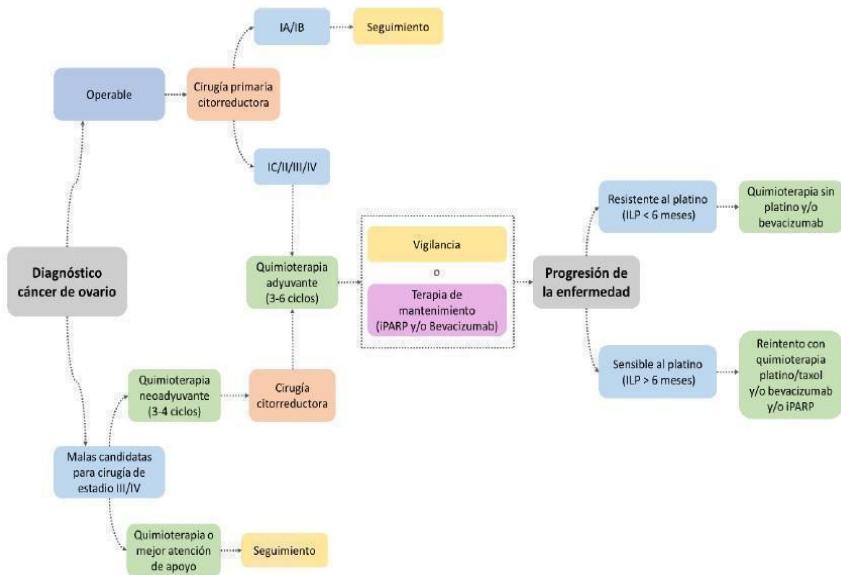


Figura 3: Evaluación y tratamiento del CO y la enfermedad recurrente. iPARP (inhibidores de PARP); ILP (intervalo libre de platino). Adaptada de Kuroki & Guntupalli, 2020; Lheureux et al., 2019.

1.2.6.1. Cirugía citorreductora.

La CC sin necesidad de quimioterapia está indicada para pacientes que muestran un tumor en estadios iniciales (IA o IB) (Berek et al., 2021). Esta intervención tiene dos objetivos principales: obtener información determinante sobre el tumor (estadio FIGO, localización y posible metástasis) y eliminar la mayor cantidad de carga tumoral posible o, en el mejor de los casos, eliminar el tumor por completo (Jayson et al., 2014).

La técnica quirúrgica más utilizada para obtener información sobre el estado del tumor es la laparotomía con exploración completa de abdomen y pelvis. No obstante, se está implementando la utilización de nuevos métodos de exploración menos invasivos como son la inspección visual directa mediante laparoscopia y la tomografía axial computarizada (TAC) (Kuroki & Guntupalli, 2020; Stewart et al., 2019).

La CC comprende una serie de intervenciones que se realizan en función de la localización del tumor. Dentro de estas intervenciones se encuentran la histerectomía abdominal bilateral (extirpación del útero y cuello uterino), la salpingo-ooforectomía bilateral (extirpación de los ovarios y las trompas de Falopio) y la omentectomía (extirpación del epiplón mayor) (King et al., 2003). Es muy importante eliminar la mayor cantidad de tumor durante la intervención, ya que la enfermedad residual tras la cirugía es un factor clave en la determinación de la SG de pacientes con CO (Lheureux et al., 2019).

1.2.6.2. Quimioterapia.

Si la paciente presenta un tumor en estadio IC o superior, está indicada la utilización de la quimioterapia en combinación con la CC (Berek et al., 2021). La administración de la quimioterapia se puede realizar en configuración neoadyuvante (antes de la CC) o adyuvante (después de la CC).

- La quimioterapia adyuvante: es la alternativa más utilizada para el tratamiento del CO. La dosis estándar pautada es de 6 ciclos, uno cada 3 semanas, de la combinación de dos compuestos: uno derivado del platino, como puede ser el carboplatino o el cisplatino, el cual interacciona con el ADN causando lesiones e impidiendo su síntesis (Rabik & Dolan, 2007). Y un taxano, como el paclitaxel o el docetaxel, el cual actúa sobre el ciclo celular deteniéndose en la fase G₂(Bookman et al., 2009; da Costa et al., 2020).

Una alternativa a la utilización de taxanos es la combinación de platinos con una antraciclina, denominada doxorrubicina liposomal pegilada (DLP). Según informa el estudio MITO-2, esta combinación ha demostrado tener una tasa de respuesta al tratamiento similar a la combinación de carboplatino con taxanos, incluso disminuyendo la neurotoxicidad sobre las pacientes, por lo que es una alternativa viable de tratamiento (Pignata et al., 2011).

- La quimioterapia neoadyuvante: se utiliza para reducir al máximo el tamaño del tumor antes de la intervención. En la mayoría de los casos se pautan 3-4 ciclos de quimioterapia antes de la cirugía, seguidos de 3 ciclos más de quimioterapia adyuvante tras la CC (Berek et al., 2021). Se suele pautar en pacientes de CO en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) en los que no se considera factible la citorreducción completa del tumor sin posibilidad de recaída o en pacientes que, por edad, comorbilidad (presencia de otras afecciones) o posibilidad de complicaciones perioperatorias, no son buenos candidatos para la cirugía (Wright et al., 2016). Esta alternativa de tratamiento se basa en los resultados obtenidos en cuatro ensayos clínicos en fase III (EORTC 55971, CHORUS, JGOG 0602 y SCORPION) (Vergote et al., 2018). Donde se muestra una disminución de entre un 70% y un 80% de las complicaciones y la mortalidad perioperatorias, siendo la SG y la supervivencia libre de progresión (SLP) similar a la obtenida con el tratamiento convencional. (Machida et al., 2020).

1.2.6.3. Terapia dirigida para el tratamiento del cáncer de ovario.

Los fármacos de terapia dirigida se han ido introduciendo en los ensayos clínicos con el fin de tratar la enfermedad recurrente, usarse en combinación con los agentes quimioterápicos o utilizarse en la terapia de mantenimiento. Estos fármacos ejercen su acción específicamente sobre una alteración molecular, preservando las células y tejidos sanos. Es por esto por lo que las terapias dirigidas son más seguras, más efectivas y proporcionan menos efectos toxicológicos adversos. Dentro de la terapia

dirigida contra el CO se pueden encontrar el bevacizumab y los inhibidores de la proteína ADP ribosa polimerasa (iPARP) (Lheureux et al., 2019).

1.2.6.3.1. Bevacizumab.

Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Al inhibir el VEGF el bevacizumab está inhibiendo la angiogénesis tumoral frenando el desarrollo del cáncer (Kuroki & Guntupalli, 2020).

La utilización del bevacizumab para el tratamiento del CO se evaluó en los ensayos GOG218 e ICON7 (Nakai & Matsumura, 2022). En estos ensayos compararon la utilización de la terapia convencional, basada en la combinación de CC y quimioterapia, en solitario y en combinación con bevacizumab como terapia de mantenimiento en pacientes con COE en estadios avanzados (III y IV). Los resultados mostraron un incremento significativo en la SLP al utilizar el bevacizumab, sin embargo, no se apreciaron diferencias en términos de SG (Burger et al., 2011; Perren et al., 2011).

En la actualidad, con la llegada de los iPARP, la utilización del bevacizumab se ha reducido considerablemente en pacientes de CO de alto riesgo. Sin embargo, se plantea como posible alternativa para el tratamiento de pacientes con CO recurrente que han generado resistencia a los iPARP (Nakai & Matsumura, 2022).

1.2.6.3.2. Inhibidores de PARP.

Este tipo de fármacos se centran, como su nombre indica, en la inhibición de la familia de enzimas PARP. De esta familia destacan PARP-1 y PARP-2 que tienen un papel clave en la reparación de roturas del ADN de cadena simple mediante el mecanismo de reparación por escisión de bases (REB), el cual se caracteriza por la eliminación de bases incorrectas de la cadena de ADN por parte de una enzima denominada glicosilasa y posterior sustitución por la base correcta a través de la ADN polimerasa. La inhibición de estas enzimas, por lo tanto, da lugar a la acumulación de roturas de cadena simple, pudiendo degenerar en roturas de doble cadena (RDC) (Sonnenblick et al., 2015).

Habitualmente estas RDC son reparadas por recombinación homóloga (RH), un tipo de recombinación genética en el que participan las proteínas de la familia BRCA, y que se basa en el intercambio de secuencias de nucleótidos entre dos moléculas similares o idénticas de ADN. Por lo tanto, las células deficientes en *BRCA1* y *BRCA2* presentan una alta sensibilidad a los iPARP (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Concretamente, la horquilla de replicación no puede reiniciarse y colapsa, causando roturas de cromátidas persistentes y con ello la muerte celular, en un proceso conocido como letalidad sintética. (**Figura 4**) (Lord & Ashworth, 2017).

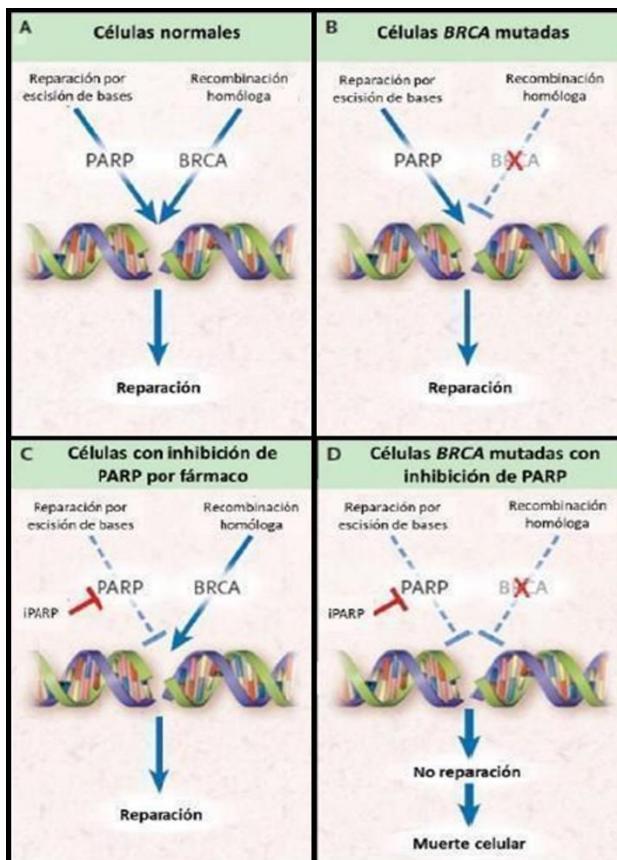


Figura 4: Mecanismo molecular de muerte celular por letalidad sintética inducida por los iPARP. **A)** En células normales, tanto la REB como la RH están disponibles para reparar el ADN dañado. **B)** La REB compensa la pérdida de función de los genes implicados en la RH, permitiendo la reparación del ADN y manteniendo la viabilidad celular. **C)** La inhibición de PARP mediante un iPARP no compromete la reparación del ADN dañado preservando así la viabilidad celular. **D)** Las células que portan una mutación en *BRCA* junto con la inhibición de PARP mediante un iPARP no pueden reparar su genoma ni mediante REB ni mediante RH y por lo tanto sufren muerte celular debido a una mayor inestabilidad genómica. Adaptada de Iglesias & Silver, 2009.

Como se ha mencionado anteriormente, dentro del CO el subtipo que se caracteriza por la presencia de mutaciones tanto en *BRCA1/2* es el COSAG. Hasta un 35-40% de los tumores de este tipo presentan estos defectos en la RH, lo que supone un excelente biomarcador predictivo para el tratamiento con iPARP (D'Andrea, 2018).

Los primeros ensayos clínicos sobre la utilización de iPARP se realizaron en pacientes de COSAG tras la recaída de la enfermedad sensible al tratamiento con compuestos derivados del platino. Los ensayos clínicos NOVA, SOLO2 y ARIEL3 evaluaron si la adición de iPARP como terapia de mantenimiento tras una quimioterapia basada en compuestos derivados del platino incrementaba la SLP en pacientes tras recibir al menos 2 ciclos y obtener una respuesta al último ciclo de quimioterapia. Los resultados mostraron un incremento estadísticamente significativo de la SLP en todos los casos (Coleman et al., 2017; Pujade-Lauraine et al., 2017).

Otros ensayos clínicos (SOLO1, PRIMA, PAOLA, VELIA y ATHENA) han evaluado la utilización de diferentes iPARP como terapia de mantenimiento de primera línea tras observar una respuesta a la quimioterapia basada en compuestos derivados del platino. Estos ensayos incluyeron pacientes de COSAG en estadio III-IV independientemente del estado mutacional de *BRCA1/2*. (excepto el ensayo SOLO1, el cual incluyó únicamente pacientes que presentaban *BRCA1/2* mutado) Los resultados obtenidos revelaron que la utilización de los iPARP aumentó la SLP de forma significativa tanto en las pacientes con *BRCA1/2* mutado como sin la mutación, siendo especialmente

relevante el beneficio en las que presentan *BRCA1/2* mutado (Berek et al., 2021; Dias et al., 2021).

Específicamente, esta tesis se centra en el uso de olaparib. Este fue el primer iPARP aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (AAM) para el tratamiento de pacientes con CO metastático *BRCA1/2* mutado que han recibido 3 o más ciclos de quimioterapia (Kim et al., 2015) así como para la terapia de mantenimiento en CO *BRCA1/2* mutado después de un tratamiento con quimioterapia basada en platino (Ledermann et al., 2012). En la actualidad, los resultados obtenidos en el ensayo en fase III SOLO1/GOG3004 muestran que la utilización de olaparib como terapia de mantenimiento en pacientes de CO avanzado *BRCA1/2* mutado produce una mejora clínicamente significativa de la SG tras siete años de seguimiento (Disilvestro et al., 2022).

No obstante, a pesar de la excelente mejoría que ha supuesto para las pacientes de CO la irrupción de los iPARP, más de un 50% de las pacientes tratadas recaerá en los primeros años. Por lo que el conocimiento de los mecanismos de resistencia a iPARP se ha convertido en un “*unmet medical need*”. (Dias et al., 2021).

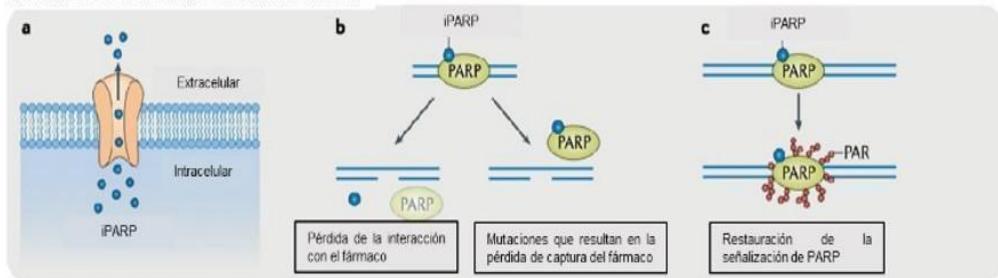
1.2.7. Enfermedad recurrente y aparición de resistencias en el cáncer de ovario.

En torno al 80% de las pacientes con CO sufren una recaída en los primeros 2 años desde el diagnóstico a pesar del tratamiento con platinos. Desde un punto de vista pronóstico y predictivo de respuesta a

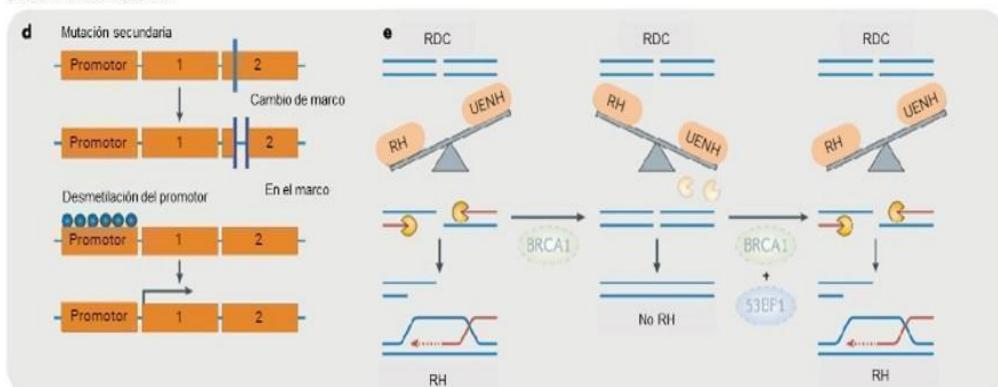
tratamientos subsiguientes, la recaída en CO se clasifica en virtud del intervalo libre de platino (ILP) aunque desde hace unos años se prefiere el concepto intervalo libre de tratamiento (ILT). El concepto de ILP o ILT, está definido por el tiempo transcurrido desde la última dosis de quimioterapia utilizando platinos (ILP) o de tratamiento activo (ILT) hasta la recurrencia de la enfermedad. El punto de corte que clásicamente se utiliza es de 6 meses, de tal forma que en una recaída con un ILP superior a 6 meses se habla de una recaída sensible al platino, por lo que una reexposición a quimioterapia con platinos suele ser la opción preferida de tratamiento. Sin embargo, en el caso de que el ILP sea menor a 6 meses se considera una recaída resistente al platino, recomendándose en este caso la administración de otros agentes como la DLP, el paclitaxel, la gemcitabina o terapia dirigida como los iPARP (Lheureux et al., 2019).

Desde la irrupción de los iPARP en el armamentario terapéutico contra el CO, también nos encontramos con una nueva situación en la que la recaída ocurre tras el tratamiento con iPARP debido a la generación de resistencia a los mismos. Existen tres mecanismos generales descritos que generan resistencia a iPARP: i) efectos relacionados con la diana del fármaco, como el aumento de la función de las bombas de flujo del fármaco o la reducción de la afinidad por PARP a causa de una mutación, ii) la restauración de la RH, por ejemplo, con una reversión de un alelo *BRCA1/2* mutado, iii) la restauración de la estabilidad de la horquilla de replicación (**Figura 5**) (D'Andrea, 2018; Dias et al., 2021).

Alteraciones relacionadas con el fármaco/diana



Restauración de la RH



Restauración de la horquilla de replicación

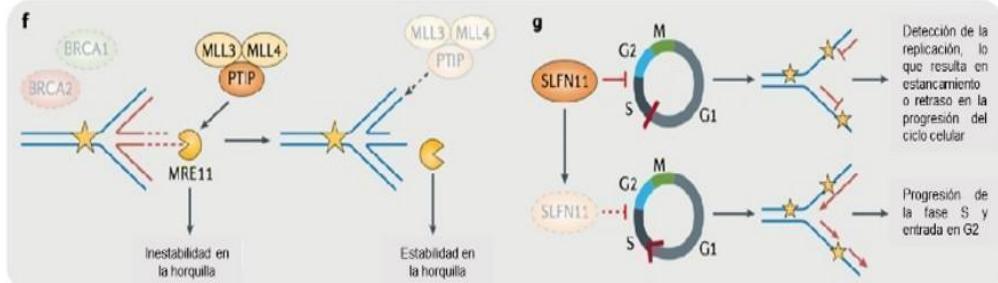


Figura 5: Mecanismos de resistencia a iPARP. En alteraciones relacionadas con el fármaco/diana: **a)** incremento de la actividad de las bombas de flujo, eliminando el fármaco; **b)** mutaciones que afectan a la afinidad de unión de PARP al fármaco; **c)** restauración de PARP debido a la pérdida de función de la enzima PAR glicohidrolasa (PARG), la cual es la encargada de reciclar PARP. En la restauración de la RH debido a: **d)** una reactivación de la función BRCA1/2 ya sea por una mutación secundaria o modificación epigenética; **e)** la pérdida de la protección terminal del ADN producto de la pérdida de función del factor P53BP1, el cual es necesario para la activación del mecanismo de unión de extremos no homólogos (UENH). Por la Restauración de la horquilla de replicación debido a: **f)** la pérdida de proteínas desestabilizadoras de la horquilla y **g)** progresión del ciclo celular debido a la pérdida de proteínas que actúan como puntos de control. MLL3, histona-lisina N-metiltransferasa 2C; MLL4, histona-lisina N-metiltransferasa 2B; MRE11, proteína reparadora de doble cadena; PTIP, proteína que interactúa con el dominio de transactivación Pax2. Adaptada de Dias et al., 2021.

Desde el punto de vista clínico, un estudio post-hoc exploratorio de las pacientes incluidas en el ensayo PAOLA-1 evaluó a nivel pronóstico las recaídas de las pacientes que habían iniciado una terapia de mantenimiento combinada con olaparib y bevacizumab. Este análisis identificó que la respuesta a la quimioterapia subsiguiente difería si la recaída o progresión en las pacientes que progresaban una vez que ya habían abandonado el tratamiento con olaparib frente a las que progresaban durante la toma de olaparib, de tal forma que la respuesta era peor en estas últimas (Harter et al., 2023).

Dentro de los diferentes mecanismos de resistencia a iPARP, el más documentado en la clínica es la restauración de la RH por una re-expresión de *BRCA1/2* (Kondrashova et al., 2017). Este mecanismo se describió por primera vez en líneas celulares establecidas de CO y cáncer de páncreas, resistentes a iPARP y platinos (Edwards et al., 2008; Sakai et

al., 2008). Posteriormente, los resultados obtenidos en el ensayo EVOLVE, un ensayo clínico multicéntrico de fase II que cuenta con una cohorte de 34 pacientes de CO que presenta mutaciones en *BRCA1/2* y progresión tras el tratamiento con iPARP, mostraron que existía una reversión de la mutación en *BRCA1/2* en el 20% de los casos (Lheureux et al., 2020).

Posteriormente, nuevos estudios en líneas celulares han demostrado que la reversión de mutaciones en *BRCA1/2* es también el principal mecanismo de resistencia al tratamiento con platino en el CO (Norquist et al., 2011). Posteriormente, un análisis post-hoc exploratorio de las pacientes incluidas en el ensayo SOLO2/ENGOT reveló que la eficacia de la quimioterapia basada en platino parece ser menor en pacientes de CO recurrente tras el tratamiento con iPARP en comparación con pacientes que no han recibido previamente dicho tratamiento (Frenel et al., 2022). Esto ha planteado una hipótesis sobre una posible resistencia cruzada entre iPARP y platino en CO.

Además de en el CO, también se han descrito resistencias a iPARP por reversiones génicas en *BRCA1/2* en tumores de cáncer de próstata (Goodall et al., 2017), páncreas (Pishvaian et al., 2017) y mama (Afghahi et al., 2017).

1.2.7.1. Tratamiento de los tumores resistentes a inhibidores de PARP.

Debido al gran número de pacientes que presentan resistencia a iPARP, son diversos los estudios que se han focalizado en dilucidar los mecanismos moleculares, así como encontrar nuevas terapias efectivas.

La alternativa más utilizada en el CO es la CC, mediante la cual se tratan de eliminar los posibles clones resistentes del tumor, retrasando de esta forma la aparición de la resistencia (Dias et al., 2021). Por otro lado, se sugieren tres principales estrategias para combatir las resistencias a iPARP:

- La supresión de vías alternativas de reparación en el caso de los tumores resistentes que no presentan una reversión de la mutación en *BRCA1/2*. Estos tumores son capaces de reparar la doble cadena de ADN en ausencia de RH mediante la unión de extremos mediada por micro-homología (MMEJ) a través de la ADN polimerasa θ (POLQ) (Chang et al., 2017). De esta manera la supresión de esta vía podría ser utilizada como diana para el tratamiento de las resistencias (Ceccaldi et al., 2015).
- La utilización de vulnerabilidades producto de la adquisición de la resistencia ya que se ha demostrado que determinadas mutaciones que pueden generar resistencia a los iPARP, como por ejemplo la inactivación de PARG, hacen más sensibles los tumores al tratamiento con radiación ionizante (Amé et al., 2009).
- La combinación de los iPARP con otras terapias con el objetivo de potenciar su efecto antitumoral (Dias et al., 2021). Algunas de estas estrategias son, por ejemplo, la utilización de inhibidores de quinasas clave para la activación del ciclo celular como ATR (Murai et al., 2016), o la utilización de fármacos que afectan indirectamente a la expresión o localización de proteínas clave

para la RH, como por ejemplo el bevacizumab expuesto anteriormente (Mirza et al., 2019).

1.3. El cáncer de mama.

Como se ha comentado con anterioridad, la aparición de resistencias a iPARP debido a la reversión de la mutación en *BRCA1/2* también ha sido estudiada en el cáncer de mama (CM) (Afghahi et al., 2017). Este tipo de cáncer también se relaciona con un origen hereditario por la presencia de mutaciones en *BRCA1/2* y es diez veces más común que el CO a nivel mundial, aunque con una mortalidad tres veces menor (**Figura 1**) (Caan & Thomson, 2007).

1.3.1. Clasificación patológica.

El CM se clasifica a nivel patológico basándose en la expresión superficial de los receptores hormonales RE, RP, HER2 y el marcador de proliferación celular Ki67 mediante inmunohistoquímica (IHQ) de tejido procedente de biopsia de paciente (Derakhshan & Reis-Filho, 2022). A pesar de que la expresión de Ki67 no está estandarizada en la actualidad, se considera que la expresión es alta cuando al hacer la IHQ se tiñen el 14% de los núcleos o superior (Curigliano et al., 2017).

Según la expresión de estos marcadores, el CM se puede dividir en cuatro subtipos según su patología: luminal A (Ki67 bajo, RE⁺, RP^{+/-}, HER2⁻), luminal B (Ki67 alto, RE⁺, RP^{+/-}, HER2⁻), HER2⁺ (cualquier Ki67, RE^{+/-}, RP^{+/-}, HER2⁺) y triple negativo (cualquier Ki67, RE⁻, RP⁻, HER2⁻) (Curigliano et al., 2017) (**Tabla 3**).

Tabla 3: Clasificación patológica del CM.

Subtipo	Ki67	RE	RP	HER2
Luminal A	< 14%	+	+/-	-
Luminal B	≥ 14%	+	+/-	-
HER2 ⁺	Cualquiera	+/-	+/-	+
Triple Negativo	Cualquiera	-	-	-

Dentro de los cuatro subtipos patológicos el cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el subtipo molecular más agresivo, presentando una tasa de SG del 70% a los cinco años, debido en parte a la falta de alternativas terapéuticas disponibles (DeSantis et al., 2019).

1.3.2. Tratamiento.

Los tratamientos para el CM se pueden dividir en locales y sistémicos, y se pueden aplicar juntos o por separado (Curigliano et al., 2017).

En cuanto al tratamiento local del CM, se realiza una CC para extirpar el mayor volumen tumoral posible y los posibles ganglios linfáticos axilares afectados. En cuanto al tipo de CC, la conservación de la mama es el objetivo principal y se prefiere a la mastectomía (eliminación completa del seno). Sin embargo, la decisión se basa en la comorbilidad, el tamaño

de la mama y la decisión de la paciente (Margenthaler & Ollila, 2016; McLaughlin, 2013).

En la mayoría de las pacientes con CM no metastático se puede pautar un CC, sin embargo, suele ser necesaria la combinación con tratamientos sistémicos, los cuales se pueden aplicar, al igual que en el CO, antes de la CC (tratamiento neoadyuvante) o después de la CC (tratamiento adyuvante). Los tratamientos sistémicos para el CM son la terapia endocrina, la quimioterapia, y la terapia dirigida (Curigliano et al., 2017).

En líneas generales, la terapia endocrina se suele pautar en pacientes con CM luminal A y luminal B, ya que presentan el receptor hormonal RE. Dichos tratamientos se basan en moduladores del RE para mujeres premenopáusicas, como el tamoxifeno, e inhibidores de la aromatasa, para mujeres postmenopáusicas (anastrozol o letrozol). En cuanto al tratamiento sistémico de los tumores HER2⁺, la terapia más utilizada es la basada en anticuerpos monoclonales humanizados anti-HER2, por ejemplo, el trastuzumab o el pertuzumab (Harbeck et al., 2019).

El tratamiento más utilizado para el CMTN es la quimioterapia neoadyuvante seguida de una CC. Las quimioterapias más utilizadas incluyen taxanos, compuestos derivados del platino, agentes alquilantes (p. ej., ciclofosamida) y antimetabolitos fluorouracilados. Sin embargo, la SLP tras la quimioterapia oscila entre 4 y 6 meses y la SG entre 11 y 17 meses, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas terapias dirigidas para mejorar la supervivencia de las pacientes (Caswell-Jin et al., 2018; Plevritis et al., 2018).

1.3.2.1. Nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

Con el objetivo de aumentar la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama triple negativo (CMTN), se han explorado nuevas estrategias de tratamiento.

Una de las opciones de tratamiento es la inmunoterapia, ya que el CMTN presenta una expresión elevada del ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1), el cual mantiene la inmunosupresión en el ambiente tumoral. En 2019 se aprobó el primer ensayo clínico para la utilización del atezolizumab (anticuerpo anti-PD-L1) en combinación con taxanos para el tratamiento del CMTN (NCT02425891) (Won & Spruck, 2020).

Otra de las estrategias de tratamiento del CMTN es la utilización de terapia dirigida sobre dianas específicas. Aproximadamente, el 60-70% de los pacientes con CM que presentan mutaciones en *BRCA1/2* tienen CMTN y entre el 10-30% de las pacientes con CMTN presentan una mutación patológica de *BRCA1/2* (Hartman et al., 2012; Okuma & Yonemori, 2017).

El ensayo OlympiA en fase III (NCT02032823) evaluó la utilización de olaparib como terapia adyuvante en pacientes de alto riesgo con CM *BRCA* mutado. Los resultados demostraron una mejora estadísticamente significativa de la SG de las pacientes en comparación al placebo con una mediana de seguimiento de 3,5 años (Geyer et al., 2022).

Otros ensayos en fase II como el ensayo TOPACIO/KEYNOTE-162 (NCT02657889), MEDIOLA (NCT02734004) e I-SPY 2 (NCT01042379) están estudiando la utilización de iPARP en combinación con inmunoterapia en pacientes con CMTN metastático de alto riesgo. Los resultados muestran un incremento de la efectividad del tratamiento en aquellos pacientes que presentan una mutación hereditaria en *BRCA1/2* (Domchek et al., 2020; Pusztai et al., 2021; Vinayak et al., 2019).

1.3.3. Resistencia a inhibidores de PARP en cáncer de mama triple negativo.

Al igual que ocurre en el CO, la utilización del iPARP para el tratamiento del CMTN con mutaciones en *BRCA1/2* ha causado la generación de mecanismos de resistencia mediante la restauración de la función de *BRCA1/2* debido a mutaciones secundarias en los tumores (Afghahi et al., 2017).

Tanto el CMTN como el COSAG son dos tipos tumorales que, aunque de diferente origen anatómico, comparten mecanismos etiopatogénicos muy similares. Ambos tumores se relacionan con frecuencia con la presencia de mutaciones en *BRCA1/2*, lo que provoca que muchas pacientes con mutación germinal de *BRCA* desarrollen un síndrome hereditario en el que se incrementa la frecuencia de diagnóstico de estos dos tipos tumorales (Afghahi et al., 2017; Slatnik & Duff, 2015).

Por otro lado, la alta frecuencia de mutaciones de *TP53* presente en ambos tumores (más del 50% en el CMTN y cerca del 90% en COSAG) hacen que sean tumores en los que los defectos en la reparación del ADN

y la regulación del ciclo sean responsables, en gran parte, de la carcinogénesis de ambas entidades (Kudelova et al., 2022; Wallis et al., 2023).

Esta similitud biológica ha sido corroborada por el hecho de que ambos tipos tumorales son sensibles a iPARP, lo que hace que los modelos de CMTN y COSAG sean atractivos para el estudio de las resistencias a este tipo de fármacos.

1.4. Auroras quinasas como dianas para el tratamiento del CO y el CM.

Las quinasas son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfato de una molécula donante a un sustrato específico en un proceso conocido como fosforilación (Manning et al., 2002). Dentro de estas enzimas encontramos las auroras quinasas (AURKs), que son una familia de serina/treonina quinasas esenciales para la formación del huso mitótico y la correcta realización de la mitosis (**Figura 6**). (Jing & Chen, 2021).

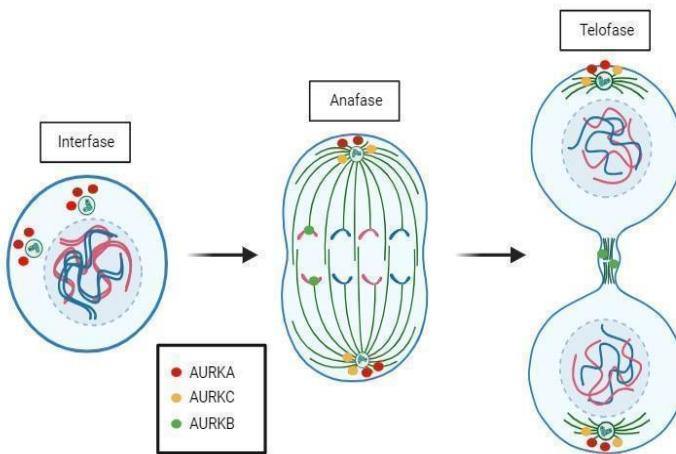


Figura 6: Localización de las AURKs durante las diferentes fases de la mitosis. Adaptada de Pérez Fidalgo et al., 2009.

1.4.1. Clasificación.

Dentro de las AURKs encontramos diferentes subtipos: aurora quinasa A (AURKA), aurora quinasa B (AURKB) y aurora quinasa C (AURKC). Estos subtipos conservan la mayor parte del dominio C-terminal y N-terminal, pero difieren en su funcionalidad (Tang et al., 2017). En esta tesis nos centramos en el estudio de la AURKA.

1.4.1.1. Aurora quinasa A.

Se trata de una proteína de 403 aminoácidos (**Figura 7**) codificada por un gen situado en el cromosoma humano 20q13.2 (Willems et al., 2018). Los niveles de expresión y activación de la AURKA experimentan numerosos cambios a lo largo del ciclo celular, alcanzando su máximo en la fase tardía de G₂ y la fase M, durante las cuales la célula finaliza el proceso de división

(Marumoto et al., 2005). Los cambios de fosforilación de esta proteína están asociados con numerosos eventos esenciales que tienen lugar durante la mitosis, como la maduración y separación de los centrosomas (Marumoto et al., 2003), la entrada en mitosis (Hirota et al., 2003), el ensamblaje del huso bipolar (Tsai et al., 2003) y la citoquinesis (Zhang et al., 2004) (**Figura 6**). Concretamente, se han identificado tres lugares de fosforilación en la AURKA: Ser342, Ser51 y Thr288. (Walter et al., 2000).

1.4.1.2. Aurora quinasa B.

La AURKB es una proteína de 344 aminoácidos (**Figura 7**) codificada por un gen situado en el cromosoma humano 17p13.1 (Willems et al., 2018). Esta aurora quinasa es una proteína cromosómica pasajera ya que varía su localización durante la mitosis, encontrándose en el cromosoma durante la profase, para posteriormente localizarse en el centrómero durante la prometafase y la metafase (Zeitlin et al., 2001) (**Figura 6**). Al igual que la AURKA, su actividad y expresión varían durante el ciclo celular, teniendo su pico de expresión en la fase G₂-M (Pérez Fidalgo et al., 2009). La AURKB se une a la proteína del centrómero interno, la survivina y la borealina para formar el complejo pasajero cromosómico (CPC) (Andrews et al., 2003). Este complejo proteico participa en varios eventos mitóticos como la condensación y segregación de los cromosomas, la citoquinesis y la unión de los microtúbulos y los cinetocoros (Maki & Wang, 2002).

1.4.1.3. Aurora quinasa C.

La AURKC es una proteína de 309 aminoácidos (**Figura 7**) codificada por un gen situado en el cromosoma humano 19q13.43 (Willems et al., 2018).

Mientras que la AURKA y AURKB se expresan en células somáticas, la AURKC se expresa únicamente en los espermatocitos y los ovocitos (Khan et al., 2011). La AURKC ha sido identificada durante la mitosis, desde anafase hasta la citocinesis (**Figura 6**) (Kimura et al., 1999). Al igual que la AURKB, es capaz de formar el CPC por lo que ambas proteínas presentan funciones similares. Sin embargo, la AURKC también juega un papel importante en la regulación de la meiosis y más particularmente en la espermatogénesis (Sasai et al., 2004).

1.4.2. Estructura.

Las AURKs están compuestas por un dominio quinasa (250-300 aminoácidos) y dos dominios no catalíticos: un dominio N-terminal (39-139 aminoácidos) y un dominio C-terminal (15-20 aminoácidos) (**Figura 7**) (Bolanos-Garcia, 2005).

1.4.2.1. Dominio quinasa.

El dominio quinasa presenta una cierta variabilidad entre las diferentes AURKs, presentando un 60-70% de semejanza entre las diferentes formas. Dicho dominio está constituido por un lóbulo N-terminal de cadena β y un lóbulo C-terminal de hélice α , los cuales se encuentran unidos por una región bisagra, la cual permite la conformación activa del dominio ya que permite el plegamiento de ambos lóbulos (Cheetham et al., 2002).

Por otro lado, también se puede hacer una división del dominio quinasa en doce subdominios conservados, los cuales se encuentran separados por sitios de inserción menos conservados (Taylor & Kornev, 2011).

Dentro del lóbulo C-terminal cabe destacar un subdominio conservado en Thr288 (AURKA), Thr232 (AURKB) y Thr195 (AURKC), cuya fosforilación induce un cambio conformacional el cual está asociado a la adquisición de la actividad quinasa (Dodson et al., 2010).

1.4.2.2. Dominios no catalíticos.

Como ya se ha comentado, tanto el dominio C-terminal como el dominio N-terminal presentan cierta variación de tamaño y secuencia dentro de las AURKs.

El dominio C-terminal regula la interacción de las AURKs con cofactores responsables de la conformación de la proteína, lo cual afecta a la actividad quinasa de la proteína. Por otro lado, el extremo N-terminal regula la unión de la AURK a proteínas responsables de su localización celular (Berman et al., 2000; Damodaran et al., 2017).

Dentro de estos dominios se encuentran motivos lineales cortos (SLiMS) que son reconocidos por la proteína CDH1, la cual desencadena la degradación a través del proteosoma de las AURKs (Baldini et al., 2014). Dentro de las AURKs encontramos tres clases de SLiMs: (i) las cajas D, las cuales fueron las primeras en identificarse y son las únicas que se encuentran tanto en los dominios N y C-terminales como dentro del dominio quinasa, (ii) Los motivos Ken, los cuales se encuentran en el extremo N-terminal de AURKA y AURKB y (iii) las cajas DAD/A, las cuales también las encontramos en el extremo N-terminal de AURKA y AURKB (**Figura 7**) (Min et al., 2013; Seeling et al., 2017).

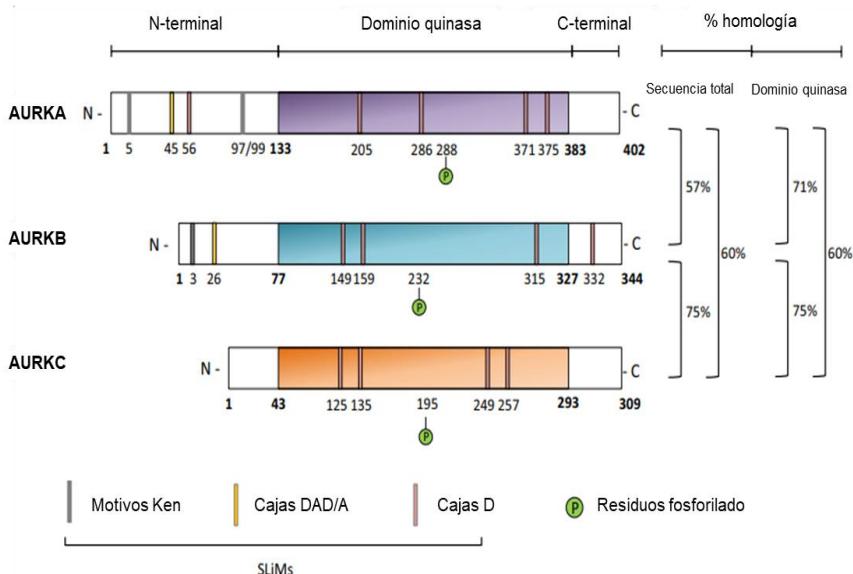


Figura 7: Representación esquemática de la estructura de las AURKs y sus diferentes SLiMS. Adaptada de Willems et al., 2018.

1.4.3. Aurora quinasa A en el cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, la AURKA tiene un papel esencial en numerosos eventos que tienen lugar durante la mitosis, por lo que su

sobreexpresión podría estar relacionada con un incremento de la división celular, lo cual está directamente relacionado con determinados procesos tumorigénicos. De hecho, una de las características que comparten el COSAG y el CMTN es la sobreexpresión de la *AURKA* con respecto al tejido sano (Pérez Fidalgo et al., 2009). Otros estudios también han reportado una sobreexpresión de *AURKA* en tumores de colon, páncreas y gástricos (Li et al., 2003; Sakakura et al., 2001).

Dicha sobreexpresión de *AURKA*, genera uniones aberrantes entre los microtúbulos y los cinetocoros, lo cual ocasiona fallos en la citoquinesis como la aparición de múltiples núcleos y husos multipolares (Pérez Fidalgo et al., 2009) (**Figura 8**). Este tipo de fallos en la citoquinesis deberían de ser detenidos por el punto de control de huso mitótico mediado por la proteína Mad2. Sin embargo, existen estudios que sugieren que la *AURKA* interrumpe la interacción de Mad2 con su ligando CDC20, inactivando así dicho punto de control (Jiang et al., 2003).

Estos fallos en la citoquinesis dan como resultado células tetraploides, las cuales deben de pasar por el punto de control postmitótico G₁ mediado por la vía p53-Rb. En condiciones normales, las células tetraploides no son capaces de pasar dicho punto de control y son eliminadas a través de la apoptosis mediada por la activación de p53. Sin embargo, las células tumorales de COSAG y CMTN presentan mutaciones en *p53* en el 80% de los casos, lo cual da como resultado la pérdida de función de la proteína y la desactivación del punto de control. Como consecuencia, se produce la amplificación del centrosoma de las células tetraploides, que produce inestabilidad cromosómica denominada aneuploidía y que tiene como

resultado la formación del tumor (**Figura 8**) (Fujiwara et al., 2005; Meraldí et al., 2002).

Existen otros estudios que relacionan la AURKA con otras vías tumorigénicas. En el estudio publicado por Yang et al. (2004) se relaciona un incremento de AURKA con un aumento en la actividad de la telomerasa mediante la regulación positiva de *C-MYC*, lo cual incrementa el tiempo de supervivencia celular. Por otro lado, el estudio publicado por Wu et al., (2005) relaciona un incremento de la AURKA con una migración celular inapropiada, la cual está relacionada con la metástasis en el cáncer.

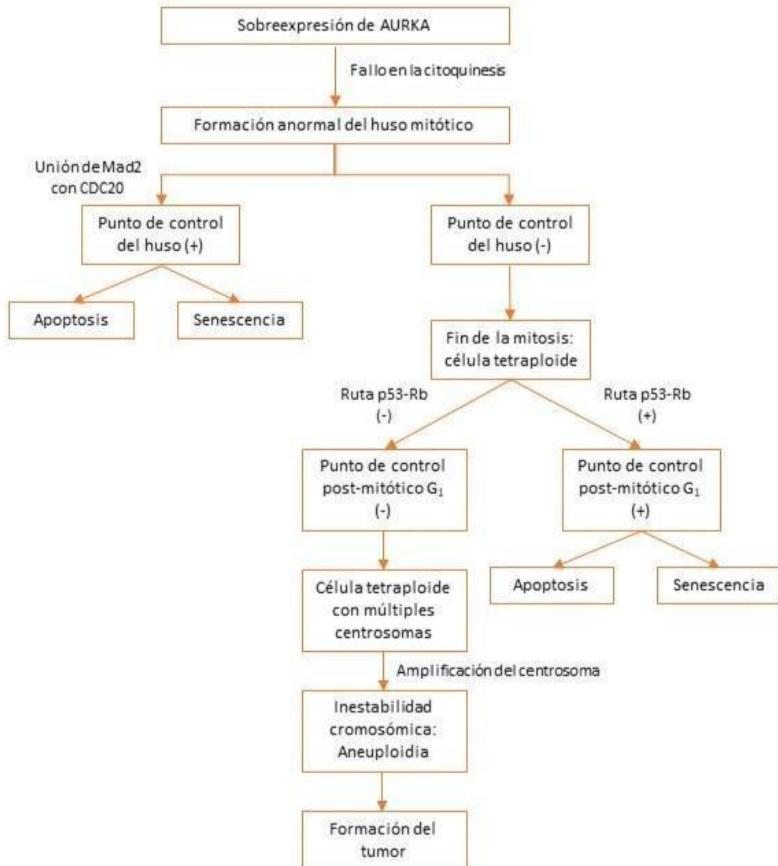


Figura 8: Representación esquemática del mecanismo a través del cual la sobreexpresión de la AURKA está implicada en la generación del tumor. Adaptada de Pérez Fidalgo et al., 2009.

1.4.4. Inhibidores de aurora quinasa A para el tratamiento del cáncer.

La evidencia de que existe una relación entre una sobreexpresión de AURKA y el proceso de tumorigénesis en determinados tipos de cáncer ha

respaldado la hipótesis de que la inhibición de AURKA podría ser utilizada como alternativa terapéutica en determinadas neoplasias.

En los últimos años se han identificado numerosas moléculas de pequeño tamaño que afectan selectivamente inhibiendo AURKA (Du et al., 2021). Algunas de estas moléculas han demostrado en estudios preclínicos tener un efecto anticancerígeno, como por ejemplo BPR1K0609S1 (Shionome et al., 2013), CYC3 (Lin et al., 2012) y MK-8745 (Nair et al., 2012). Por otro lado, se han desarrollado también inhibidores específicos de AURKA que han demostrado tener eficacia en ensayos clínicos en fase I, como son ENMD-2076 (Diamond et al., 2011), MK-5108 (Amin et al., 2016) y MLN8237 (Cervantes et al., 2012).

Una de las características de los inhibidores de AURKA que apoya su utilización, en detrimento de la terapia convencional, es que las quinasas solo son activas en células con una elevada actividad proliferativa, como las células tumorales, no afectando de esta manera a las células sanas (Ditchfield et al., 2003). Este hecho hace que un inhibidor de AURKA presente una mayor especificidad que el tratamiento convencional, el cual es independiente del ciclo celular (Du et al., 2021).

1.4.4.1. Utilización de MLN8237 en monoterapia.

El MLN8237 o alisertib es un inhibidor de AURKA de administración oral selectivo de segunda generación. Tras su unión a la AURKA induce la aparición de anomalías del huso mitótico, las cuales se acumulan hasta provocar la muerte celular por apoptosis o autofagia (Pérez Fidalgo et al., 2009). Su predecesor, MLN8054, finalizó su desarrollo en ensayo clínico en fase I con pacientes con tumores sólidos, ya que demostró

causar efectos secundarios adversos sobre el sistema nervioso central (Dees et al., 2011).

El mecanismo de acción de alisertib se basa en la inhibición de la capacidad de fosforilación de la AURKA, lo cual tiene como resultado la pérdida de función de la proteína. Esto ejerce un efecto significativo sobre la mitosis, induciendo la parada del ciclo celular en G₂ y favoreciendo la muerte celular por apoptosis o senescencia (Görgün et al., 2010; Liu et al., 2013).

La utilización de alisertib ha demostrado tener eficacia en modelos de xenoinjerto derivados de líneas celulares y de pacientes (PDX) con varios tipos de tumores, entre los que encontramos cáncer de colon (Pitts et al., 2016), cáncer de vejiga (Zhou et al., 2013), adenocarcinoma de esófago (Sehdev et al., 2012) y glioblastoma (Kurokawa et al., 2017).

Debido a la eficacia que ha demostrado tener el tratamiento con alisertib en estudios preclínicos, su desarrollo ha pasado a ensayos clínicos en pacientes. Los resultados obtenidos en ensayos clínicos en fase II han sido prometedores en varios tipos de neoplasias, entre las que encontramos cáncer de próstata (Beltran et al., 2019), CM (Melichar et al., 2015), cáncer de pulmón de células pequeñas (Melichar et al., 2015), CO (Matulonis et al., 2012) y linfoma periférico de células T (LPCT) (Barr et al., 2015), incluso, recientemente, alcanzando la fase III para el tratamiento de LPCT (O'Connor et al., 2019).

Otros ensayos en fase I y II se han centrado en estudiar también las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de alisertib en pacientes con tumores en estadios avanzados (Cervantes et al., 2012; Dees et al.,

2012; Friedberg et al., 2014). Los resultados muestran que la dosis recomendada en fase II de alisertib es de 50 mg dos veces al día durante siete días en ciclos de 21 días, sin embargo, la dosis pediátrica recomendada baja a 80 mg una vez al día durante siete días debido a que los niños muestran una mayor frecuencia de mielosupresión que los adultos (Mossé et al., 2012).

1.4.4.2. Combinación de alisertib con otras terapias.

El tratamiento con alisertib ha demostrado tener potencial para mejorar la efectividad de determinadas estrategias terapéuticas contra el cáncer, tanto en estudios preclínicos como ensayos clínicos (Du et al., 2021).

1.4.4.2.1. Combinación de alisertib con quimioterapia y radioterapia.

Numerosos estudios se han centrado en el beneficio de la utilización de alisertib junto con la quimioterapia convencional basada en platinos y taxanos para el tratamiento de determinadas neoplasias. Un ensayo clínico multicéntrico en fase I demostró que la combinación de alisertib con docetaxel era bien tolerada y presentaba una actividad antitumoral efectiva en varios tipos de tumores (Graff et al., 2016). Otro ensayo clínico en fase II también demostró que la combinación de alisertib con paclitaxel presentaba una actividad antitumoral prometedora en pacientes con COE (Falchook et al., 2019). Por otro lado, la eficacia de la combinación de alisertib junto con carboplatino ha sido ensayada en líneas celulares de glioblastoma resistentes al tratamiento con platinos, sin embargo, los resultados mostraron una efectividad selectiva, dependiente de la expresión de la O6-metilguanina ADN metiltransferasa (Sak et al., 2019).

Otros estudios se han centrado en sí la combinación de alisertib junto con radioterapia podría aumentar su actividad antitumoral. En estudios preclínicos, el tratamiento previo con alisertib ha demostrado aumentar la sensibilidad a la radiación en células de tumores teratoideos/rabdoides atípicos (Venkataraman et al., 2012). Por otro lado, un ensayo clínico en fase I en pacientes con glioma recurrente de alto grado determinó que la utilización de alisertib junto con la radioterapia era bien tolerada y podría ser interesante para pasar a fase II en el futuro (Song et al., 2019).

1.4.4.2.2. Combinación de alisertib con terapias dirigidas.

El cáncer es una enfermedad en la cual se han determinado numerosos genes que pueden ser utilizados como dianas para su tratamiento (oncogenes), es por esto por lo que se ha planteado si la combinación de alisertib junto con otros inhibidores específicos de determinados oncogenes podría ser efectiva para el tratamiento de este. Uno de estos agentes terapéuticos son los inhibidores de la proteína histona deacetilasa (HDAC), la cual regula la expresión de numerosos genes a través de la desacetilación de histonas. En un estudio preclínico en líneas de linfoma de células T se demostró que la combinación de alisertib junto con el inhibidor de HDAC, la romidepsina, era altamente sinérgica a través de la regulación de la citocinesis (Zullo et al., 2015). Por otro lado, un ensayo clínico en fase I en pacientes con neoplasias linfoideas en recaída determinó que la combinación de alisertib con otro inhibidor de HDAC, el vorinostat, presentaba una efectividad alejadora y una estabilidad aceptable (Siddiqi et al., 2020).

Por otro lado, también se ha evaluado si la combinación de alisertib con inhibidores de la proteína 4 que contiene un bromodominio (BRD4) podría ser sinérgica, ya que ambos son reguladores de genes de la familia MYC. Un estudio preclínico en líneas celulares de glioblastoma determinó que la combinación de alisertib junto con un inhibidor de BRD4, el JQ1, tenía un efecto sinérgico en células que presentaban una sobreexpresión de *C-MYC* (Cancer et al., 2019).

Finalmente, también es interesante la combinación de alisertib junto con inhibidores de la proteína MDM2, ya que esta actúa como un supresor de p53. Un estudio preclínico en líneas celulares de melanoma demostró que la combinación de alisertib junto con un inhibidor de MDM2, el Nutlin-3, frenaba el crecimiento celular, limitando la vida útil de las células senescentes y favoreciendo la eliminación del tumor (Vilgelm et al., 2015).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Hipótesis.

La AURKA es una proteína clave en los mecanismos de carcinogénesis en el cancer de ovario de alto grado (COAG) y el CMTN, y constituye un potencial mecanismo de resistencia a compuestos derivados del platino y/o iPARP.

Por lo tanto, nos planteamos la hipótesis de si la inhibición o infraexpresión de la AURKA ya sea por silenciamiento o inhibición farmacológica podría utilizarse para revertir la resistencia al tratamiento con platinos y/o iPARP en modelos de líneas celulares de COAG y CMTN.

En este contexto, la combinación de un inhibidor de AURKA junto con un iPARP podría establecer una estrategia terapéutica de reversión de resistencia a nivel preclínico con potencial traslación a la clínica.

2.2. Objetivos.

Objetivo principal:

Evaluar si la inhibición, tanto genética como farmacológica, de la AURKA podría utilizarse para revertir la resistencia a olaparib y carboplatino en los modelos celulares generados.

Objetivos secundarios:

1. Generar modelos preclínicos basados en líneas celulares de COAG y CMTN que presenten una resistencia adquirida a olaparib.
2. Generar modelos preclínicos basados en líneas celulares de COAG y CMTN que presenten una resistencia adquirida a carboplatino.
3. Esclarecer si existe una resistencia cruzada entre los modelos de líneas celulares resistentes a olaparib y los modelos resistentes a carboplatino.
4. Caracterizar los modelos celulares generados con resistencia adquirida a olaparib y/o carboplatino.
5. Determinar si la expresión de AURKA podría estar relacionada con el mecanismo a través del cual se produce la adquisición de la resistencia a olaparib y/o carboplatino en los modelos celulares generados.
6. Evaluar la posible utilización de la AURKA como marcador pronóstico de supervivencia en pacientes de COAG y CMTN.
7. Estudiar si la combinación de un iPARP (olaparib) junto con un inhibidor de AURKA (alisertib) podría establecerse como una nueva estrategia terapéutica eficaz para la reversión de la

Hipótesis y objetivos

resistencia a olaparib y/o carboplatino en los modelos celulares generados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Líneas celulares y cultivo celular.

3.1.1. Líneas celulares.

Para la realización de este estudio se utilizaron las líneas celulares de COSAG PEO1 y Kuramochi. La línea PEO1 fue amablemente cedida por el grupo colaborador de la Dra. Marta Mendiola (Hospital Universitario La Paz, Madrid, España). La línea Kuramochi fue adquirida de la *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank* (JCBR) (#JCRB0098, Tokyo, Japon).

Por otro lado, seleccionamos la línea celular de COEN SKOV3, la cual fue adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (#HTB-77, Manassas, VA, USA).

Además, se utilizó la línea celular de CMTN MDA-MB-231, adquirida de la ATCC (#CRM-HTB-26, Manassas, VA, USA).

La selección de las líneas celulares se realizó principalmente centrándonos en que las líneas celulares de COSAG (PEO1 y Kuramochi) y la línea celular de CMTN (MDA-MB-231) son las más estudiadas en la bibliografía actualmente. Presentando, PEO1 y Kuramochi, mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* (**Tabla 4**) y, por lo tanto, siendo buenas candidatas para la generación de resistencias a iPARP debido a la reversión de la mutación en *BRCA1/2*. De forma paralela, decidimos incluir la línea de COEN SKOV3, la cual no presenta mutaciones en *BRCA1/2* (**Tabla 4**). Esto se hizo con el objetivo de estudiar posibles mecanismos de resistencia a iPARP independientes de *BRCA1/2* y si

Materiales y métodos

AURKA podría utilizarse como diana para el tratamiento de dichas resistencias.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en el medio de cultivo recomendado por la casa comercial, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (#10500064, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) y un 1% de penicilina/estreptomicina (#L0018-100, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania), en un incubador (modelo Forma steri-cycle, #161657-9218, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) humidificado a unas condiciones de temperatura de 37 °C y un 5% de CO₂. Las condiciones de cultivo y características de las líneas celulares se especifican en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Características de las líneas celulares seleccionadas. (Heterocigótica (HT); Homocigótica (HM)).

Línea celular	MDA-MB-231	PEO1	Kuramochi	SKOV3
Medio de cultivo	DMEM-F12 (#L0090, Biowest)	DMEM High Glucose (#D5796, Sigma-Aldrich)	RPMI 1640 (#L0500, Biowest)	McCoy's 5A (#MCC-A, Capricorn Scientific)
Propiedades de crecimiento	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente
Tejido	Adenocarcinoma mamario metastático	Ovario; líquido ascítico	Ovario; líquido ascítico	Ovario; líquido ascítico
Tipo celular	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Edad de la paciente	51	desconocida	desconocida	64
Género	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer
Etnia	Caucásica	Caucásica	Asiática del este	Caucásica
Enfermedad	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma
Patrón mutacional	<i>CDKN2A</i> (HM), <i>CDKN2B</i> (HM), <i>BRAF</i> (HT), <i>KRAS</i> (HT), <i>TERT</i> , <i>TP53</i> (HM)	<i>TP53</i> , <i>BRCA2</i> (HM)	<i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> (HM)	<i>APC</i> (HT), <i>FBXW7</i> (HT), <i>PIK3CA</i> (HT), <i>TP53</i> (HM)

3.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares.

Tanto la manipulación de todas las líneas celulares como la preparación de los reactivos se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una

Materiales y métodos

cabina de flujo laminar (BIO-II-A TELSTAR, Madrid, España). En cuanto al mantenimiento de las líneas celulares, estas se sembraron en frascos T25 (#PLC70025, Labclinics, Madrid, España) T75 (#PLC70075, Labclinics, Madrid, España) y T175 (#PLC71175, Labclinics, Madrid, España), con un volumen de medio suplementado de 5 mL, 10 mL y 20 mL respectivamente, dependiendo del experimento.

Todas las líneas celulares fueron pasadas cuando alcanzaron el 90% de confluencia. Para ello, se realizó un lavado con Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) (#L0615-500, Biowest, Nuaillé, France), utilizando 2 mL para los T25, 4 mL para los T75 y 10 mL para los T175. Posteriormente se incubaron con 0.25% tripsina-EDTA estéril y filtrada (#L0930-500, Labclinics, Madrid, España), utilizando 1mL para los T25, 3 mL para los T75 y 8 mL para los T175, en unas condiciones de 37 °C y un 5% de CO₂ hasta que se observó al microscopio que ninguna de las células continuaba adherida al frasco. Posteriormente, la tripsina se inactivó utilizando el doble de volumen de medio de cultivo suplementado recomendado por la casa comercial, se recogieron las células en suspensión y se centrifugaron en una centrífuga (modelo 5810R, #5810000010, Eppendorf, Madrid, España) a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos antes del subcultivo. Una vez finalizado este tiempo, se eliminó el medio sobrante y el pellet celular obtenido se resuspendió en un mililitro de medio de cultivo suplementado.

Por último, las células se contaron añadiendo 10 µl de suspensión celular en un *Automatic Cell Counter TC10™* (#1450010, Bio-rad, Hercules, CA, USA) el cual nos indica la concentración en células por mililitro. La cantidad de células a sembrar en el frasco dependerá de si es para un

experimento (70-80% de confluencia) o para mantenimiento celular (10% de confluencia).

3.1.3. Generación de stock celular y congelación.

Con el objetivo de tener una reserva de células garantizada, se congelaron todas las líneas celulares en pasos tempranos. Para ello, se extrajo un pellet celular, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.2. *Mantenimiento de los cultivos celulares*, se resuspendió en un mililitro de una solución compuesta por un 90% de SBF y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (#41639, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) y se alicuotó en crioviales (#CRTT-018-025, PALBALAB, Valencia, España). A continuación, se colocaron los crioviales en un enfriador de congelación a -80 °C con isopropanol (#I9516, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, USA), lo que permite una bajada gradual de la temperatura y evita la formación de cristales que rompen la membrana celular. Transcurridas 24 horas, los crioviales se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido (modelo ARPEGE140, #113356, Air liquide, Madrid, España) a -200 °C para su mantenimiento a largo plazo hasta su utilización.

3.1.4. Descongelación de líneas celulares.

Si por cualquier problema se perdía alguna de las líneas celulares utilizadas, se llevó a cabo la descongelación de alguno de los crioviales.

Para ello, se dejó el crioval en un incubador humidificado a unas condiciones de temperatura de 37 °C y un 5% de CO₂ hasta que se descongeló, se recogió la suspensión celular junto con 5 mL de medio suplementado con el objetivo de disminuir la concentración de DMSO, el

cual es tóxico para las células cuando estas no están congeladas, y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Una vez terminó la centrífuga, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 2 mL de PBS para eliminar los posibles restos de DMSO. Finalmente se volvió a centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en un mililitro de medio suplementado y se sembró en un frasco T25.

3.2. Fármacos utilizados.

Los fármacos utilizados en esta tesis doctoral fueron los descritos a continuación:

- AZD2281 (olaparib): un inhibidor de PARP (#S1060, Selleckchem, Houston, TX, USA). Este fármaco se reconstituyó en DMSO a una concentración final de 50 mM, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, y se almacenó en alícuotas a -80°C.
- Carboplatino: un agente alquilante que frena el ciclo celular en fase G₂ e induce apoptosis (#664732.5, Pfizer, NY, USA). Este fármaco se reconstituyó en suero fisiológico a una concentración final de 26,9 mM, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se almacenó a temperatura ambiente durante una semana, ya que es el tiempo máximo que mantiene su bioestabilidad.
- MLN8237 (alisertib): un inhibidor de AURKA (#S1133, Selleckchem, Houston, TX, USA). Este fármaco se reconstituyó en DMSO a una concentración final de 50 mM, según las recomendaciones de la casa comercial, y se almacenó en alícuotas a -80°C.

3.3. Ensayo de viabilidad celular “*in vitro*”.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) (MTT) (#111714, Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, USA), se trata de un ensayo colorimétrico basado en la conversión del reactivo MTT a cristales de formazán a través de la escisión del anillo de tetrazolio producido por la enzima deshidrogenasa característica de la actividad redox mitocondrial de las células vivas. Para la realización de este ensayo, se sembraron 5000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (#PLC30096, Labclinics, Madrid, España) realizando un triplicado por cada condición. Transcurridas 24 horas, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de los diferentes fármacos utilizados durante un periodo de 72 horas a 37 °C y un 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el tratamiento y se añadieron 100 µL del reactivo MTT preparado a una concentración de 5 mg/mL a cada pocillo durante un periodo de 3-4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente, se descartó el MTT y se añadieron 100 µL de isopropanol para disolver los cristales de formazán y generar el característico color violeta. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a 570nm para determinar la cantidad de reactivo MTT convertido en cristales de formazán y 690nm para restar el fondo de la placa, el cual podría influir en la fiabilidad de la primera medición. Estos datos fueron posteriormente procesados utilizando el programa GraphPad Prism software (versión 8.02; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) para el cálculo de la concentración inhibitoria media (IC₅₀), la cual es la

concentración de un compuesto que es necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50% en comparación con un control sin tratamiento.

3.4. Generación de líneas celulares resistentes.

Una vez se estabilizaron en cultivo las diferentes líneas celulares, se comenzó con los experimentos de generación de líneas resistentes a olaparib y carboplatino.

3.4.1. Líneas celulares resistentes a olaparib.

Se sembraron las líneas celulares MDA-MB-231, Kuramochi y SKOV3 en frascos T25 hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. Posteriormente, fueron tratadas durante 72 horas con dosis crecientes de olaparib durante un periodo comprendido entre seis meses y un año, dependiendo de la línea celular utilizada, dejando un periodo de entre una semana y un mes para que las líneas celulares se recuperaran antes de volver a tratarlas. Para las primeras dosis se utilizaron concentraciones por debajo de la IC₅₀ (20 µM para MDA-MB-231, 20 µM para Kuramochi y 50 µM para SKOV3) y se fueron incrementando tras un periodo de reposo conforme los clones celulares resistentes fueron apareciendo. Una vez alcanzadas dosis de tratamiento por encima de la IC₅₀ (120 µM para MDA-MB-231, 120 µM para Kuramochi y 300 µM para SKOV3), se verificó la resistencia mediante un ensayo MTT comparando la IC₅₀ para olaparib de la línea celular generada con la IC₅₀ de su línea celular parental. De esta manera establecimos las líneas celulares MDA-MB-231R, KuramochiR y SKOV3R con resistencia adquirida a olaparib.

Por otro lado, la línea celular con resistencia adquirida a olaparib PEO1R fue cedida amablemente por el grupo colaborador de la Dra. Marta Mendiola (Hospital Universitario La Paz, Madrid, España). Esta línea celular se generó siguiendo un protocolo distinto al utilizado por nuestro laboratorio. En este caso la línea celular PEO1 recibió tratamientos con una dosis de olaparib por encima de la IC_{50} ($80 \mu\text{M}$), posteriormente se recogieron los clones celulares resistentes y se esperó el tiempo necesario para que estos se recuperasen del tratamiento para realizar el siguiente. Una vez se observó que el tratamiento ya no era efectivo en la línea celular, se verificó la resistencia mediante un ensayo MTT comparando la IC_{50} para olaparib de la línea celular generada con la IC_{50} de su línea celular parental.

Para mantener la resistencia adquirida a olaparib, todas las líneas celulares fueron tratadas mensualmente con una dosis de olaparib correspondiente a su IC_{50} durante un periodo de 72 horas ($100 \mu\text{M}$ para MDA-MB-231R, $100 \mu\text{M}$ para KuramochiR, $250 \mu\text{M}$ para SKOV3R y $20 \mu\text{M}$ para PEO1R).

3.4.2. Líneas celulares resistentes al carboplatino.

Siguiendo el mismo protocolo especificado en el apartado 4.1 *Líneas celulares resistentes a olaparib*, utilizando un rango de concentraciones comprendido entre $400 \mu\text{M}$ y 1 mM , se consiguió establecer la línea celular de CMTN con resistencia adquirida a carboplatino MDA-MB-231RCBP. El resto de líneas celulares todavía están en proceso de desarrollar la resistencia al carboplatino, pero esperamos establecerlas en los próximos meses.

Por otro lado, se seleccionó la línea celular de COSAG PEO4, ya que esta presenta resistencia innata al carboplatino, y fue cedida amablemente por el grupo colaborador de la Dra. Marta Mendiola (Hospital Universitario La Paz, Madrid, España). Dicha línea celular se extrajo de la misma paciente que la línea celular PEO1, cuando esta desarrolló resistencia al tratamiento con carboplatino.

Para mantener la resistencia adquirida a carboplatino, la línea celular MDA-MB-231RCBP fue tratada mensualmente con una dosis de carboplatino correspondiente a su IC₅₀ durante un periodo de 72 horas (900 µM). La línea celular PEO4, al presentar una resistencia innata al carboplatino no requiere ningún tratamiento para mantener la resistencia.

3.5. Secuenciación comparativa de las líneas celulares sensibles y resistentes.

Por tal de comprobar si la generación de las líneas celulares con resistencia adquirida (MDA-MB-231R, MDA-MB-231RCBP, PEO1R, KuramochiR y SKOV3R) afectó a su patrón mutacional, se realizó una secuenciación comparativa con las líneas celulares sensibles (MDA-MB-231, PEO1, Kuramochi y SKOV3). Dicho análisis fue realizado por la Unidad de Medicina de Precisión del IIS INCLIVA.

En primer lugar, se sembraron todas las líneas celulares hasta que alcanzaron una confluencia del 90%, a continuación, se extrajo un pellet celular y se realizó la extracción de ADN mediante purificación automatizada con bolas paramagnéticas en el equipo Maxwell 16 LEV

Materiales y métodos

(Promega, Madrid, España) con el Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se realizó la amplificación de las regiones exónicas de los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53* mediante paneles diseñados por la Unidad de Medicina de Precisión del IIS INCLIVA, se seleccionaron estos genes debido a que sus mutaciones son la principal causa de la capacidad tumorigénica de las líneas celulares utilizadas. La generación de las librerías se realizó mediante dos pasos de reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) utilizando la enzima Multiplex de Qiagen y los adaptadores de Nextera (Illumina, San Diego, CA, USA) como adaptadores de secuenciación. Finalmente, la secuenciación se realizó en plataformas illumina con configuración 150PE, para la obtención de una cobertura mínima de 250X (**Figura 9**).

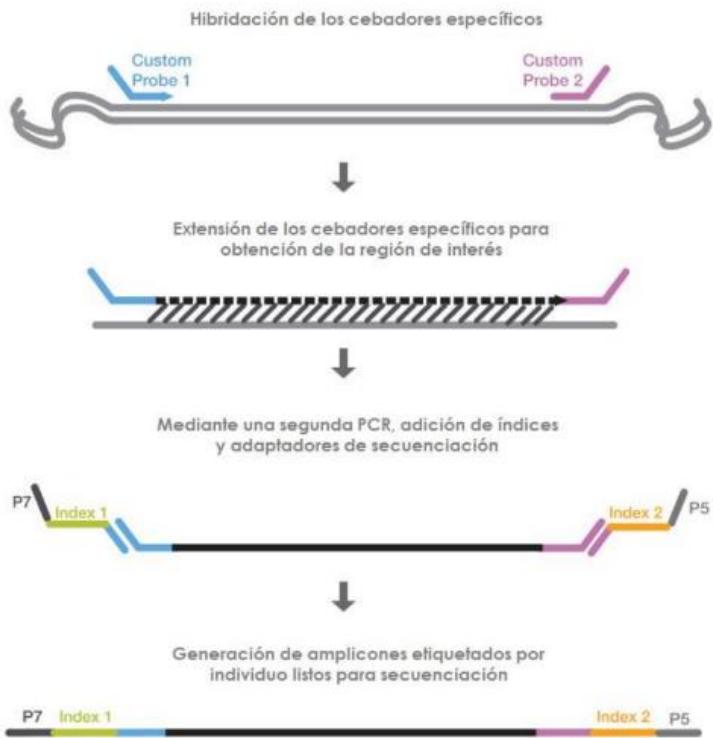


Figura 9: Representación esquemática del proceso de secuenciación realizado por la Unidad de Medicina de Precisión del IIS INCLIVA.

3.6. Análisis de expresión génica.

Con el objetivo de determinar cambios en los niveles de expresión del gen *AURKA* entre las líneas celulares sensibles y resistentes, se utilizó un protocolo constituido por tres pasos: extracción y cuantificación de ARN, transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y evaluación génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

3.6.1. Extracción y cuantificación de ARN.

En primer lugar, se sembraron todas las líneas celulares hasta que alcanzaron una confluencia del 90%, a continuación, se extrajo un pellet celular y se añadieron 500 µL de Trizol (#15596026, Invitrogen, Carlsbad, CA, Texas, USA) para lisar las células. Seguidamente se añadieron 100 µL de cloroformo (#496189, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. En este punto se formaron tres fases: una fase orgánica con proteínas, una interfase con ADN y una fase acuosa con ARN. A continuación, se recogió la fase acuosa y se añadieron 250 µL de isopropanol y se incubaron durante la noche a -20 °C para la precipitación del ARN. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 50 uL de etanol (#51976, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) al 75% en agua libre de ARNasas. y se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el ARN en 30 µL de agua libre de ARNasas.

Las muestras de ARN fueron cuantificadas usando el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La pureza del ARN se determinó mediante una ratio de 260/280 para la contaminación por compuestos aromáticos y una ratio 260/230 para la contaminación por compuestos fenólicos y sales, siendo un valor comprendido entre 1.8 y 2 aceptado como ARN puro.

3.6.2. Transcripción inversa a ADN complementario.

Para pasar de ARN a ADN complementario (ADNc) se utilizó el método de transcripción inversa. Para ello, 1000 ng de ARN de cada muestra fueron retrotranscritos mediante el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (#34368814 Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reactivos para cada muestra se describe en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Descripción de la preparación de la mezcla para la transcripción inversa de las muestras de ARN.

Transcripción inversa de ARN	
Mezcla	1000 ng de ARN 4 µl de cebadores aleatorios 4 µl de RT buffer 10x 2 µl de transcriptasa inversa 1,6 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) H ₂ O hasta completar un volumen final = 20 µl

La transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo una reacción de tres fases: 10 minutos a 25 °C para la unión de la transcriptasa inversa a la cadena de ARN (iniciación), 120 minutos a 37 °C para que la enzima transcriba el ARN a ADNc (elongación) y 5 minutos a 85 °C para separar la transcriptasa inversa una vez ha finalizado el proceso (terminación). Finalmente, las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C para su posterior utilización.

3.6.3. PCR cuantitativa en tiempo real.

Para determinar los niveles de expresión génica se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando el reactivo Luna Universal Probe qPCR Master Mix (#M3004, New England Biolabs, Ipswich, MA USA) y sondas específicas TaqMan para AURKA (#Hs01582072, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y el gen utilizado como control de carga, *GAPDH* (#Hs03929097, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reactivos para cada muestra se describe en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Descripción de la preparación de la mezcla de reactivos para la RT-qPCR.

	RT-qPCR
Mezcla	2 µl de ADNc 5 µl de Master Mix 0.5 µl de sonda TaqMan 2,5 µl de H ₂ O Volumen final = 10 µl

La RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el sistema 9700HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), siguiendo una reacción de 4 fases: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Para el análisis de los resultados se utilizó el software Quant Studio 5 RealTime PCR (Applied Biosystems). El primer paso fue la normalización de la expresión de todos los genes en base a la expresión de *GAPDH*. Posteriormente, se calculó el valor umbral del número de ciclos (Ct) para

cada medición. Finalmente, se calcularon los niveles de expresión de ARNm utilizando el umbral crítico comparativo (F_c) siguiendo la fórmula $(2^{-\Delta CT})$.

3.7. Análisis de la expresión proteica.

Con el objetivo de determinar cambios en los niveles de expresión proteica de AURKA entre las líneas celulares sensibles y resistentes, así como analizar la expresión del marcador de daño en el ADN, γ -H2AX, como respuesta a distintos tratamientos en todas las líneas celulares, y utilizando GAPDH como control de carga, se utilizó un protocolo constituido por tres pasos: extracción y cuantificación de proteínas, Wester Blot y análisis cuantitativo del Western Blot.

3.7.1. Extracción y cuantificación de proteínas.

En primer lugar, se sembraron todas las líneas celulares hasta que alcanzaron una confluencia del 90% y se extrajo un pellet celular. Para la extracción de proteínas, las células se lisaron durante 15 minutos con tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sal sódica de ácido desoxicólico) (#89900, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (#05892970001, Roche, Mannheim, Germany). Posteriormente, las muestras fueron sonicadas durante 10 segundos al 40% de amplitud para romper la membrana celular y centrifugadas a 13000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. A continuación, se descartó el pellet y el sobrenadante resultante se cuantificó utilizando el kit de ensayo proteico Pierce BCA (#23227, Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este es un ensayo colorimétrico basado en la reacción de reducción del catión cuproso (Cu^{1+}) producida por las proteínas en un medio alcalino (también conocida como reacción de Biuret) y la detección selectiva del Cu^{1+} mediante ácido bicineconíco (BCA) que da como resultado un color morado. Tras una incubación de 30 minutos, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro SpectraMax Plus (Molecular Devices) a 595 nm y los resultados se interpolaron en una curva patrón realizada con albúmina de suero bovino (BSA) (#A9647, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) con concentraciones en un rango de 0 mg/mL a 1 mg/ml.

3.7.2. Western blot.

Para determinar los niveles de expresión proteica de AURKA, γ -H2AX y GAPDH se utilizó la técnica Western Blot. Para ello, 30 μg de proteínas de cada muestra se prepararon junto con buffer de carga Laemmli 2x (#S3401, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) para mejorar su monitorización y agua destilada. A continuación, se desnaturizaron a 97 °C durante 5 minutos para permitir su migración a través de un gel de acrilamida a una concentración de 10 - 15% y una corriente constante de 140 mV durante 90 minutos aproximadamente. Posteriormente, se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (#1620115, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) utilizando el sistema de transferencia Transfer-Blot Turbo (#1704150, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon en BSA (#1706434, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) al 5% en *Tris-Buffered Saline* (#GS13.0110, Vitro Master Diagnóstica, Sevilla, España)

con 0,1% de Tween-20 (#P1379, Sigma-Aldrich San Luis, Missouri, USA) (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, con el objetivo de impedir futuras uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados. Seguidamente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios detallados en la **Tabla 7** a una concentración de 1:1000 en BSA al 5% en TBS-T durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Transcurrido este tiempo, las membranas recibieron tres lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos secundarios detallados en la **Tabla 7** a una concentración de 1:2000 diluidos en BSA al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Por último, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con TBS-T e incubadas durante 4 minutos con el sustrato para Western blot de ECL Pierce™ (#32106, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para obtener una imagen de quimioluminiscencia. Las imágenes fueron capturadas utilizando el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Tabla 7: Lista de anticuerpos con la dilución utilizada, la fuente y la referencia.

		Dilución	Fuente	Referencia
Anticuerpos Primarios	Anti-AURKA (D3E4Q)	1:1000	Conejo	(#14475S, Cell signaling, Danvers, Massachusetts, USA)
	Anti-Phospho-histone-H2AX (Ser139)	1:1000	Conejo	(#9718, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA)
	Anti-GAPDH	1:2000	Ratón	(#MA5-15738, Invitrogen, Waltham, MA, USA)
Anticuerpos Secundarios	Anti-mouse IgG HRP-linked	1:2000	Caballo	(#7076, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA)
	Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000	Cabra	(#7074, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA)

3.7.3. Análisis cuantitativo del Western Blot.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos por Western Blot, se llevó a cabo la cuantificación de las bandas de proteínas obtenidas. Esta cuantificación representa la cantidad de proteína de cada banda en base al control de carga (GAPDH).

Para realizar la cuantificación se utilizó el software ImageJ (*National Institutes of Health*, EE. UU). Utilizando las herramientas de dicho software, se dibujó un rectángulo alrededor de la banda más gruesa de cada fila de proteínas y posteriormente se ajustó para que fuese lo más pequeña posible para rodear cada una de las bandas de la fila. Posteriormente, utilizando el mismo rectángulo para todas las bandas de la misma fila, se colocaron cada una de las bandas dentro del rectángulo y se realizó la medición, la cual nos aportó un valor numérico de la intensidad media, máxima y mínima de píxeles de cada banda. A continuación, el valor neto de cada banda se calculó restando la intensidad media de la máxima. Finalmente, los valores finales de cuantificación se calcularon como la relación entre el valor neto de intensidad de la proteína de interés y del GAPDH.

3.8. Silenciamiento de la expresión génica mediante ARN pequeño de interferencia.

El silenciamiento transitorio de *AURKA* se llevó a cabo mediante la transfección de todas las líneas celulares sensibles y resistentes con un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) determinado. En este caso, se utilizó un ARNpi específico para *AURKA* (#AM51331, #425, Invitrogen) y

un ARNpi no específico para ninguna secuencia de humano (*Scramble*) (#AM4635, Invitrogen) como control negativo de transfección.

Tras alcanzar el 70-80% de confluencia, las líneas celulares fueron transfectadas con un ARNpi específico para *AURKA*, a una concentración de 100 nM, utilizando el reactivo lipofectamina 2000 (#11668019, Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Éste se trata de un lípido catiónico que envuelve los ARNpi y les permite atravesar la membrana celular mediante un mecanismo “*flip-flop*”. Brevemente, se preparó el ARNpi junto con la lipofectamina y el medio Opti-Mem (#31985070, Thermo Fisher Scientific) para permitir la reducción de la suplementación de SBF sin generar ningún cambio en la tasa de crecimiento o la morfología de las células y se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente para facilitar la formación de los liposomas. Transcurrido este tiempo, se añadió medio de cultivo no suplementado y se conservó en las células durante un periodo de 6 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Finalmente, se les retiró el medio de transfección y se les añadió medio de cultivo suplementado.

Una vez finalizado el proceso de silenciamiento de *AURKA*, las células se sembraron en placas de 96 pocillos para realizar un ensayo MTT con olaparib, siguiendo el protocolo expuesto en el apartado 3.3 *Ensayo de viabilidad celular “in vitro”*. La eficiencia de cada silenciamiento se evaluó a las 72 horas y a los 5 días después de la transfección mediante RT- qPCR y Western blot, ya que estos son los tiempos a los que realizamos el tratamiento y posterior medición de la absorbancia para el cálculo de la IC₅₀.

3.9. Ensayo de apoptosis por citometría de flujo.

Con el objetivo de determinar el porcentaje de células que entran en apoptosis al ser tratadas con olaparib y/o alisertib, se utilizó el ensayo de apoptosis mediante citometría de flujo. Tras alcanzar el 70-80% de confluencia, todas las líneas celulares sensibles y resistentes fueron tratadas con los fármacos correspondientes durante un periodo de 72 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, 150.000 células de cada condición fueron resuspendidas en 100 µl al 1X de tampón de unión Anexina V (#BB10X, Inmunostep, Madrid, España) en agua destilada. Posteriormente, se añadió a cada muestra 5 µl de Anexina V (#ANXVF-200T, Inmunostep, España) la cual nos permite detectar las células apoptóticas debido a su capacidad para unirse a la fosfatidilserina, utilizada como marcador de apoptosis cuando se encuentra en la membrana celular externa, y se incubó durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió a cada muestra 2,5 µl de Yoduro de Propidio (IP) (#P4170, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) el cual se utiliza para detectar las células con la membrana celular dañada, ya que solo estas son capaces de captarlo, y se incubó durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

Las muestras se pasaron por un citómetro de flujo (BD FACSaria™ III, Becton Dickinson) y los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa FlowJo V10 (FlowJo, LLC).

Para el recuento de las células apoptóticas, se siguió la estrategia detallada en la **Figura 10**: primero se generó el gráfico de dispersión

Materiales y métodos

basado en la morfología celular (FSC-A contra SSC-A) para evitar la selección de artefactos no celulares, el siguiente gráfico representado fue el del tamaño celular (FSC-A contra FSC-H) en el que se seleccionó la población de células que no están formando agregados (células individuales). La tercera gráfica corresponde a la distribución de las células en función de si son positivas para la Anexina V y el IP, seleccionamos aquellas que son positivas para la Anexina V, ya que esta solo se puede unir a los residuos de fosfatidilserina de la membrana celular cuando la célula entra en apoptosis.

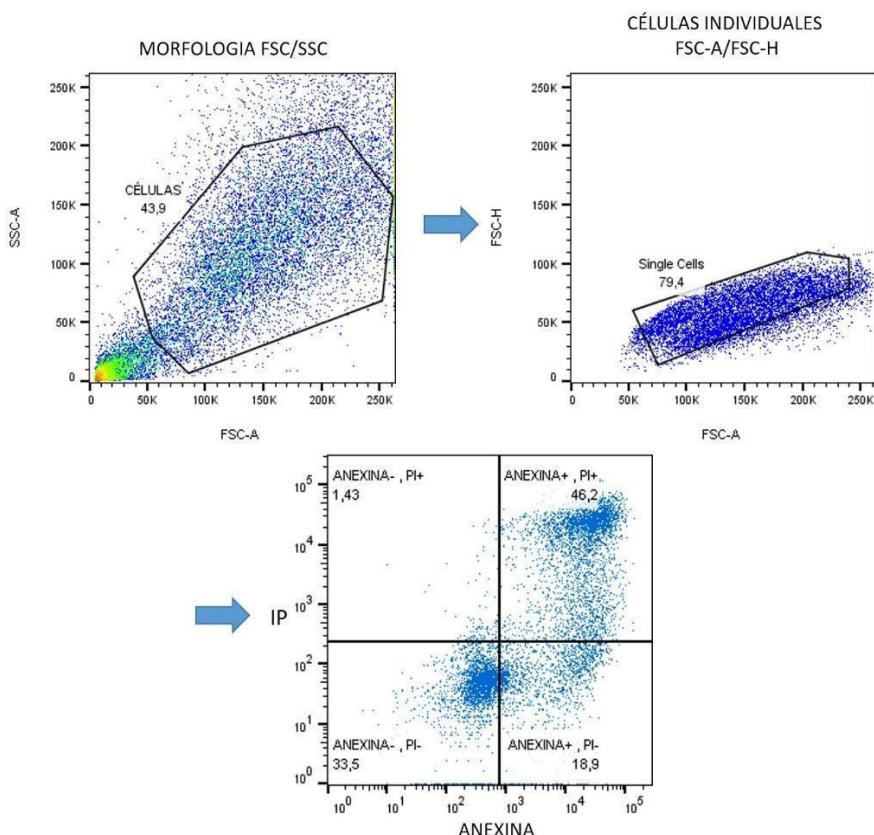


Figura 10: Esquema de la estrategia de análisis citométrico de la apoptosis. Ejemplo realizado con una muestra de la línea celular SKOV3 tratada con alisertib durante 72 horas.

3.10. Ensayo de combinación de olaparib y alisertib.

Para determinar el nivel de sinergismo, es decir, si el efecto de un fármaco se ve potenciado por el efecto del otro, entre el tratamiento con olaparib y alisertib se calculó el índice de combinación (CI) mediante el método de Chou-Talalay. Este método se basa en la ecuación del efecto mediano, derivada del principio de la ley de acción de masas, que es la teoría

unificada que proporciona el vínculo común entre una sola entidad y múltiples entidades (Chou, 2010).

Para realizar dicho ensayo, se sembraron 5000 células por pocillo, de todas las líneas celulares sensibles y resistentes en placas de 96 pocillos y se trataron con tres curvas de concentraciones crecientes de fármacos diferentes: dos de ellas correspondientes a los fármacos por separado y una correspondiente a la combinación de ambos. Tras 72 horas de incubación a 37 °C y 5% de CO₂, las placas se revelaron utilizando el ensayo MTT explicado anteriormente en el apartado *3.3 Ensayo de viabilidad celular “in vitro”*. Una vez procesados los datos de viabilidad, se analizaron utilizando el programa Compusyn (Biosoft, Ferguson, MO, USA), el cual genera un valor de CI. Posteriormente, se seleccionaron los valores de CI correspondientes a la fracción afectada por la dosis (Fa) referente a la IC₂₅ (Fa_{0,75}), IC₅₀ (Fa_{0,50}) e IC₇₅ (Fa_{0,25}) para la combinación de los fármacos. Este valor de CI puede ser >1 (indica antagonismo entre los fármacos), =1 (indica adición entre los fármacos) o <1 (indica sinergismo entre los fármacos).

3.11. Estudios “in silico”.

Se examinaron muestras de tumores de dos grupos de pacientes para determinar si la expresión de AURKA podría estar relacionada con la SG y la SLP, de los cuales tenemos información suficiente de todas las variables de interés: el estadio del tumor, la edad de la paciente y la expresión de ARNm de las AURKs.

El primer grupo está compuesto por 288 pacientes con CO con una media de edad de 58 años (entre 59 y 87 años), de los cuales 270 presentan un

estadio avanzado de la enfermedad, mientras que el segundo grupo está compuesto por 171 pacientes con CMTN con una media de edad de 53 años (entre 48 y 64 años), de los cuales 23 presentan un estadio avanzado.

Una vez seleccionamos las pacientes para el estudio, se llevó a cabo el análisis mediante el cálculo del *Hazard Ratio* (HR) a través de la regresión de riesgos proporcionales de Cox. Esta herramienta facilita la evaluación de la relación entre la expresión de determinados genes, la SG y la SLP en muestras de diferentes tipos tumorales. La base de datos utilizada para dicho estudio fue *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA).

Se evaluó el valor pronóstico de la expresión del ARNm de las AURKs en todas las pacientes de CO y CMTN. Se utilizó el valor correspondiente a la mediana para clasificar a las pacientes en grupos con expresión alta y baja. Posteriormente, se calcularon el HR con un intervalo de confianza del 95%, así como el valor p de rango logarítmico.

3.12. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante GraphPad Prism. La determinación de la IC₅₀ de los diferentes fármacos utilizados en el trabajo se realizó mediante una regresión no lineal a partir de la transformación X = log(X) (donde X es la concentración de fármaco) en la que se aplica la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{\log(IC50-X)*pendiente}}$$

Todos los datos fueron representados como la media ± la desviación estándar (DS). La comprobación de la normalidad se realizó mediante la prueba Shapiro-Wilks. La comparación de las medias se realizó mediante una prueba t-Student de dos vías para la distribución normal. Por otro lado, para comparar las IC₅₀ de un fármaco determinado en las diferentes líneas celulares se realizó una prueba F, cuya hipótesis nula es que el valor de IC₅₀ es el mismo en las dos líneas celulares comparadas.

Para analizar y comparar los valores obtenidos en el ensayo de apoptosis se realizó una prueba t-Student de dos vías. En él, la hipótesis nula determina que los valores de apoptosis son iguales entre las dos condiciones de tratamiento comparadas.

Para analizar y comparar los valores obtenidos en el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR se realizó una prueba t-Student de dos vías. En él, la hipótesis nula determina que los valores de expresión génica son iguales entre las dos condiciones comparadas.

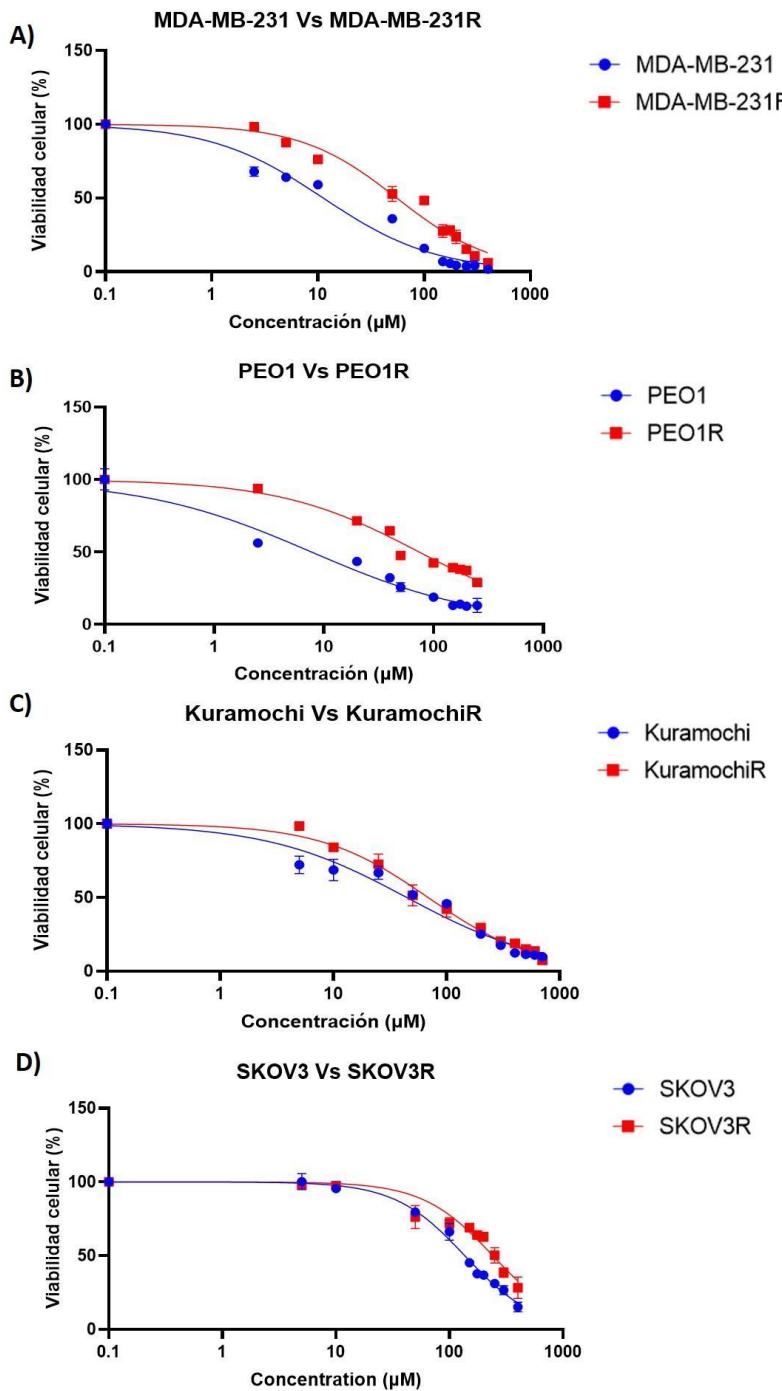
Para analizar y comparar los valores obtenidos en el análisis de expresión proteica procedentes de la cuantificación del Western Blot se realizó una prueba t-Student de dos vías. En él, la hipótesis nula determina que los valores de expresión proteica son iguales entre las dos condiciones comparadas.

El valor p que determina la significación estadística, y por lo tanto, rechazar la hipótesis nula, en todos los experimentos fue 0,05 (* valor de p <0,05, ** valor de p <0,01, *** valor de p <0,001, **** valor de p <0,0001). Todos los experimentos se realizaron por triplicado técnico y biológico.

4. RESULTADOS.

4.1. Generación de líneas celulares resistentes a olaparib.

Con el objetivo de estudiar el mecanismo de resistencia a olarib (OLA), se generaron cuatro líneas celulares con resistencia adquirida: MDA-MB-231R, PEO1R, KuramochiR y SKOV3R. En primer lugar, se evaluó la resistencia de estas líneas celulares mediante un ensayo MTT comparando la IC₅₀ para OLA de la línea celular resistente con la IC₅₀ de su línea celular parental (MDA-MB-231, PEO1, Kuramochi y SKOV3) (**Figura 11**).



Resultados

Figura 11: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de OLA en las líneas celulares: A) MDA-MB-231 vs MDA-MB-231R, B) PEO1 vs PEO1R, C) Kuramochi vs KuramochiR y D) SKOV3 vs SKOV3R.

Los resultados mostraron una mayor IC₅₀ en las líneas celulares resistentes a OLA (210 µM para MDA-MB-231R, 100 µM para PEO1R, 180 µM para KuramochiR y 250 µM para SKOV3R) en comparación a las líneas celulares parentales (100 µM para MDA-MB-231, 20 µM para PEO1, 100 µM para Kuramochi y 170 µM para SKOV3) de forma estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (**Tabla 8**), sugiriendo así que estas líneas celulares pueden ser utilizadas como modelos válidos para estudiar las resistencias a OLA.

Tabla 8: Valores de la IC₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a OLA y las líneas celulares parentales.

Líneas celulares	IC ₅₀ (µM)	valor p
MDA-MB-231	100	$p < 0.0001$
	210	
PEO1	20	$p < 0.0001$
	100	
Kuramochi	100	$p < 0.0001$
	180	
SKOV3	170	$p < 0.0001$
	250	

4.2. Generación de líneas celulares resistentes a carboplatino.

Del mismo modo, con el objetivo de estudiar el mecanismo de resistencia a carboplatino (CBP), utilizamos dos modelos celulares resistentes. Uno de ellos presenta una resistencia innata (PEO4) y el otro una resistencia adquirida “in vitro” (MDA-MB-231RCBP). Se comprobó la resistencia mediante un ensayo MTT comparando la IC₅₀ para CBP de la línea celular resistente con la IC₅₀ de su línea celular parental (PEO1 y MDA-MB-231) (Figura 12).

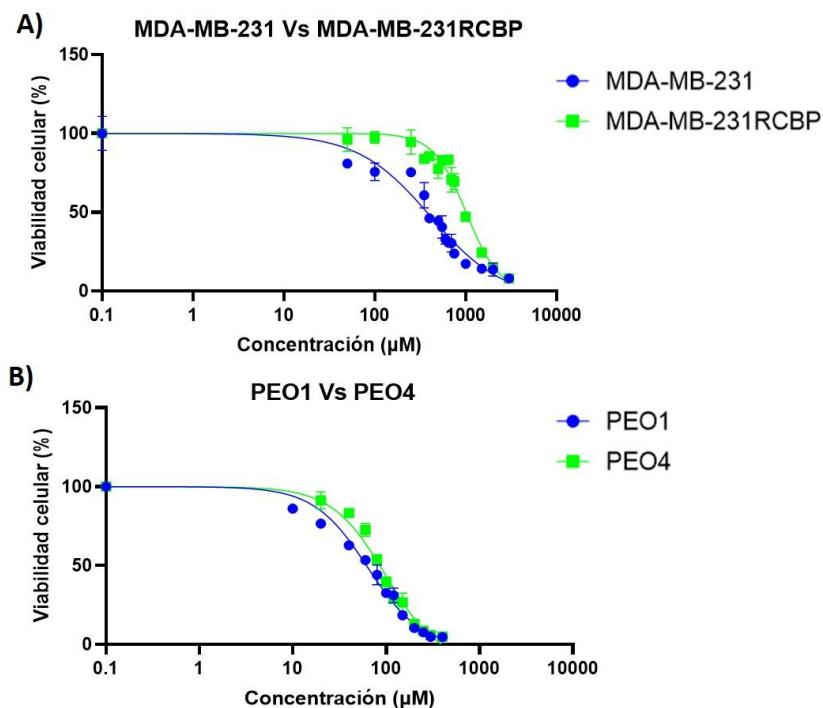


Figura 12: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con CBP entre las líneas celulares parentales y resistentes a CBP. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de CBP en las líneas celulares: A) MDA-MB-231 vs MDA-MB-231RCBP, B) PEO1 vs PEO4.

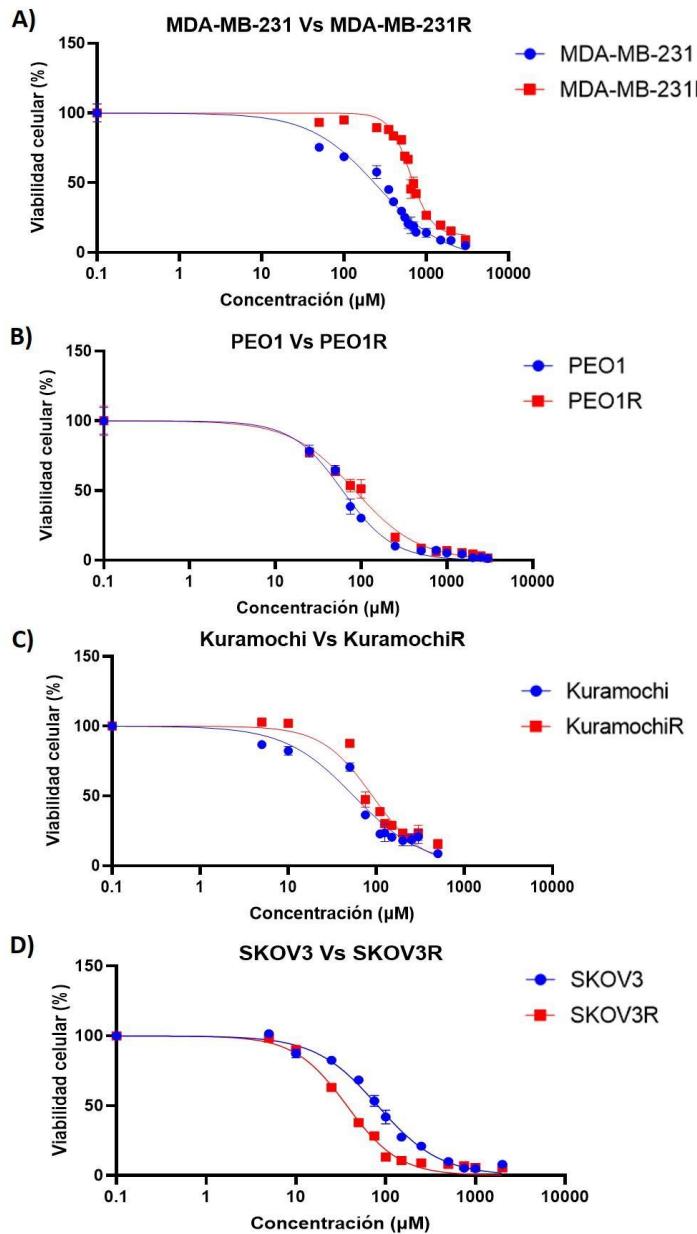
Concretamente, los resultados mostraron una IC₅₀ mayor en las líneas celulares resistentes a CBP (900 µM para MDA-MB-231RCBP y 100 para PEO4) en comparación a las líneas celulares parentales (400 µM para MDA-MB-231 y 60 µM para PEO1) de manera estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (**Tabla 9**), sugiriendo así que estas líneas celulares pueden ser utilizadas como modelos válidos para estudiar las resistencias a CBP.

Tabla 9: Valores de la IC₅₀ para CBP de las líneas celulares resistentes a CBP y las líneas celulares parentales.

Líneas celulares	IC ₅₀ (µM)	valor p
MDA-MB-231	400	$p < 0.0001$
	900	
PEO1	60	$p < 0.0001$
	100	

4.3. Resistencia cruzada entre olaparib y carboplatino en las líneas celulares resistentes.

Una vez determinamos que los modelos de líneas celulares resistentes parecen ser válidos para el estudio de las resistencias, nos planteamos si existe resistencia cruzada entre OLA y CBP en los modelos de los que disponemos. Para ello, realizamos en primer lugar un ensayo comparativo de viabilidad celular (MTT) entre las líneas celulares resistentes a OLA (MDA-MB-231R, PEO1R, KuramochiR y SKOV3R) y las líneas celulares parentales (MDA-MB-231, PEO1, Kuramochi y SKOV3) tras el tratamiento con CBP (**Figura 13**).



Resultados

Figura 13: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con CBP entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de CBP en las líneas celulares: A) MDA-MB-231 vs MDA-MB-231R, B) PEO1 vs PEO1R, C) Kuramochi vs KuramochiR y D) SKOV3 vs SKOV3R.

Los resultados mostraron que la IC₅₀ de CBP es mayor de forma estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en tres de las cuatro líneas celulares resistentes a OLA (650 μM para MDA-MB-231R, 80 μM para PEO1R y 100 μM para KuramochiR) en comparación a las líneas celulares parentales (400 μM para MDA-MB-231, 60 μM para PEO1 y 70 μM para Kuramochi). Sin embargo, esta IC₅₀ resultó ser estadísticamente menor de forma significativa ($p < 0.0001$) para la línea celular SKOV3R (50 μM) al compararla con su línea parental SKOV3 ($80 \mu\text{M}$) (**Tabla 10**).

Tabla 10: Valores de la IC₅₀ para CBP de las líneas celulares resistentes a OLA y las líneas celulares parentales.

Líneas celulares	IC ₅₀ (μ M)	valor p
MDA-MB-231	400	
MDA-MB-231R	650	p < 0.0001
PEO1	60	
PEO1R	80	p < 0.0001
Kuramochi	70	
KuramochiR	100	p < 0.0001
SKOV3	80	
SKOV3R	50	p < 0.0001

Estos resultados sugieren que existe una resistencia cruzada a CBP en tres de las líneas celulares resistentes a OLA (MDA-MB-231R, PEO1R y KuramochiR), no siendo así en SKOV3R.

De igual forma, se realizó un ensayo comparativo de viabilidad celular (MTT) entre las líneas celulares parentales (MDA-MB-231 y PEO1) y las líneas celulares resistentes a CBP (MDA-MB-231RCBP y PEO4) tras el tratamiento con OLA (**Figura 14**).

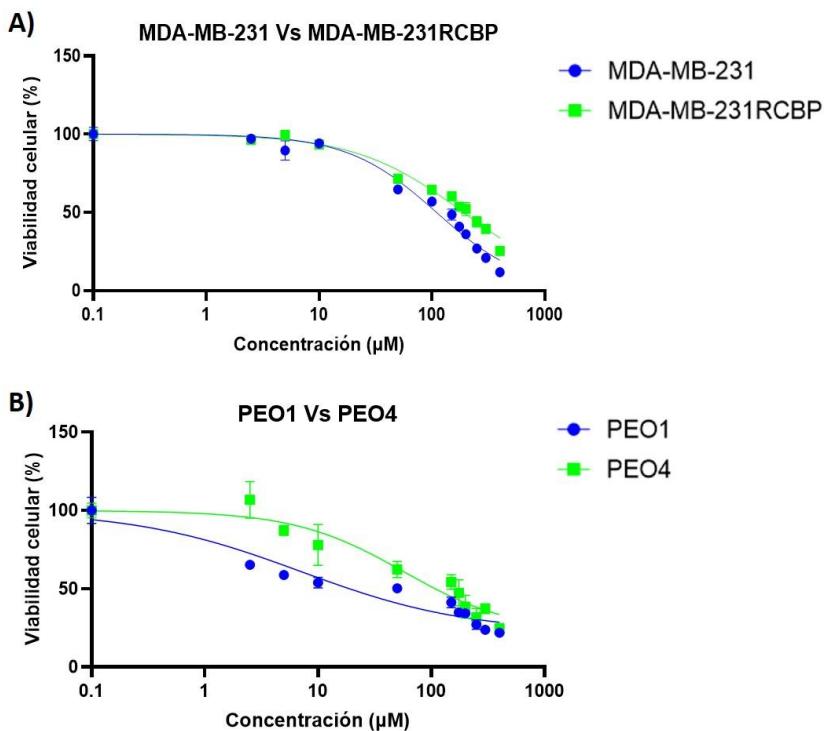


Figura 14: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares parentales y resistentes a CBP. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de OLA en las líneas celulares: A) MDA-MB-231 vs MDA-MB-231RCBP y B) PEO1 vs PEO4.

Los resultados obtenidos mostraron que la IC_{50} de OLA es estadísticamente superior de forma significativa ($p < 0.0001$) en ambas líneas celulares resistentes a CBP (190 μM para MDA-MB-231RCBP y 120 μM para PEO4) en comparación a las líneas celulares parentales (100 μM para MDA-MB-231 y 20 μM para PEO1) (**Tabla 11**).

Tabla 11: Valores de la IC₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a CBP y las líneas celulares parentales.

Líneas celulares	IC ₅₀ (μ M)	valor p
MDA-MB-231	100	p < 0.0001
	190	
PEO1	20	p < 0.0001
	120	

Estos resultados sugieren que existe una resistencia cruzada a OLA en todas las líneas celulares resistentes a CBP (MDA-MB-231RCBP y PEO4).

4.4. Secuenciación de las líneas celulares sensibles y resistentes a olaparib y carboplatino.

Una vez hemos generado las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, nos planteamos si la generación de la resistencia podría estar relacionada con cambios en las mutaciones en los genes *TP53*, *BRCA1* y *BRCA2* con respecto a las líneas celulares parentales. Los resultados de la secuenciación de las líneas celulares de COAG no mostraron diferencias en las mutaciones para estos genes entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA. Sin embargo, la línea celular con resistencia innata a CBP (PEO4) presentó una reversión de la mutación en *BRCA2* cuando la comparamos con la línea celular parental (PEO1) (**Tabla 12**).

Tabla 12: Resumen de las mutaciones identificadas en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53* en las líneas celulares parentales y resistentes de COAG.

Líneas celulares	Mutación en <i>BRCA1</i>	Mutación en <i>BRCA2</i>	Mutación en <i>TP53</i>
PEO1	-	p. Y1655* c.4964A>T (59%)	p. G244D c.731G>A (100%)
PEO1R	-	p. Y1655* c.4964A>T (67%)	p. G244D c.731G>A (100%)
PEO4	-	-	p. G244D c.731G>A (100%)
Kuramochi	-	p. R2318* c.6952C>T (64%)	p. D281Y c.841G>T (100%)
KuramochiR	-	p. R2318* c.6952C>T (66%)	p. D281Y c.841G>T (100%)
SKOV3	-	-	p. S90Pfs*33 c.267del (100%)
SKOV3R	-	-	p. S90Pfs*33 c.267del (100%)

Por otro lado, los resultados de la secuenciación de las líneas celulares de CMTN estudiadas tampoco mostraron diferencias en las mutaciones para los genes analizados cuando comparamos la línea celular parental con las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, respectivamente (**Tabla 13**).

Tabla 13: Resumen de las mutaciones identificadas en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53* en las líneas celulares parentales y resistentes de CMTN.

Líneas celulares	Mutación en <i>BRCA1</i>	Mutación en <i>BRCA2</i>	Mutación en <i>TP53</i>
MDA-MB-231	-	-	p. R280K c.839G>A (100%)
MDA-MB-231R	-	-	p. R280K c.839G>A (100%)
MDA-MB-231RCBP	-	-	p. R280K c.839G>A (100%)

Estos resultados sugieren que en ninguno de los modelos celulares resistentes a OLA generados hemos apreciado el mecanismo de adquisición de resistencia a iPARP producido por la reversión de la mutación de *BRCA1/2*.

4.5. Expresión de aurora quinasa A en las líneas celulares parentales y resistentes a olaparib y carboplatino.

Dado que diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la AURKA en los procesos de carcinogénesis en el CMTN y COAG (Pérez Fidalgo et al., 2009), nos planteamos el posible papel de esta quinasa en los mecanismos de adquisición de resistencia al tratamiento con OLA o CBP. De esta manera, comparamos la expresión de AURKA entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína.

4.5.1. Expresión de aurora quinasa A a nivel de ARNm.

Para determinar los niveles de expresión génica de AURKA, realizamos una RT-qPCR en la que comparamos la expresión a nivel de ARNm entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente.

Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa de la expresión de AURKA en las líneas celulares de COAG resistentes a OLA (PEO1R y SKOV3R) en comparación con las líneas celulares parentales (PEO1 y SKOV3) ($p < 0,0001$ para PEO1R y SKOV3R, respectivamente). Sin embargo, no se observó lo mismo en la línea celular KuramochiR resistente a OLA en comparación con la línea celular parental Kuramochi. Por otro lado, se observó una sobreexpresión estadísticamente significativa de AURKA en la línea celular de CMTN MDA-MB-231R resistente a OLA en comparación con la línea celular parental MDA-MB-231 ($p = 0,0006$) (**Figura 15**).

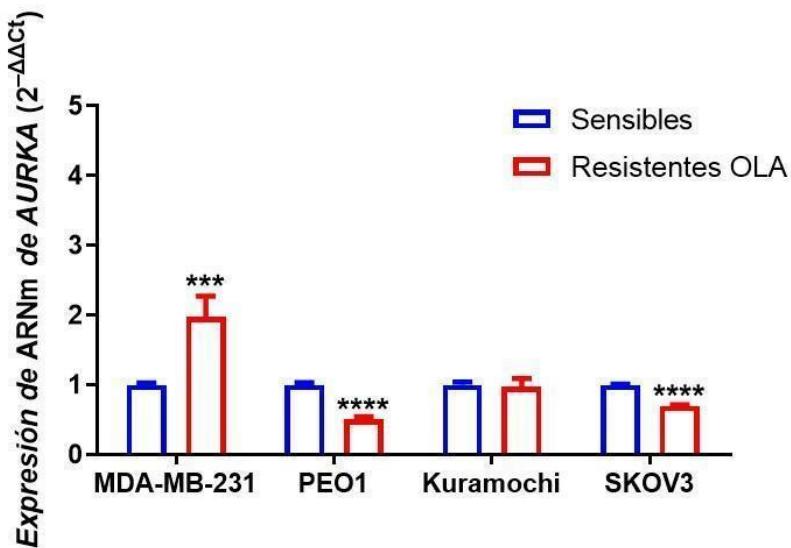


Figura 15: Análisis de la expresión de ARNm de *AURKA* entre las líneas celulares de CMTN y COAG parentales y resistentes a OLA. La expresión de *AURKA* fue analizada mediante RT-qPCR en las líneas celulares parentales (MDA-MB-231, PEO1, Kuramochi y SKOV3) y sus variantes resistentes a OLA (MDA-MB-231R, PEO1R, KuramochiR y SKOV3R). Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en su línea parental y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba *T-Student* para el análisis estadístico. *** p < 0.001 y **** p < 0.0001.

Al comparar la expresión de *AURKA* entre la línea de COAG resistente a CBP (PEO4) con la línea celular parental (PEO1), no se observaron cambios de expresión estadísticamente significativos. Sin embargo, la línea celular de CMTN resistente a CBP (MDA-MB-231RCBP) mostró una sobreexpresión estadísticamente significativa de *AURKA* en comparación con la línea celular parental (MDA-MB-231) ($p = 0,0006$) (Figura 16).

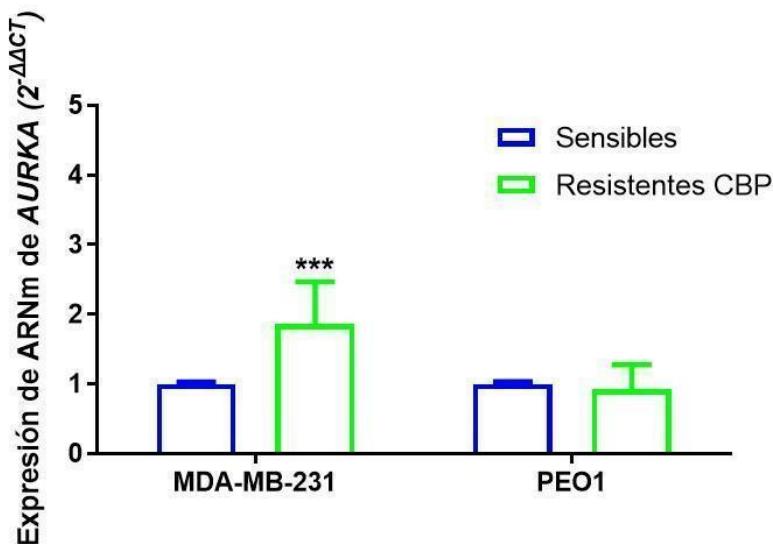


Figura 16: Análisis de la expresión de ARNm de AURKA entre las líneas celulares de CMTN y COAG parentales y resistentes a CBP. La expresión de AURKA fue analizada mediante RT-qPCR en las líneas celulares parentales (MDA-MB-231 y PEO1) y sus variantes resistentes a CBP (MDA-MB-231RCBP y PEO4). Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en su línea parental y se representan como la media \pm DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. *** $p < 0.001$.

4.5.2. Expresión de aurora quinasa A a nivel de proteína.

Por otro lado, se determinaron los niveles de expresión proteica de AURKA mediante Western Blot en el que comparamos las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente.

Los resultados mostraron una menor expresión de AURKA en todas las líneas celulares de COAG resistentes a OLA en comparación a las líneas celulares parentales, siendo estadísticamente significativa cuando comparamos SKOV3 y SKOV3R ($p = 0.0143$). No obstante, la línea celular de CMTN resistente a OLA (MDA-MB-231R) no mostró cambios en la

expresión de AURKA cuando la comparamos con la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Figura 17**).

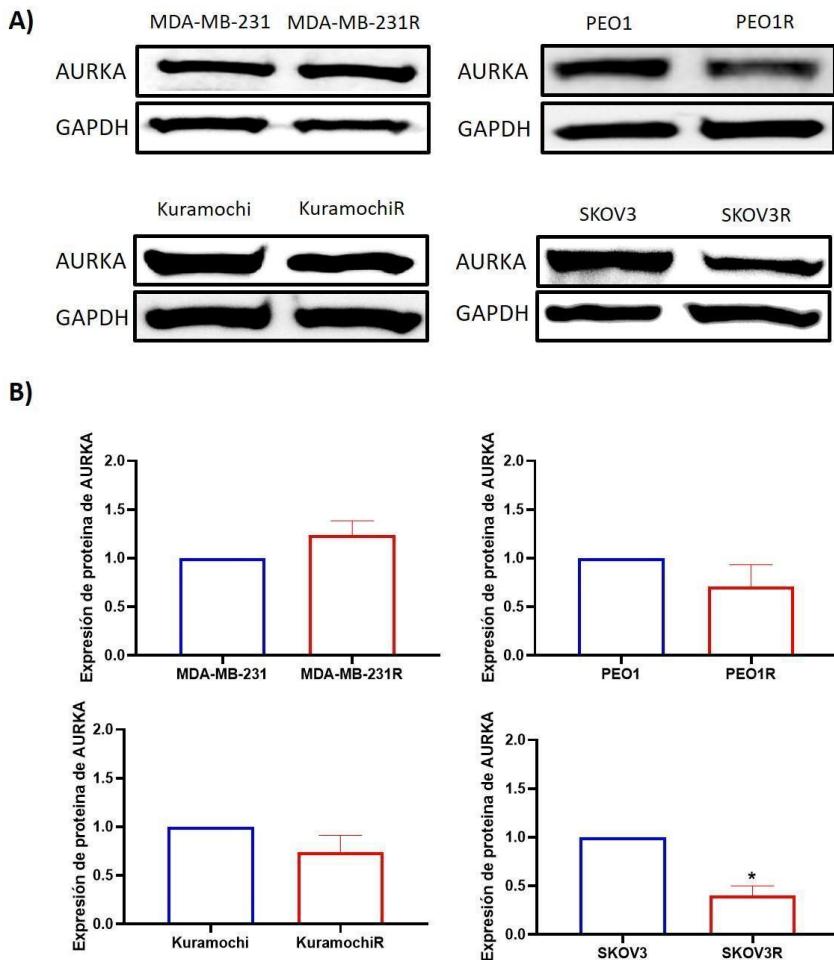


Figura 17: Análisis de la expresión proteica de AURKA entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA. A) Análisis de la expresión proteica de AURKA mediante Western Blot. Se utilizó la proteína GAPDH como control endógeno de expresión. B) Cuantificación de la intensidad relativa de las bandas de AURKA. Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en su línea parental y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05.

Por otro lado, al comparar la expresión proteica de AURKA entre las líneas celulares resistentes a CBP y las líneas celulares parentales se observó una sobreexpresión en la línea de CMTN (MDA-MB-231RCBP) y en la línea de COAG (PEO4), siendo estadísticamente significativa cuando comparamos PEO1 con PEO4 ($p = 0.0327$) (Figura 18).

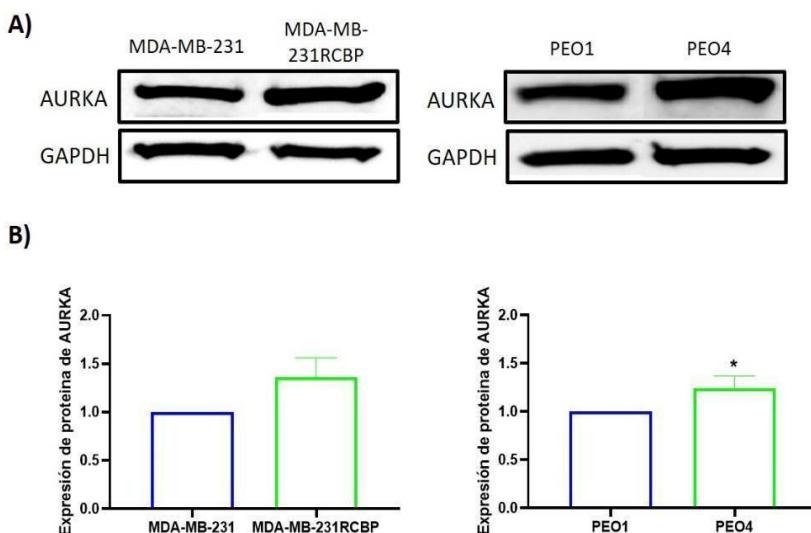


Figura 18: Análisis de la expresión proteica de AURKA entre las líneas celulares parentales y resistentes a CBP. A) Análisis de la expresión proteica de AURKA mediante Western Blot. Se utilizó la proteína GAPDH como control endógeno de expresión. B) Cuantificación de la intensidad relativa de las bandas de AURKA. Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en su línea parental y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05.

expresión están normalizados en base a la expresión en su línea parental y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05.

4.6. Inhibición de la aurora quinasa A para el tratamiento de resistencias a olaparib y carboplatino.

Continuando con nuestra hipótesis de que la AURKA podría estar relacionada con el mecanismo de adquisición de resistencia a OLA y CBP en nuestras líneas celulares, nos planteamos si la inhibición de la misma podría ser capaz de revertir la resistencia a dichos tratamientos. Para ello inhibimos la AURKA siguiendo 2 enfoques: inhibición farmacológica e inhibición genética.

4.6.1. Inhibición farmacológica.

Se utilizó alisertib (ALI) para la inhibición farmacológica de la AURKA. Para determinar si el tratamiento con ALI afecta de igual forma a nuestras líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente, se realizó un ensayo comparativo de viabilidad celular (MTT) entre las líneas celulares resistentes a OLA (MDA-MB-231R, PEO1R, KuramochiR y SKOV3R), las líneas celulares resistentes a CBP (MDA-MB-231RCBP y PEO4) y las líneas celulares parentales (MDA-MB-231, PEO1, Kuramochi y SKOV3) tras el tratamiento con ALI (**Figura 19**).

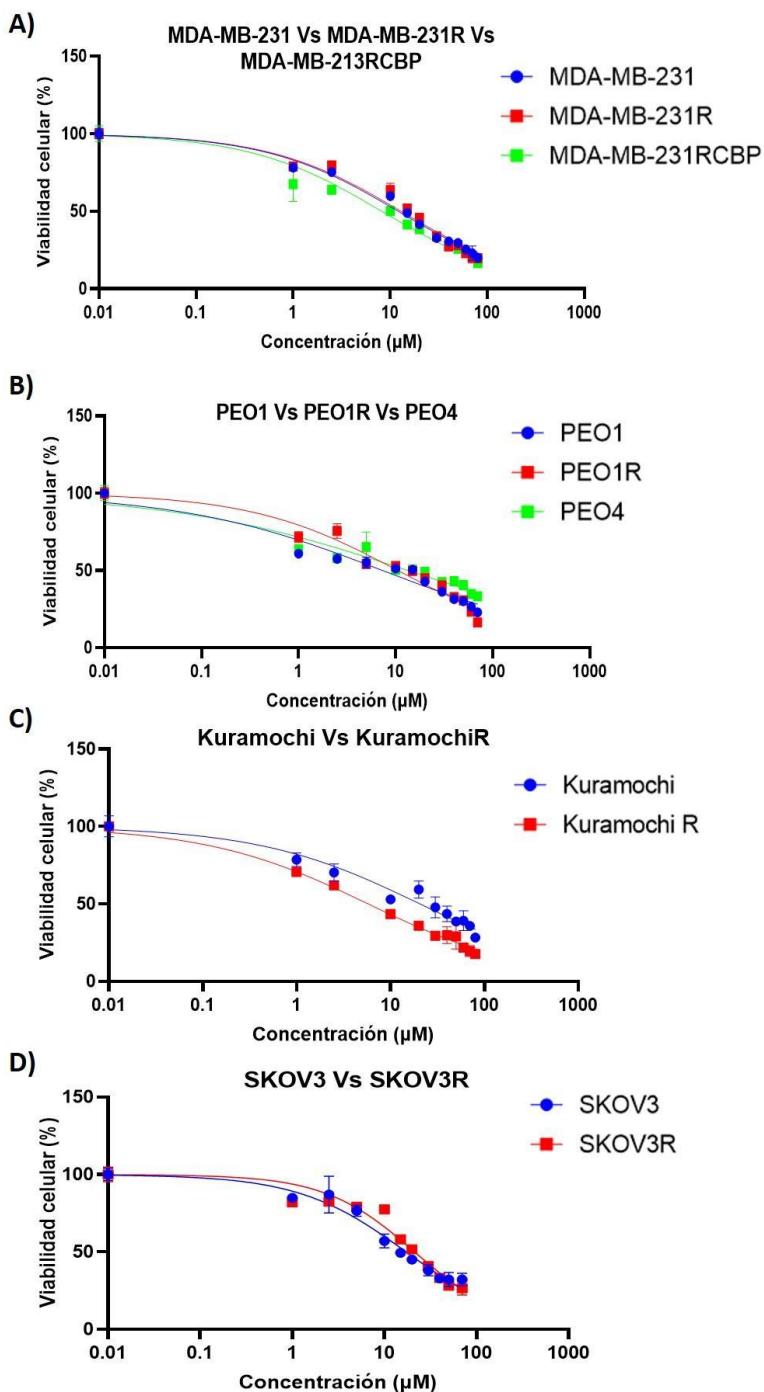


Figura 19: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con ALI entre las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de ALI en las líneas celulares: A) MDA-MB-231 vs MDA-MB-231R vs MDA-MB-231RCBP y B) PEO1 vs PEO1R vs PEO4, C) Kuramochi vs KuramochiR y D) SKOV3 vs SKOV3R.

Los resultados obtenidos muestran que la IC₅₀ de ALI varía en función de las líneas celulares que estemos comparando. En las líneas celulares de COAG resistentes a OLA, la IC₅₀ fue superior de forma estadísticamente significativa en SKOV3R ($p = 0,0193$) en comparación a la línea celular parental (SKOV3), mientras que en KuramochiR fue inferior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) al comprarla con la línea celular parental (Kuramochi), no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la IC₅₀ para PEO1R con su línea celular parental (PEO1). En la línea de CMTN resistente a OLA (MDA-MB-231R) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación a la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Tabla 14**).

Por otro lado, en las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a CBP, se observó un efecto contrario al comparar ambas enfermedades. En COAG la IC₅₀ fue superior de forma estadísticamente significativa en PEO4 ($p = 0,0026$) en comparación a la línea celular parental (PEO1), mientras que en CMTN la IC₅₀ fue inferior de forma estadísticamente significativa en MDA-MB-231RCBP ($p < 0,0001$) al comprarla con la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Tabla 14**).

Tabla 14: Valores de la IC₅₀ para ALI de las líneas celulares parentales y las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, respectivamente.

Líneas celulares	IC ₅₀ (μ M)	valor p
MDA-MB-231	12	
MDA-MB-231R	12	p < 0.0001
MDA-MB-231RCBP	8	
PEO1	8	
PEO1R	10	p = 0.0026
PEO4	15	
Kuramochi	20	
KuramochiR	6	p < 0.0001
SKOV3	17	
SKOV3R	20	p = 0.0193

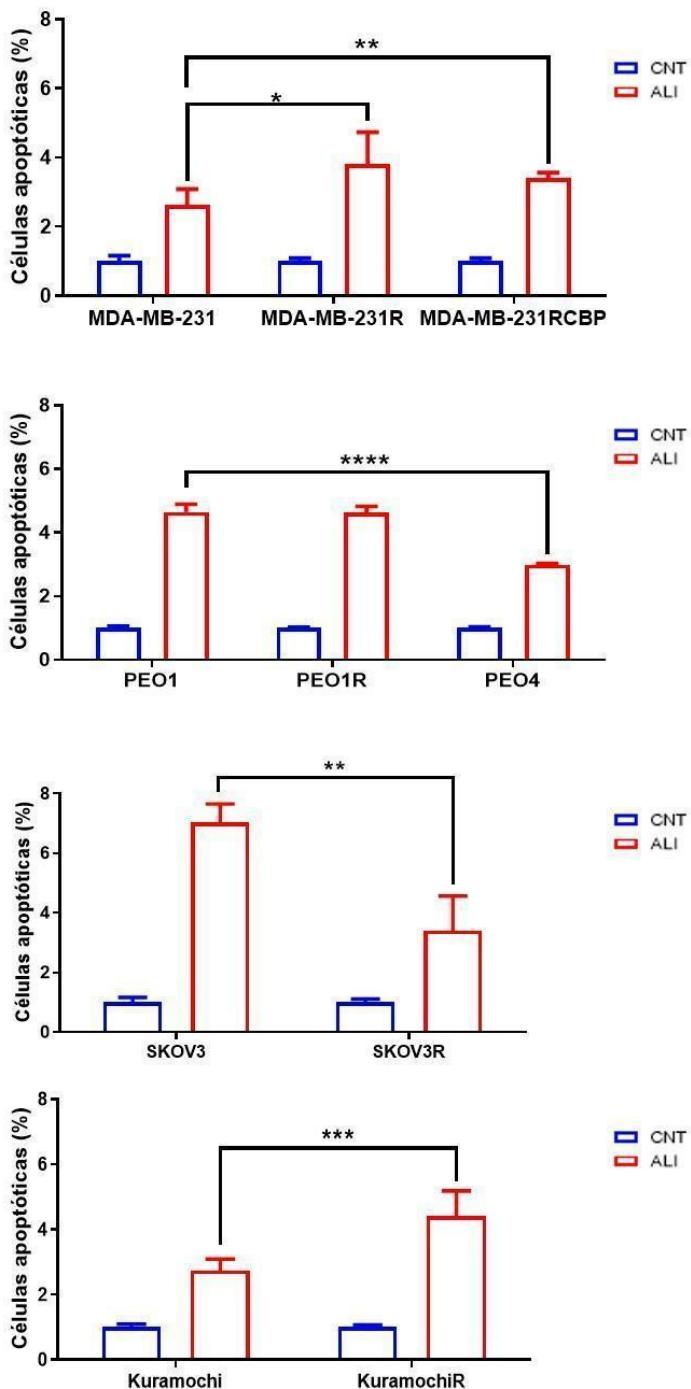
A la vista de los resultados obtenidos en de determinación de la IC₅₀ para ALI en nuestras líneas celulares, se realizó un ensayo mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células apoptóticas producidas por el tratamiento con la IC₅₀ para ALI de las líneas celulares parentales, tanto en las líneas celulares sensibles como resistentes a OLA y CBP, respectivamente.

En las líneas celulares de COAG resistentes a OLA, los resultados mostraron una tendencia similar a la mostrada anteriormente. El porcentaje de células apoptóticas fue inferior de forma estadísticamente significativa en SKOV3R (p = 0,022) en comparación a la línea celular parental (SKOV3), mientras que en KuramochiR fue superior de forma

Resultados

estadísticamente significativa ($p = 0,0008$) al comprarla con la línea celular parental (Kuramochi), no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de células apoptóticas en PEO1R con su línea celular parental (PEO1). En la línea de CMTN resistente a OLA (MDA-MB-231R), a diferencia del ensayo anterior, se observó que el porcentaje de células apoptóticas fue superior de forma estadísticamente significativa ($p = 0,0178$) en comparación a la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Figura 20**).

En las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a CBP, los resultados mostraron una tendencia similar a la mostrada anteriormente. En COAG el porcentaje de células apoptóticas fue inferior de forma estadísticamente significativa en PEO4 ($p < 0,0001$) en comparación a la línea celular parental (PEO1), mientras que en CMTN fue superior de forma estadísticamente significativa en MDA-MB-231RCBP ($p = 0,0028$) al compararla con la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Figura 20**).



Resultados

Figura 20: Porcentaje de células apoptóticas en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Determinación del porcentaje de células apoptóticas antes (CNT) y después (ALI) del tratamiento con la IC₅₀ de ALI correspondiente a las líneas celulares parentales durante 72 horas, en todas las líneas celulares utilizadas. Todos los porcentajes de células apoptóticas están normalizados en base al CNT y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** p < 0.0001.

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, se realizó un análisis de la expresión proteica mediante Western Blot del marcador del daño en el ADN, γ-H2AX, tras la exposición de todas las líneas celulares utilizadas a la IC₅₀ para ALI de las líneas celulares parentales. Los resultados obtenidos mostraron una tendencia similar a la observada en los experimentos anteriores.

En las líneas celulares de COAG resistentes a OLA, el incremento de la expresión de γ-H2AX en KuramochiR cuando fueron tratadas con ALI fue mayor en comparación al observado en la línea celular parental (Kuramochi), mientras que en la línea SKOV3R fue menor en comparación al observado en la línea celular parental (SKOV3), de nuevo no se observaron diferencias entre la línea celular parental PEO1 y su variable resistente a OLA (PEO1R). En la línea de CMTN resistente a OLA (MDA-MB-231R), se observó una tendencia similar al experimento de citometría de flujo, ya que el incremento de la expresión de γ-H2AX fue mayor en comparación al observado en la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Figura 21**).

En la línea celular de COAG resistente a CBP (PEO4) el resultado coincidió con el observado en el ensayo de apoptosis, ya que se observó una disminución del incremento de la expresión de γ-H2AX cuando se

comparó con el observado en su variable parental (PEO1). Sin embargo, el resultado que se obtuvo en la línea de CMTN resistente a CBP (MDA-MB-231RCBP) no coincidió con el observado en los experimentos anteriores, ya que el incremento en la expresión de γ -H2AX fue menor que el que se observó en la línea celular parental (MDA-MB-231) (**Figura 21**).

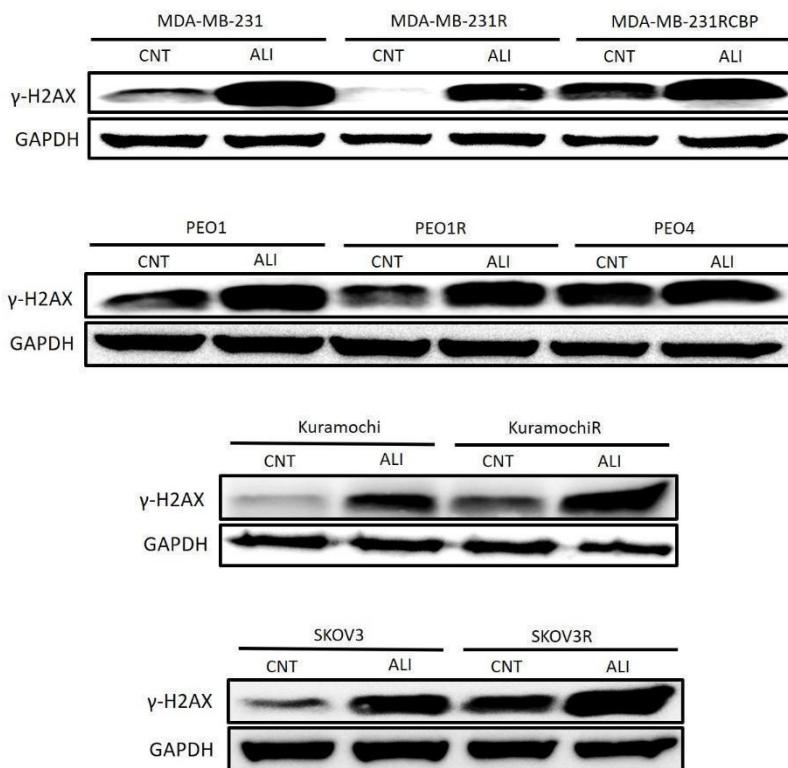


Figura 21: Análisis de la expresión proteica de γ -H2AX tras el tratamiento con ALI en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Análisis mediante Western Blot de la expresión proteica de γ -H2AX antes (CNT) y después (ALI) del tratamiento con la IC_{50} de ALI correspondiente a las líneas celulares parentales durante 72 horas, en todas las líneas celulares utilizadas. Se utilizó la proteína GAPDH como control endógeno de expresión.

En conclusión, la inhibición farmacológica de AURKA con ALI no demostró una mayor apoptosis o un mayor daño en el ADN en las líneas celulares resistentes a OLA y CBP en comparación a las líneas celulares sensibles, excepto en la línea celular KuramochiR, en la cual ALI mostró una IC₅₀ inferior, con un mayor porcentaje de apoptosis y un claro incremento en el marcador del daño en el ADN, γ-H2AX. Estos resultados sugieren que algunas líneas celulares resistentes a OLA si podrían ser más sensibles a alisertib.

4.6.2. Inhibición mediante silenciamiento de ARNm.

Para verificar los datos proporcionados anteriormente, se inhibió la AURKA mediante silenciamiento génico a través de ARNpi en todas las líneas celulares de COAG y CMTN parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Tras la correspondiente comprobación del silenciamiento tanto a nivel de proteína (**Figura S3**) como a nivel de ARNm (**Figura S4**), se realizó un ensayo comparativo de viabilidad celular (MTT) en el que comparamos la IC₅₀ para OLA en todas las líneas celulares parentales y resistentes, con y sin silenciamiento de AURKA (**Figura 22**).

En primer lugar, los resultados mostraron que el silenciamiento de AURKA en las líneas celulares parentales de COAG (PEO1 Si, Kuramochi Si y SKOV3 Si) no produce una disminución estadísticamente significativa de la IC₅₀ de OLA en comparación con la línea celular parental no silenciada (PEO1 Sc, Kuramochi Sc y SKOV3 Sc). Sin embargo, se observó una disminución estadísticamente significativa de la IC₅₀ de OLA en la línea de CMTN parental silenciada (77, 35 μM MDA-MB-231 Si) en comparación con la

Línea celular parental no silenciada ($112,70 \mu\text{M}$ para MDA-MB-231 Sc) ($p < 0.0001$) (**Tabla 15**).

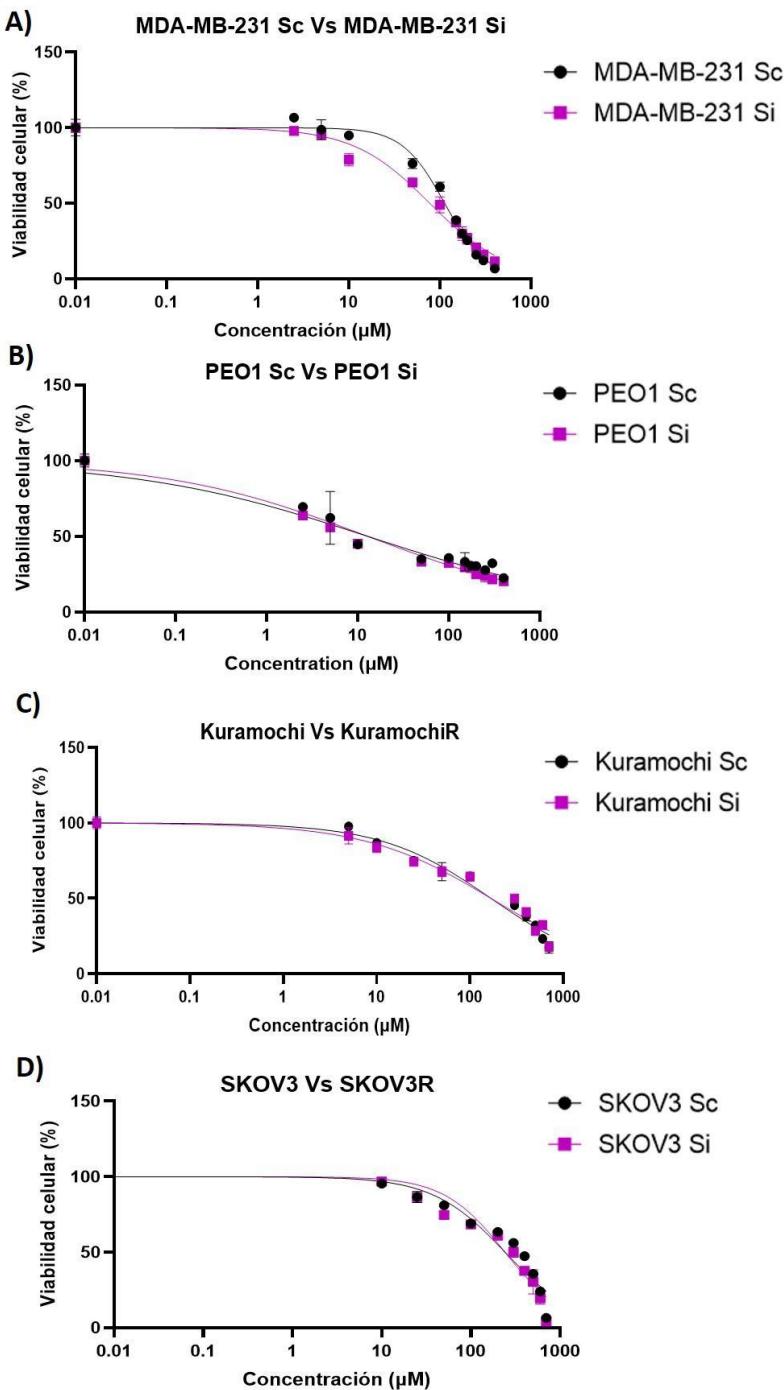


Figura 22: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares parentales tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc). Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de OLA en las líneas celulares parentales: A) MDA-MB-231 Sc vs MDA-MB-231 Si, B) PEO1 Sc vs PEO1 Si, C) Kuramochi Sc vs Kuramochi Si y D) SKOV3 Sc vs SKOV3 Si.

Tabla 15: Valores de la IC₅₀ para OLA de las líneas celulares parentales tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc).

Líneas celulares	IC ₅₀ (μ M)	valor p
MDA-MB-231 Sc	112,70	$p < 0.0001$
MDA-MB-231 Si	77,35	
PEO1 Sc	15,81	$p = 0.0663$
PEO1 Si	11,81	
Kuramochi Sc	171,40	$p = 0.7379$
Kuramochi Si	165,30	
SKOV3 Sc	266	$p = 0.0580$
SKOV3 Si	213	

Por otro lado, al realizar el mismo experimento en las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a OLA, se observó que en todas las líneas celulares ensayadas se produce una disminución estadísticamente significativa de la IC₅₀ de OLA tras silenciar AURKA (**Figura 23**). De esta manera, la IC₅₀ para OLA en las líneas celulares resistentes a OLA tras el silenciamiento de AURKA (82,80 μ M para MDA-MB-231R Si, 29,3 μ M para PEO1R Si, 130,2 μ M para KuramochiR Si y 260,3 μ M para SKOV3R Si) fue menor que en las no silenciadas (196,2 μ M para MDA-MB-231R Sc, 139

Resultados

μM para PEO1R Sc, 268,4 μM para KuramochiR Sc y 332,3 μM para SKOV3R Sc) de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$ y $p = 0.0002$, respectivamente) (**Tabla 16**).

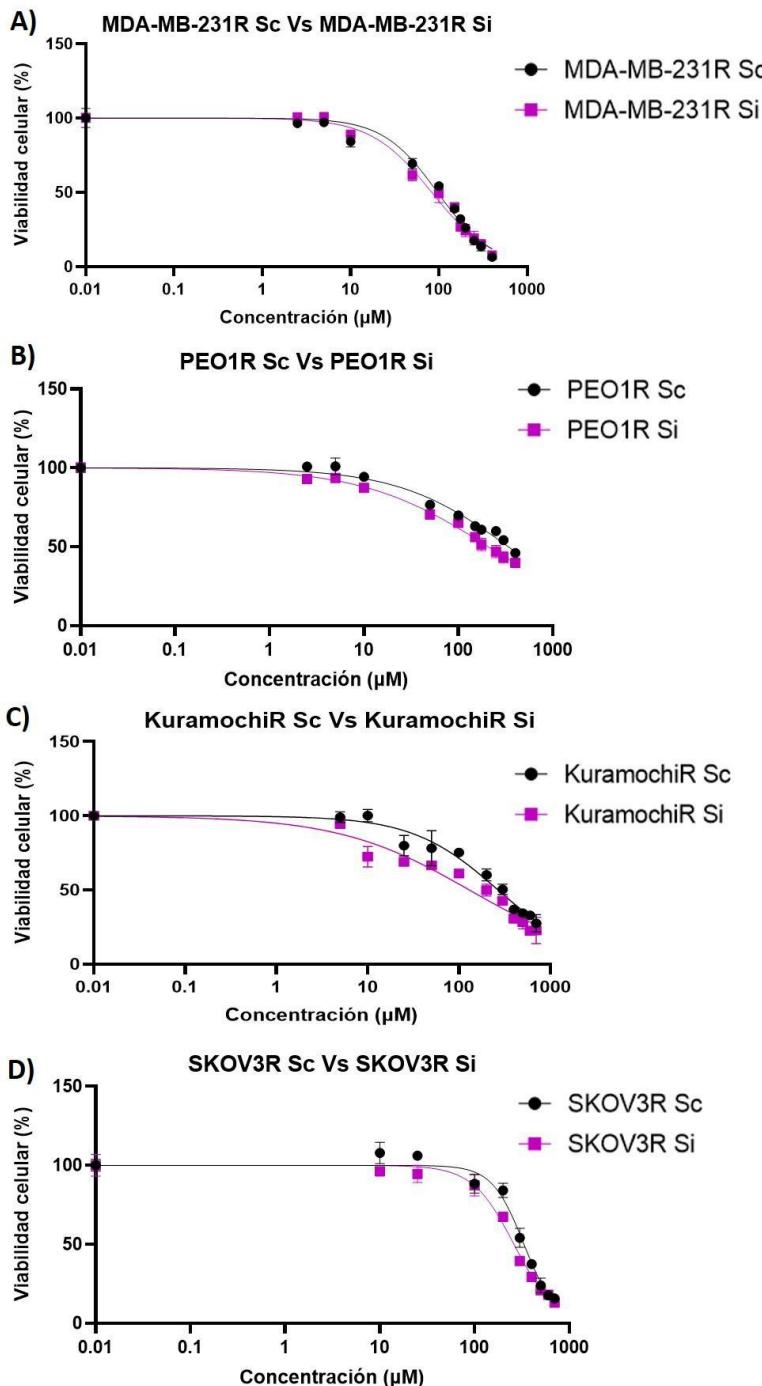


Figura 23: Curvas de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre las líneas celulares resistentes a OLA tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc). Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de OLA en las líneas celulares resistentes a OLA: A) MDA-MB-231R Sc vs MDA-MB-231R Si, B) PEO1R Sc vs PEO1R Si, C) KuramochiR Sc vs KuramochiR Si y D) SKOV3R Sc vs SKOV3R Si.

Tabla 16: Valores de la IC₅₀ para OLA de las líneas celulares resistentes a OLA tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc).

Líneas celulares	IC ₅₀ (μ M)	valor p
MDA-MB-231R Sc	196,28	$p < 0.0001$
MDA-MB-231R Si	82,80	
PEO1R Sc	139	$p < 0.0001$
PEO1R Si	29,30	
KuramochiR Sc	268,40	$p < 0.0001$
KuramochiR Si	130,20	
SKOV3R Sc	332,30	$p = 0.0002$
SKOV3R Si	260,30	

Finalmente, se realizó el mismo experimento en las líneas celulares de CMTN y COAG resistentes a CBP (**Figura 24**). Se observó una disminución estadísticamente significativa de la IC₅₀ de OLA en la línea celular de CMTN silenciada (139,5 μ M para MDA-MB-231RCBP Si) en comparación con la no silenciada (280 μ M para MDA-MB-231RCBP Sc) ($p < 0.0001$). En el caso de PEO4, no fuimos capaces de silenciar AURKA (**Tabla 17**).

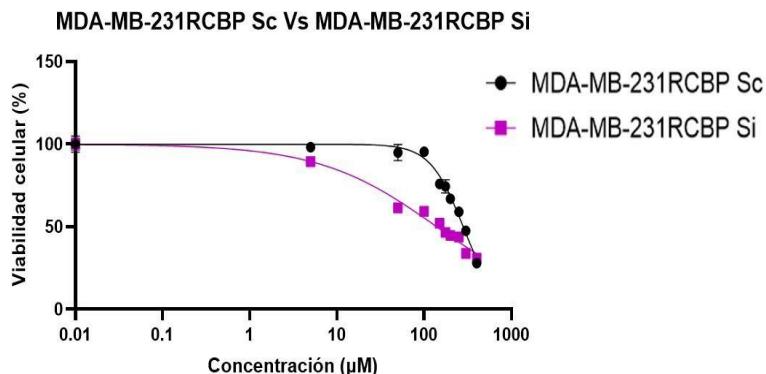


Figura 24: Curva de viabilidad celular tras el tratamiento con OLA entre la línea celular de CMTN resistentes a CBP tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc). Ensayo de viabilidad celular mediante MTT realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de OLA en MDA-MB-231RCBP Sc vs MDA-MB-231R Si.

Tabla 17: Valores de la IC_{50} para OLA de las líneas celulares resistentes a CBP tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc).

Líneas celulares	IC_{50} (μM)	valor p
MDA-MB-231RCBP Sc	280	
MDA-MB-231RCBP Si	139,5	$p < 0.0001$

En resumen, estos resultados confirman que el silenciamiento de AURKA con ARNpi reduce las IC_{50} de OLA en todas las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, mientras que en las líneas celulares sensibles este efecto no se aprecia. Esto confirma la hipótesis de que el bloqueo de AURKA podría ser una excelente estrategia para revertir la resistencia a OLA y CBP en nuestros modelos celulares.

4.7. Combinación de olaparib con alisertib para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario de alto grado sensible y resistente a olaparib y carboplatino.

Dado que el tratamiento con ALI ha demostrado tener un efecto sinérgico cuando se utiliza en combinación con otros iPARP para el tratamiento del COAG (Do et al., 2017), nos plateamos si la combinación de ALI junto con OLA podría ser efectiva en las líneas celulares de COAG y CMTN tanto sensibles como resistentes a OLA y CBP.

Para ello, se calculó el CI entre OLA y ALI mediante el método Chou-Talalay, en todas nuestras líneas celulares. Los resultados mostraron que en todas las líneas celulares ensayadas existe sinergismo entre OLA y ALI, ya que el valor del CI se mantiene por debajo de 1 en la mayoría de las concentraciones ensayadas (**Figura 25**)

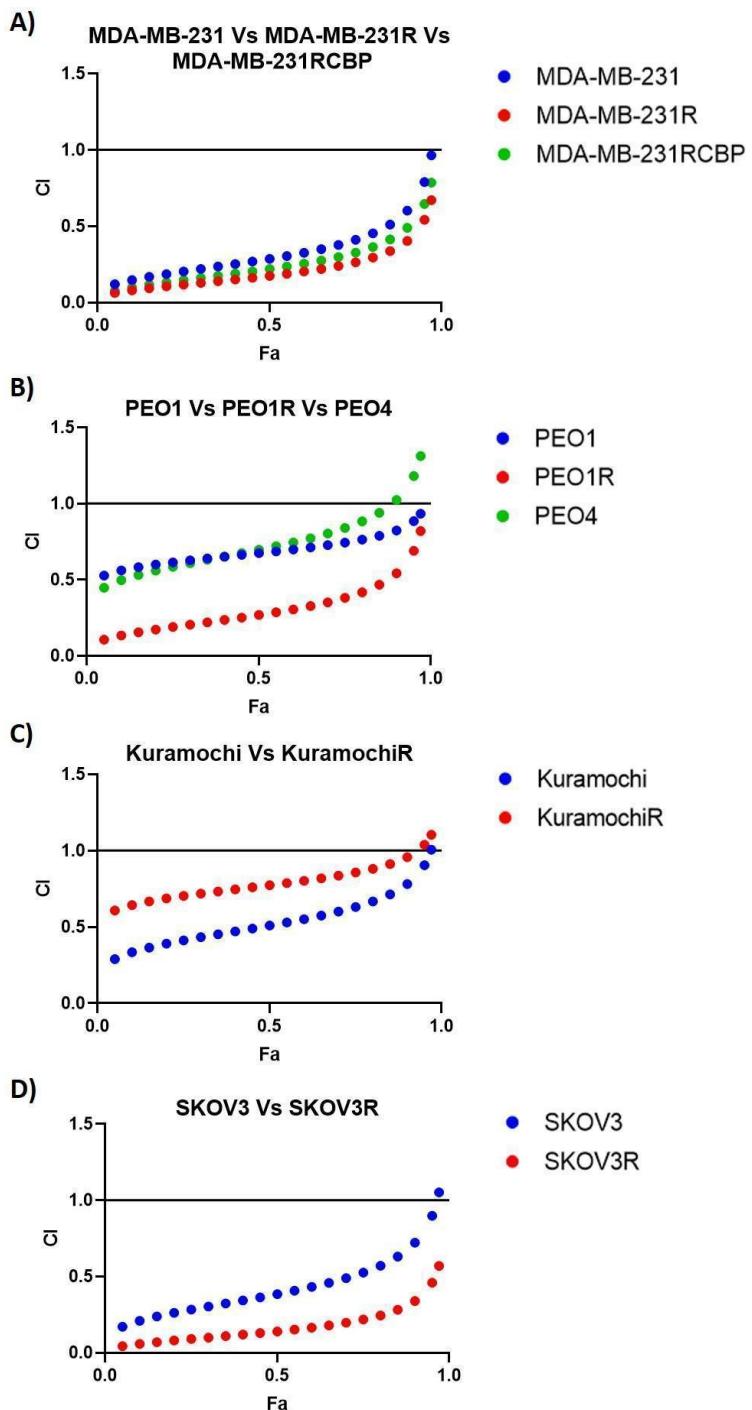


Figura 25: Valores del CI entre OLA y ALI a diferentes concentraciones de los fármacos, en todas las líneas celulares. Estudio del grado de sinergismo mediante el cálculo del CI entre OLA y ALI realizado tras 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de ambos fármacos en todas las líneas celulares de COAG y CMTN: A) MDA-MB-231 vs MDA-MB-231R vs MDA-MB-231RCBP y B) PEO1 vs PEO1R vs PEO4, C) Kuramochi vs KuramochiR y D) SKOV3 vs SKOV3R.

Los valores de CI más utilizados para la verificación del sinergismo entre dos fármacos son los correspondientes a la $F_{a,0,25}$, $F_{a,0,50}$ y $F_{a,0,75}$, con especial interés en $F_{a,0,50}$, ya que se corresponde con la IC_{50} para los fármacos utilizados. Se observó que este valor fue inferior a 1 en las líneas celulares parentales (CI = 0,28574 para MDA-MB-231, CI = 0,67421 para PEO1, CI = 0,50931 para Kuramochi y CI = 0,38467 para SKOV3), las líneas celulares resistentes a OLA (CI = 0,17473 para MDA-MB-231R, CI = 0,26779 para PEO1R, CI = 0,77311 para KuramochiR y CI = 0,13990 para SKOV3R) y las líneas celulares resistentes a CBP (CI = 0,21888 para MDA-MB-231RCBP y CI = 0,69637 para PEO4) (**Tabla 18**).

Tabla 18: Valores de CI entre OLA y ALI en $Fa_{0,25}$, $Fa_{0,50}$ y $Fa_{0,75}$ en las líneas celulares parentales y las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, respectivamente.

Líneas celulares	CI en $Fa_{0,25}$	CI en $Fa_{0,50}$	CI en $Fa_{0,75}$
MDA-MB-231	0,20304	0,28574	0,41027
MDA-MB-231R	0,11720	0,17473	0,26368
MDA-MB-231RCBP	0,14680	0,21888	0,32702
PEO1	0,61363	0,67421	0,74334
PEO1R	0,18889	0,26779	0,38045
PEO4	0,58475	0,69637	0,83904
Kuramochi	0,41219	0,50931	0,63029
KuramochiR	0,70303	0,77311	0,85660
SKOV3	0,28309	0,38467	0,52549
SKOV3R	0,09011	0,13990	0,21760

Al igual que con la utilización de ALI en monoterapia, nos plantamos si el sinergismo entre ALI y OLA podría estar relacionado con un incremento de la actividad apoptótica en nuestras líneas celulares. Para ello, se realizó un ensayo mediante citometría de flujo para determinar el número de células apoptóticas producidas en cuatro condiciones distintas: sin tratamiento (CNT), tratamiento con la IC₅₀ para OLA (OLA), tratamiento con la IC₅₀ para ALI (ALI) y tratamiento con la IC₅₀ para OLA y ALI combinadas (COMBO), tanto en las líneas sensibles como resistentes a OLA y CBP, respectivamente.

En las líneas celulares parentales de COAG y CMTN, los resultados mostraron una tendencia similar a la mostrada anteriormente. El

Resultados

porcentaje de células apoptóticas fue superior de forma estadísticamente significativa cuando estas fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI (COMBO) en MDA-MB-231 ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), PEO1 ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), Kuramochi ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) y SKOV3 ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) en comparación al tratamiento con OLA o ALI, respectivamente (**Figura 26**).

En las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a OLA, el porcentaje de células apoptóticas fue superior de forma estadísticamente significativa cuando estas fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI (COMBO) en PEO1R ($p < 0,0001$ y $p = 0,0384$), KuramochiR ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) y SKOV3R ($p < 0,0001$ y $p < 0,0020$) en comparación al tratamiento con OLA o ALI, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de células apoptóticas producido en MDA-MB-231R cuando fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI fue superior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) en comparación al tratamiento con OLA, no existiendo diferencias cuando se compararon con el tratamiento con ALI (**Figura 26**).

En las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a CBP, el porcentaje de células apoptóticas fue superior de forma estadísticamente significativa cuando estas fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI (COMBO) en MDA-MB-231RCBP ($p < 0,0001$ y $p < 0,0238$) en comparación al tratamiento con OLA o ALI, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de células apoptóticas producido en PEO4 cuando fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI fue superior de forma estadísticamente significativa ($p = 0,0002$) en comparación al tratamiento

Resultados

con OLA, no existiendo diferencias cuando se compararon con el tratamiento con ALI (**Figura 26**).

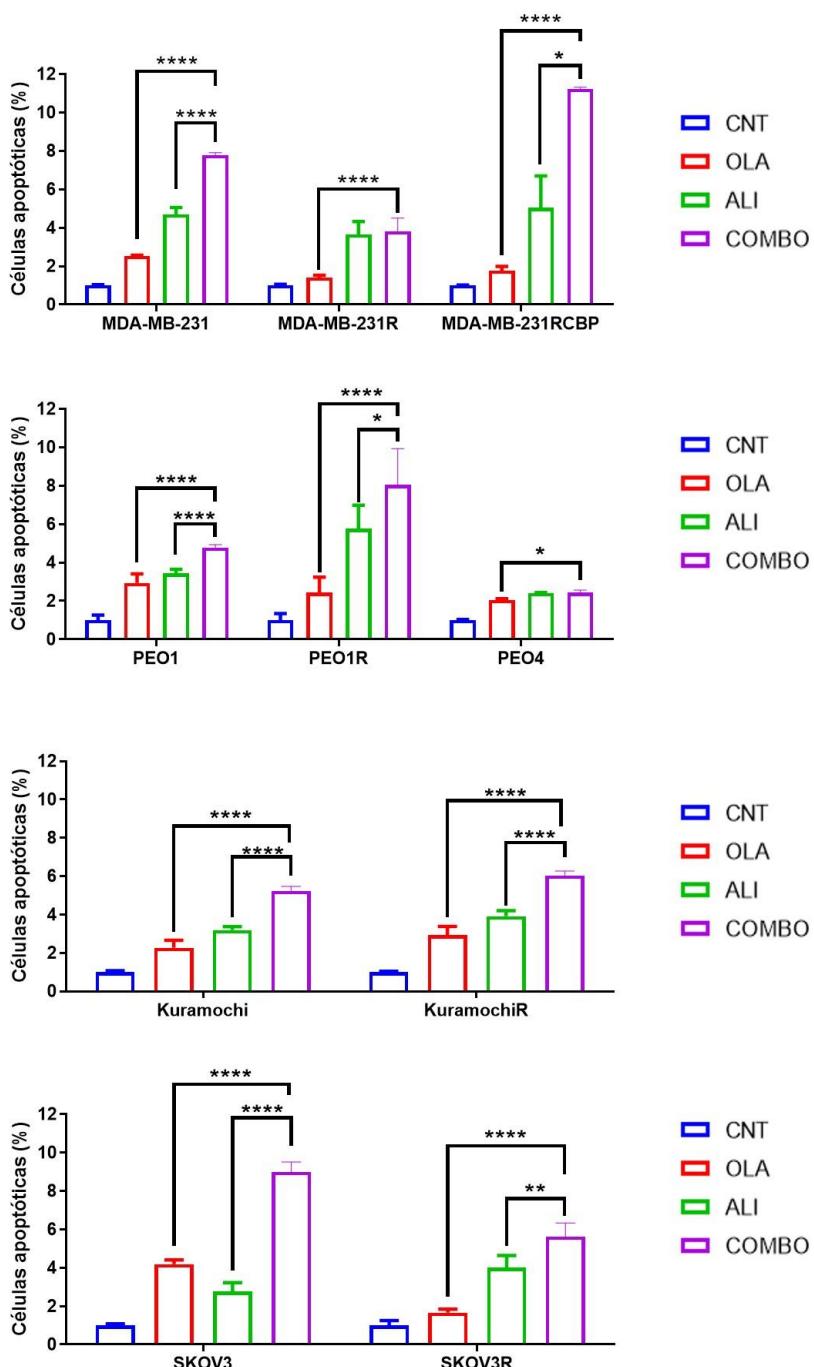


Figura 26: Porcentaje de células apoptóticas en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Determinación del porcentaje de células apoptóticas sin tratamiento (CNT), tras el tratamiento durante 72 horas con la IC₅₀ para OLA (OLA), tras el tratamiento durante 72 horas con la IC₅₀ para ALI (ALI) y tras el tratamiento durante 72 horas con la IC₅₀ para OLA y ALI combinadas (COMBO), en todas las líneas celulares utilizadas. Todos los porcentajes de células apoptóticas están normalizados en base CNT y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba *T*-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05, ** P < 0.01, **** p < 0.0001.

Finalmente, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, se realizó un análisis de la expresión proteica mediante Western Blot del marcador del daño en el ADN, γ-H2AX, tras la exposición de todas las líneas celulares utilizadas a las mismas condiciones expuestas en el apartado anterior.

En las líneas celulares de COAG parentales y resistentes a OLA, se observó que el incremento en la expresión de γ-H2AX cuando estas fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI (COMBO) fue mayor en comparación al incremento provocado por el tratamiento con OLA o ALI, respectivamente. Sin embargo, en la línea celular de COAG resistente a CBP (PEO4) no se observó dicha diferencia (**Figura 27**).

En las líneas celulares de CMTN se observó que en la línea celular resistente a CBP (MDA-MB-231RCBP) dicho incremento en la expresión de γ-H2AX cuando estas fueron tratadas con la combinación de OLA y ALI (COMBO) fue mayor en comparación al incremento provocado por el tratamiento con OLA o ALI, respectivamente. No obstante, en la línea celular parental (MDA-MB-231) y resistente a OLA (MDA-MB-231R) no se observó dicha diferencia (**Figura 27**).

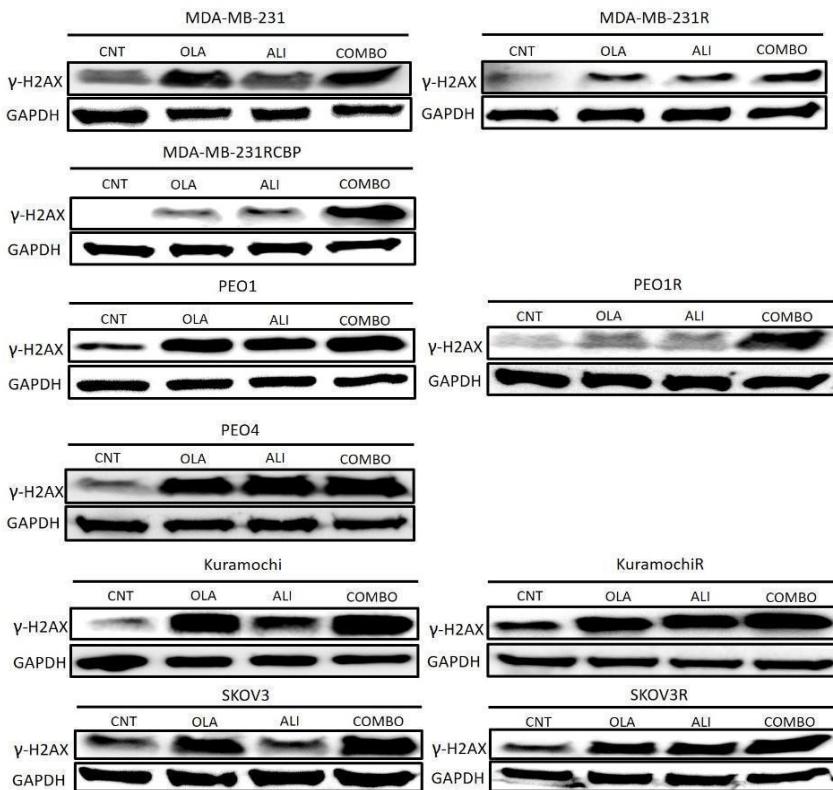


Figura 27: Análisis de la expresión proteica de γ -H2AX en las líneas celulares parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Análisis mediante Western Blot de la expresión proteica de γ -H2AX sin tratamiento (CNT), tras el tratamiento durante 72 horas con la IC₅₀ para OLA (OLA), tras el tratamiento durante 72 horas con la IC₅₀ para ALI (ALI) y tras el tratamiento durante 72 horas con la IC₅₀ para OLA y ALI combinadas (COMBO), en todas las líneas celulares utilizadas. Se utilizó la proteína GAPDH como control endógeno de expresión.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que existe un efecto sinérgico ($CI < 1$) entre OLA y ALI en todas las líneas celulares sensibles y resistentes a OLA y CBP. Así pues, observamos que tanto el porcentaje de células apoptóticas como la expresión del marcador del daño en el ADN, γ -H2AX, producidos por la combinación de OLA y ALI son mayores a los

producidos por el tratamiento por separado en todas las líneas celulares sensibles y resistentes a OLA y CBP, excepto en PEO4 y MDA-MB-231R.

4.8. Determinación del posible valor pronóstico de la aurora quinasa A en pacientes de cáncer de ovario y cáncer de mama triple negativo.

El valor pronóstico de la *AURKA* sobre la SLP y la SG se evaluó “*in silico*” utilizando una cohorte de 171 pacientes con CMTN y otra de 300 pacientes con CO, las cuales se analizaron de manera independiente incluyendo la edad de las pacientes y el estadio de la enfermedad como covariables de interés.

En el caso de la cohorte de CMTN, el análisis mediante el cálculo del HR a través de la regresión de riesgos proporcionales de Cox no encontró un efecto significativo de la expresión de *AURKA* sobre la SG tanto en estadios tempranos (I-II) ($p = 0,867$) como estadios avanzados (III-IV) ($p = 0,105$) de la enfermedad. Adicionalmente, tampoco se encontró un efecto significativo de la expresión de *AURKA* sobre la SLP tanto en estadios tempranos (I-II) ($p = 0,334$) como estadios avanzados (III-IV) ($p = 0,303$) de la enfermedad. Al incorporar la edad como variable en el análisis, no se observó un efecto significativo sobre la SG en pacientes con estadios tempranos ($p = 0,161$) ni con estadios avanzados ($p = 0,654$) de la enfermedad, obteniéndose el mismo resultado sobre la SLP en pacientes con estadios tempranos ($p = 0,994$) o con estadios avanzados ($p = 0,920$) de la enfermedad (**Tabla 19**).

Tabla 19: Resumen de la regresión de Cox teniendo en cuenta la expresión de *AURKA*, la edad y el estadio del tumor en pacientes de CMTN.

	Variable	HR	Intervalo de confianza	Valor p
SG	Estadio temprano (I-II)			
	Edad	1,03	0,99-1,08	0,161
	<i>AURKA</i>	1,10	0,36-3,42	0,867
	Estadio avanzado (III-IV)			
	Edad	1,01	0,96-1,06	0,654
	<i>AURKA</i>	0,34	0,09-1,25	0,105
SLP	Estadio temprano (I-II)			
	Edad	1	0,96-1,04	0,994
	<i>AURKA</i>	1,62	0,61-4,28	0,334
	Estadio avanzado (III-IV)			
	Edad	1	0,96-1,04	0,920
	<i>AURKA</i>	0,58	0,20-1,65	0,303

En el caso de la cohorte de CO, se encontró que la expresión de *AURKA* actuó como factor de buen pronóstico sobre la SG de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad ($p = 0,032$). Adicionalmente, también se encontró que la *AURKA* actuó como factor de buen pronóstico en relación con la SLP de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad ($p = 0,033$). Al incorporar la edad como variable de interés, dicho análisis encontró que actuó como factor de mal pronóstico sobre la SG ($p = 0,0008$), no siendo así en el caso de la SLP ($p = 0,175$) (**Tabla 20**).

Tabla 20: Resumen de la regresión de Cox teniendo en cuenta la expresión de *AURKA*, la edad y el estadio del tumor en pacientes de CO.

	Variable	HR	Intervalo de confianza	Valor p
SG	Estadio avanzado (III-IV)			
	Edad	1,02	1,01-1,04	0,0008
	<i>AURKA</i>	0,78	0,62-0,97	0,032
SLP	Estadio avanzado (III-IV)			
	Edad	1	0,87-2,09	0,175
	<i>AURKA</i>	0,79	0,64-0,98	0,033

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la inhibición farmacológica de AURKA o el bloqueo por silenciamiento podrían ser una estrategia válida en la reversión de las resistencias a CBP y OLA, al menos en algunas líneas celulares utilizadas. Esto podría deberse a lo publicado por Do et al. (2017) donde reportó que existe una modulación entre AURKA-BRCA1/2-PARP, de tal manera que la inhibición de AURKA activa el mecanismo de reparación de bases por unión de extremos no homólogos en detrimento de BRCA y PARP, dando lugar a la acumulación de errores y posterior muerte celular por apoptosis.

No obstante, estos resultados no fueron homogéneos en todos los modelos generados y según el experimento realizado, por lo que es de gran importancia validar dichos modelos celulares antes de su utilización.

Durante el desarrollo de ese trabajo se generaron modelos “*in vitro*” de líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a CBP y OLA. Según un estudio publicado por Huang et al. (2022) el mecanismo de adquisición de resistencia a OLA puede variar según el protocolo utilizado para la generación del modelo “*in vitro*”. En dicho trabajo se generaron dos líneas celulares resistentes a OLA a partir de la línea celular parental PEO1, una mediante tratamiento con dosis altas de OLA, la cual adquirió resistencia a OLA a través de la reversión de la mutación en *BRCA2*, y otra mediante exposición prolongada a dosis bajas de OLA, la cual adquirió resistencia a través de la recuperación de la capacidad de RH mediante la activación de la cascada de señalización ATR/CHK1. Al haber utilizado ambos protocolos para la generación de las líneas celulares resistentes a OLA, utilizando dosis altas de OLA para la generación de PEO1R y dosis bajas para la generación de KuramochiR, SKOV3R y MDA-MB-231R, es probable que algunos

resultados puedan diferir según el protocolo utilizado. La posterior secuenciación de *BRCA1/2* no mostró cambios en ninguna de las líneas celulares resistentes OLA al compararlas con las líneas celulares parentales.

En cuanto a las líneas celulares resistentes a CBP, se generó la línea MDA-MB-231RCBP siguiendo el protocolo de exposición a dosis bajas del fármaco, mientras que la línea celular PEO4, se obtuvo de la misma paciente que la línea parental PEO1, pero en el momento en que apareció la enfermedad recurrente tras la quimioterapia con platino. La posterior secuenciación de *BRCA1/2* evidenció una reversión de la mutación en *BRCA2* en PEO4 tal y como demostró Sakai et al. (2009). Sin embargo, no se observaron cambios en MDA-MB-231RCBP al compararla con la línea celular parental. Esta diferencia en cuanto al mecanismo de adquisición de la resistencia a CBP podría deberse a que se utilizaron protocolos distintos para la generación de ambos modelos celulares.

Por otro lado, publicaciones recientes sugieren que las pacientes de CO que recaen durante el tratamiento con iPARP tienen menos posibilidades de responder a un tratamiento posterior con compuestos derivados del platino. Incluso aquellas pacientes de CO que recaen una vez finalizado el tratamiento con iPARP tienen una respuesta mayor a la quimioterapia que aquellas que recaen durante el tratamiento (Frenel et al., 2022; Harter et al., 2023). Estos datos sugieren la existencia de una resistencia cruzada entre iPARP y CBP.

En el caso de nuestros modelos celulares resistentes, podría asemejarse más al caso clínico de recaída durante el tratamiento con iPARP. No

obstante, en nuestras líneas celulares, a pesar de que el protocolo seguido para la generación de la resistencia es diferente, todas presentaron resistencia cruzada a OLA y CBP, excepto la línea celular SKOV3R. Dicha resistencia cruzada ya fue reportada por Whicker et al. (2016) en PEO4. Sin embargo, al ser el resto de las líneas resistentes generadas “*in house*” no existen evidencias previas sobre dicha resistencia cruzada. Nuestros resultados corroboran las observaciones clínicas de una menor respuesta a la quimioterapia basada en CBP en pacientes con CO resistente a iPARP.

El hecho de que exista una resistencia cruzada al tratamiento con OLA y CBP podría deberse a que ambos fármacos presenten un mecanismo de acción complementario basado en la deficiencia de estos tumores para reparar el ADN, algo ya propuesto por McMullen et al. (2020) en COSAG y por Imyanitov & Sokolenko. (2021) en CM y CO. De esta manera, ambos fármacos podrían generar mecanismos de resistencia comunes en las líneas celulares, como son la reactivación de la reparación de las RDD por RH o la protección de la horquilla de replicación que promueve la progresión a través del ciclo celular (McMullen et al., 2020).

Respecto al estudio de la AURKA, una vez caracterizamos las líneas celulares resistentes a OLA y CBP, nos planteamos si podía existir una expresión diferencial de AURKA, tanto a nivel ARNm como de proteína, al compararlas con las líneas celulares parentales. Estudios previos han puesto de manifiesto una sobreexpresión o amplificación de la AURKA en tejido tumoral de CO y CM cuando se compara con tejido sano (Gritsko et al., 2003; Pérez Fidalgo et al., 2009).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo mostraron una menor expresión de AURKA, en las líneas de COAG resistentes a iPARP, mientras que la línea de CMTN resistente a iPARP mostró una sobreexpresión de AURKA tanto a nivel de ARNm como de proteína.

Debido a que la utilización de la AURKA como diana para el tratamiento de líneas celulares con resistencia adquirida a iPARP es algo que no se ha estudiado con anterioridad, no existen resultados previos de expresión de AURKA en dichas líneas celulares. No obstante, si bien la sobreexpresión de AURKA en la línea de CMTN concuerda con lo esperado, ya que existen estudios que relacionan la sobreexpresión de AURKA con mecanismos de resistencia a otros tratamientos que afectan a la capacidad de proliferación de las células tumorales como son los taxanos (Cirak et al., 2015) y compuestos aromáticos (Hole et al., 2015), la menor expresión de AURKA en las líneas celulares resistentes a OLA de COAG es un resultado inesperado. No obstante, una posible explicación podría ser que el mecanismo por el cual se ha adquirido dicha resistencia fuese independiente de la expresión de AURKA, aunque esta pueda actuar como diana para el tratamiento de la enfermedad recurrente.

Otra posible explicación es que la expresión de AURKA fuese menor debido a un mayor grado de fosforilación, haciendo que esta fuese más activa, sin embargo, a pesar de que estudios en otros tipos de neoplasias como el adenocarcinoma gástrico (Li et al., 2018) o el cáncer de pulmón (Han et al., 2024) si que pudieron determinar dicha forma fosforilada, no hemos sido capaces de determinar la forma fosforilada de la AURKA en nuestros modelos celulares utilizados. A pesar de esta disparidad en

cuanto a la expresión de AURKA, este es uno de los resultados más llamativos de nuestro trabajo y que genera múltiples hipótesis.

Por otro lado, cuando comparamos la expresión de AURKA entre las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a CBP y sus líneas celulares parentales, observamos una tendencia al incremento en los niveles de AURKA tanto a nivel de ARNm como de proteína. Estos resultados en la línea de COAG coinciden con los publicados por Sun et al. (2020), el cual observó una sobreexpresión de AURKA en líneas de CO resistentes a otro compuesto derivado del platino (cisplatino), concluyendo que la AURKA induce resistencia a cisplatino debido a que participa en el eje de señalización *SOX8/FOXK1* que regula el metabolismo de la glucosa. Otro estudio realizado por Shao et al. (2023) también relaciona la sobreexpresión de AURKA con la resistencia a cisplatino en COE debido a que esta favorece la lipofagia mediante un mecanismo de retroalimentación. Estos resultados nos llevan a deducir que los mecanismos de resistencia a CBP y cisplatino podrían ser similares y dependientes de AURKA en el CO. En el caso del CMTN, un estudio publicado por Hu et al. (2022) pone de manifiesto la posible relación de AURKA y AURKB con mecanismos de resistencia a compuestos derivados del platino, pero de momento es solo un análisis “*in silico*” de bases de datos y no se ha podido demostrar en condiciones “*in vitro*”.

A pesar de la variabilidad en cuanto a la expresión de AURKA observada entre nuestras líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a OLA y CBP, nos planteamos si la inhibición de la AURKA podría ser utilizada para revertir dicha resistencia. Para ello, evaluamos la inhibición de AURKA

tanto farmacológica, mediante el tratamiento con ALI, como génica, mediante silenciamiento.

En cuanto a la inhibición farmacológica de AURKA, el tratamiento con ALI se está utilizando con resultados prometedores en ensayos clínicos en fase II para el CO (Matulonis et al., 2012) y CM (Melichar et al., 2015). Nuestros resultados revelaron que en las líneas celulares de COSAG resistentes a OLA (PEOR y KuramochiR) y las líneas celulares de CMTN resistente a OLA (MDA-MB-231R) y a CBP (MDA-MB-231RCBP), la utilización de ALI era igual o incluso más efectiva que en las líneas celulares parentales (PEO1, Kuramochi y MDA-MB-231) produciendo tanto mayor daño en el ADN, como se ve por el incremento de γ-H2AX, como mayor apoptosis. Por el contrario, no fue efectivo en la línea de COEN resistente a OLA (SKOV3R) ni en la línea de COAG resistente a CBP (PEO4). El resultado obtenido en la línea celular PEO4 ya fue observado por Do et al. (2017), concluyendo que podría deberse a la resistencia innata de esta línea celular a CBP, a diferencia del resto de líneas celulares cuya resistencia es adquirida. Sin embargo, la resistencia de la línea celular SKOV3R es algo que no se ha estudiado anteriormente, una posible explicación podría ser que el mecanismo de adquisición de la resistencia a OLA fuese diferente del resto de líneas celulares de COAG debido a que esta línea presenta *BRCA* no mutado en contraposición al resto, que presentan *BRCA* mutado. Aunque los resultados en las líneas de CMTN que también es *BRCA* no mutado hacen que sean necesarios más averiguaciones para poder refutar dicha hipótesis.

Respecto a la inhibición de AURKA mediante silenciamiento del gen, se ha demostrado su efectividad a nivel preclínico para el tratamiento de

distintos tipos de cáncer (Miyoshi et al., 2001; Yang et al., 2020) así como en CO (Yang et al., 2010) y CM (Li et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de *AURKA* aumentó la sensibilidad a OLA en todas las líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a OLA, no siendo efectivo en las líneas celulares parentales, excepto en MDA-MB-231. Estos resultados podrían coincidir con la hipótesis anterior de que la *AURKA* está menos expresada en las líneas celulares resistentes a OLA, pero presentaría un mayor grado de fosforilación y por lo tanto mayor activación que en las líneas parentales, lo cual haría que el silenciamiento de *AURKA* fuese más efectivo. No obstante, que el silenciamiento no fuese efectivo en las líneas celulares parentales es algo que no podemos explicar y que se deberá estudiar en profundidad antes de llegar a una conclusión.

A continuación, nos planteamos si la combinación de OLA y ALI podría tener un efecto sinérgico en todas las líneas celulares de COAG y CMTN, tanto sensibles como resistentes a OLA y CBP. Nuestros resultados mostraron que existe sinergismo entre OLA y ALI en todas las líneas celulares ensayadas, ya que el CI calculado mediante el método Chou-Talalay fue inferior a 1 para la mayoría de las concentraciones de fármacos utilizadas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Do et al. (2017) donde observó que existía sinergismo entre ALI y otro iPARP (rucaparib) en las líneas celulares de COAG PEO1 (*BRCA* mutado) y SKOV3 (*BRCA* no mutado), demostrando además que el sinergismo entre ambos fármacos es independiente del estado mutacional de *BRCA*.

Este estudio tiene especial importancia en las líneas celulares que presentan *BRCA* no mutado, ya que el mecanismo de acción denominado

“letalidad sintética” en el que se basan los iPARP no sería tan efectivo como en el resto de las líneas celulares con *BRCA* mutado (Lord & Ashworth, 2017). Sin embargo, la modulación negativa de *BRCA* producida por la inhibición de *AURKA*, junto a la inhibición de PARP producida por el tratamiento con OLA, daría como resultado un incremento de las RDC del ADN, tal y como se observa por el incremento de γ -H2AX. Siguiendo este razonamiento, las RDC no podrían ser reparadas por RH y se activaría el mecanismo de reparación de bases por unión de extremos no homólogos, dando lugar a la acumulación de errores y posterior muerte celular por apoptosis.

Por otro lado, el punto más importante en nuestro trabajo es el sinergismo observado en las líneas celulares con resistencia adquirida a OLA y CBP generadas a partir de las líneas celulares parentales, ya que en el estudio publicado por Do et al. (2017) no disponen de estos modelos celulares. El sinergismo obtenido en estos modelos podría deberse a la modulación negativa de PARP producida por la inhibición de *AURKA*, de tal manera que dicho efecto potenciaría la inhibición de PARP producida por el tratamiento con OLA, aumentando su efectividad en las líneas celulares resistentes.

Finalmente, nos planteamos la posible utilización de la *AURKA* como marcador pronóstico en CO y CMTN a nivel clínico. Los resultados obtenidos en el estudio “*in silico*” de pacientes con CMTN no mostraron un efecto significativo de la expresión de *AURKA* sobre la SG y la SLP, independientemente del estadio del tumor. Estudios previos han puesto de manifiesto que una sobrexpresión de la *AURKA* está asociada con una SG y SLP menor en CM (Miyoshi et al., 2001; Xu et al., 2013). Sin embargo,

un estudio realizado por Liao et al. (2018) en una cohorte de pacientes con CMTN que habían recibido quimioterapia basada en taxanos, evidenció que determinados polimorfismos en la secuencia de ADN de la *AURKA* utilizada para el análisis podrían afectar a los resultados obtenidos. Esto podría ser una explicación de la disparidad con nuestros resultados, aunque sería necesario un estudio más en profundidad.

Los resultados obtenidos del estudio “*in silico*” de pacientes con CO evidenciaron que *AURKA* actúa como factor de buen pronóstico de forma estadísticamente significativa, tanto sobre la SG como la SLP. Esto contradice los resultados obtenidos en la bibliografía, los cuales asocian la sobreeexpresión de *AURKA* con un peor pronóstico en CO (Kulkarni et al., 2007; Landen et al., 2007). Sin embargo, sí que coinciden con los obtenidos por Mendiola et al. (2009) y Lassmann et al. (2007), los cuales observaron que la *AURKA* actuaba como factor de buen pronóstico en pacientes con CO, tanto en estadios tempranos como avanzados de la enfermedad, que han recibido tratamiento con quimioterapia basada en taxanos/platinos. Estos resultados coinciden además con los obtenidos en nuestros modelos celulares, ya que observamos una menor expresión de *AURKA* en nuestras líneas celulares de COAG resistentes a OLA en comparación a las líneas celulares parentales. La explicación que se propone en la bibliografía consultada es que una mayor expresión de *AURKA* está correlacionada con una mayor capacidad de proliferación, lo que sugiere que tumores con esta mayor capacidad de crecimiento serían más sensibles a la quimioterapia (Mendiola et al., 2009). No obstante, sería necesaria una cohorte más grande de pacientes para poder

confirmar los resultados obtenidos debido a la variabilidad entre diferentes estudios.

En resumen, en el desarrollo de esta tesis doctoral se han generado cuatro líneas celulares de COAG y CMTN resistentes a OLA y una línea celular de CMTN resistente a CBP. A pesar de que no hemos sido capaces de dilucidar la relación de la AURKA con el mecanismo de adquisición de estas resistencias, el hallazgo de que la AURKA puede ser utilizada como diana para la reversión de las resistencias a estos fármacos, tanto en monoterapia como en combinación con OLA, abre una puerta para futuros estudios que tengan como objetivo acabar con la recurrencia de estas enfermedades, la cual sigue siendo uno de los principales obstáculos para la completa recuperación de los pacientes.

Conclusiones

1. AURKA se constituye como una potencial diana terapéutica en nuestros modelos celulares de COAG y CMTN con resistencia adquirida a OLA y CBP.
2. La generación de modelos preclínicos basados en líneas celulares de COAG y CMTN válidos para estudiar la resistencia a OLA ha sido posible, obteniéndose 3 líneas celulares de COAG (PEO1R, KuramochiR y SKOV3R) y una línea de CMTN (MDA-MB-231R), todas ellas resistentes a OLA.
3. La generación de modelos preclínicos basados en líneas celulares de CMTN válidos para estudiar la resistencia a CBP ha sido posible, obteniéndose la línea celular MDA-MB-231RCBP resistente a CBP. No obstante, no hemos sido capaces de generar, hasta el momento, modelos preclínicos basados en líneas celulares de COAG con resistencia adquirida a CBP.
4. Existe una resistencia cruzada a CBP y OLA en todos los modelos celulares de CO y CM resistentes utilizados, tanto con resistencia innata como adquirida a los fármacos utilizados.
5. La caracterización de los modelos celulares generados no ha dilucidado cambios en el patrón mutacional de *BRCA1/2* ni *TP53*, por lo que el mecanismo de adquisición de resistencia debe de ser independiente de estos genes.
6. La expresión diferencial de la AURKA parece estar relacionada con el mecanismo de adquisición de resistencia a OLA y CBP en los modelos celulares utilizados. Sin embargo, es posible que este

mecanismo actúe de forma distinta en función del fármaco utilizado para generar dicha resistencia.

7. No ha sido posible esclarecer la posible utilización de la AURKA como marcador pronóstico de supervivencia en la cohorte de pacientes con COAG y CMTN utilizada.
8. La utilización combinada de ALI y OLA ha demostrado presentar un efecto sinérgico en todos los modelos celulares utilizados, tanto sensibles como resistentes a CBP y OLA.

6. BIBLIOGRAFIA.

- Afghahi, A., Timms, K. M., Vinayak, S., Jensen, K. C., Kurian, A. W., Carlson, R. W., Chang, P. J., Schackmann, E., Hartman, A. R., Ford, J. M., & Telli, M. L. (2017). Tumor BRCA1 Reversion Mutation Arising during Neoadjuvant Platinum-Based Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with Therapy Resistance. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(13), 3365–3370. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2174>
- Amé, J. C., Fouquerel, E., Gauthier, L. R., Biard, D., Boussin, F. D., Dantzer, F., de Murcia, G., & Schreiber, V. (2009). Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *Journal of cell science*, 122(Pt 12), 1990–2002. <https://doi.org/10.1242/jcs.039115>
- Amin, M., Minton, S. E., LoRusso, P. M., Krishnamurthi, S. S., Pickett, C. A., Lunceford, J., Hille, D., Mauro, D., Stein, M. N., Wang-Gillam, A., Trull, L., & Lockhart, A. C. (2016). A phase I study of MK-5108, an oral aurora a kinase inhibitor, administered both as monotherapy and in combination with docetaxel, in patients with advanced or refractory solid tumors. *Investigational new drugs*, 34(1), 84–95. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0306-7>
- Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J., & Swedlow, J. R. (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Current opinion in cell biology*, 15(6), 672–683. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.013>
- Baldini, E., D'Armiento, M., & Ulisse, S. (2014). A new aurora in anaplastic thyroid cancer therapy. *International journal of endocrinology*, 2014, 816430. <https://doi.org/10.1155/2014/816430>
- Barr, P. M., Li, H., Spier, C., Mahadevan, D., LeBlanc, M., Ul Haq, M., Huber, B. D., Flowers, C. R., Wagner-Johnston, N. D., Horwitz, S. M., Fisher, R. I., Cheson, B. D., Smith, S. M., Kahl, B. S., Bartlett, N. L., &

- Friedberg, J. W. (2015). Phase II Intergroup Trial of Alisertib in Relapsed and Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma and Transformed Mycosis Fungoides: SWOG 1108. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(21), 2399–2404. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.6327>
- Beltran, H., Oromendia, C., Danila, D. C., Montgomery, B., Hoimes, C., Szmulewitz, R. Z., Vaishampayan, U., Armstrong, A. J., Stein, M., Pinski, J., Mosquera, J. M., Sailer, V., Bareja, R., Romanel, A., Gumpeni, N., Sboner, A., Dardenne, E., Puca, L., Prandi, D., Rubin, M. A., ... Tagawa, S. T. (2019). A Phase II Trial of the Aurora Kinase A Inhibitor Alisertib for Patients with Castration-resistant and Neuroendocrine Prostate Cancer: Efficacy and Biomarkers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(1), 43–51. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1912>
- Berek, J. S., Renz, M., Kehoe, S., Kumar, L., & Friedlander, M. (2021). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 155 Suppl 1(Suppl 1), 61–85. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13878>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bolanos-Garcia V. M. (2005). Aurora kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(8), 1572–1577. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.021>

Bibliografía

- Bookman, M. A., Brady, M. F., McGuire, W. P., Harper, P. G., Alberts, D. S., Friedlander, M., Colombo, N., Fowler, J. M., Argenta, P. A., De Geest, K., Mutch, D. G., Burger, R. A., Swart, A. M., Trimble, E. L., Accario-Winslow, C., & Roth, L. M. (2009). Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(9), 1419–1425. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.1684>
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- Burger, R. A., Brady, M. F., Bookman, M. A., Fleming, G. F., Monk, B. J., Huang, H., Mannel, R. S., Homesley, H. D., Fowler, J., Greer, B. E., Boente, M., Birrer, M. J., Liang, S. X., & Gynecologic Oncology Group (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine*, 365(26), 2473–2483. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104390>
- Caan, B. J., & Thomson, C. (2007). 10 Breast and ovarian cancer (Vol. 229).
- Čančer, M., Drews, L. F., Bengtsson, J., Bolin, S., Rosén, G., Westermark, B., Nelander, S., Forsberg-Nilsson, K., Uhrbom, L., Weishaupt, H., & Swartling, F. J. (2019). BET and Aurora Kinase A inhibitors synergize against MYCN-positive human glioblastoma cells. *Cell death & disease*, 10(12), 881. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2120-1>

- Caswell-Jin, J. L., Plevritis, S. K., Tian, L., Cadham, C. J., Xu, C., Stout, N. K., Sledge, G. W., Mandelblatt, J. S., & Kurian, A. W. (2018). Change in Survival in Metastatic Breast Cancer with Treatment Advances: Meta-Analysis and Systematic Review. *JNCI cancer spectrum*, 2(4), pky062. <https://doi.org/10.1093/jncics/pky062>
- Ceccaldi, R., Liu, J. C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M. I., O'Connor, K. W., Konstantinopoulos, P. A., Elledge, S. J., Boulton, S. J., Yusufzai, T., & D'Andrea, A. D. (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Polθ-mediated repair. *Nature*, 518(7538), 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature14184>
- Cervantes, A., Elez, E., Roda, D., Ecsedy, J., Macarulla, T., Venkatakrishnan, K., Roselló, S., Andreu, J., Jung, J., Sanchis-Garcia, J. M., Piera, A., Blasco, I., Maños, L., Pérez-Fidalgo, J. A., Fingert, H., Baselga, J., & Tabernero, J. (2012). Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective aurora a kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(17), 4764–4774. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0571>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(8), 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Cheetham, G. M., Knegtel, R. M., Coll, J. T., Renwick, S. B., Swenson, L., Weber, P., Lippke, J. A., & Austen, D. A. (2002). Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *The Journal*

- of biological chemistry, 277(45), 42419–42422.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200426200>
- Chou T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 70(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
 - Cirak, Y., Furuncuoglu, Y., Yapicier, O., Aksu, A., & Cubukcu, E. (2015). Aurora A overexpression in breast cancer patients induces taxane resistance and results in worse prognosis. *Journal of B.U.O.N: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 20(6), 1414–1419.
 - Coleman, R. L., Oza, A. M., Lorusso, D., Aghajanian, C., Oaknin, A., Dean, A., Colombo, N., Weerpals, J. I., Clamp, A., Scambia, G., Leary, A., Holloway, R. W., Gancedo, M. A., Fong, P. C., Goh, J. C., O'Malley, D. M., Armstrong, D. K., Garcia-Donas, J., Swisher, E. M., Floquet, A., ... ARIEL3 Investigators (2017). Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* (London, England), 390(10106), 1949–1961. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32440-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32440-6)
 - Crum, C. P., Drapkin, R., Kindelberger, D., Medeiros, F., Miron, A., & Lee, Y. (2007). Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clinical medicine & research*, 5(1), 35–44. <https://doi.org/10.3121/cmr.2007.702>
 - Curigliano, G., Burstein, H. J., Winer, E. P., Gnant, M., Dubsky, P., Loibl, S., Colleoni, M., Regan, M. M., Piccart-Gebhart, M., Senn, H. J., Thürlimann, B., St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017, André, F., Baselga, J., Bergh, J., Bonnifoi, H., Brucker, S. Y., Cardoso, F., Carey, L., Ciruelos, E., ... Xu, B.

(2017). De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(8), 1700–1712.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx308>

- da Costa, R., Passos, G. F., Quintão, N. L. M., Fernandes, E. S., Maia, J. R. L. C. B., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2020). Taxane-induced neurotoxicity: Pathophysiology and therapeutic perspectives. *British journal of pharmacology*, 177(14), 3127–3146.
<https://doi.org/10.1111/bph.15086>

- Damodaran, A. P., Vaufrey, L., Gavard, O., & Prigent, C. (2017). Aurora A Kinase Is a Priority Pharmaceutical Target for the Treatment of Cancers. *Trends in pharmacological sciences*, 38(8), 687–700.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.05.003>

- D'Andrea A. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA repair*, 71, 172–176.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.021>

- Dees, E. C., Cohen, R. B., von Mehren, M., Stinchcombe, T. E., Liu, H., Venkatakrishnan, K., Manfredi, M., Fingert, H., Burris, H. A., 3rd, & Infante, J. R. (2012). Phase I study of aurora A kinase inhibitor MLN8237 in advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and bioavailability of two oral formulations. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(17), 4775–4784. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0589>

- Dees, E. C., Infante, J. R., Cohen, R. B., O'Neil, B. H., Jones, S., von Mehren, M., Danaee, H., Lee, Y., Ecsedy, J., Manfredi, M., Galvin, K., Stringer, B., Liu, H., Eton, O., Fingert, H., & Burris, H. (2011). Phase 1 study

- of MLN8054, a selective inhibitor of Aurora A kinase in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67(4), 945–954. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1377-y>
- Derakhshan, F., & Reis-Filho, J. S. (2022). Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annual review of pathology*, 17, 181–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-093238>
 - DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(6), 438–451. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>
 - Diamond, J. R., Bastos, B. R., Hansen, R. J., Gustafson, D. L., Eckhardt, S. G., Kwak, E. L., Pandya, S. S., Fletcher, G. C., Pitts, T. M., Kulikowski, G. N., Morrow, M., Arnott, J., Bray, M. R., Sidor, C., Messersmith, W., & Shapiro, G. I. (2011). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of ENMD-2076, a novel angiogenic and Aurora kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(4), 849–860. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2144>
 - Dias, M. P., Moser, S. C., Ganesan, S., & Jonkers, J. (2021). Understanding and overcoming resistance to PARP inhibitors in cancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 18(12), 773–791. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00532-x>
 - DiSilvestro, P., Banerjee, S., Colombo, N., Scambia, G., Kim, B. G., Oaknin, A., Friedlander, M., Lisyanskaya, A., Floquet, A., Leary, A., Sonke, G. S., Gourley, C., Oza, A., González-Martín, A., Aghajanian, C., Bradley, W., Mathews, C., Liu, J., McNamara, J., Lowe, E. S., ... SOLO1 Investigators

(2023). Overall Survival with Maintenance Olaparib at a 7-Year Follow-Up in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer and a BRCA Mutation: The SOLO1/GOG 3004 Trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(3), 609–617.
<https://doi.org/10.1200/JCO.22.01549>

- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., & Taylor, S. S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology*, 161(2), 267–280.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200208091>

- Do, T. V., Hirst, J., Hyter, S., Roby, K. F., & Godwin, A. K. (2017). Aurora A kinase regulates non-homologous end-joining and poly (ADP-ribose) polymerase function in ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*, 8(31), 50376–50392.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.18970>

- Dodson, C. A., Kosmopoulou, M., Richards, M. W., Atrash, B., Bavetsias, V., Blagg, J., & Bayliss, R. (2010). Crystal structure of an Aurora-A mutant that mimics Aurora-B bound to MLN8054: insights into selectivity and drug design. *The Biochemical journal*, 427(1), 19–28.
<https://doi.org/10.1042/BJ20091530>

- Domchek, S. M., Postel-Vinay, S., Im, S. A., Park, Y. H., Delord, J. P., Italiano, A., Alexandre, J., You, B., Bastian, S., Krebs, M. G., Wang, D., Waqar, S. N., Lanasa, M., Rhee, J., Gao, H., Rocher-Ros, V., Jones, E. V., Gulati, S., Coenen-Stass, A., Kozarewa, I., ... Kaufman, B. (2020). Olaparib and durvalumab in patients with germline BRCA-mutated metastatic breast cancer (MEDIOLA): an open-label, multicentre, phase 1/2, basket

- study. The Lancet. Oncology, 21(9), 1155–1164.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30324-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30324-7)
- Du, R., Huang, C., Liu, K., Li, X., & Dong, Z. (2021). Targeting AURKA in Cancer: molecular mechanisms and opportunities for Cancer therapy. Molecular cancer, 20(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01305-3>
 - Edwards, S. L., Brough, R., Lord, C. J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D. A., Boyd, J., Reis-Filho, J. S., & Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. Nature, 451(7182), 1111–1115. <https://doi.org/10.1038/nature06548>
 - Falchook, G., Coleman, R. L., Roszak, A., Behbakht, K., Matulonis, U., Ray-Coquard, I., Sawrycki, P., Duska, L. R., Tew, W., Ghamande, S., Lesoin, A., Schwartz, P. E., Buscema, J., Fabbro, M., Lortholary, A., Goff, B., Kurzrock, R., Martin, L. P., Gray, H. J., Fu, S., ... Schilder, R. J. (2019). Alisertib in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with Advanced Breast Cancer or Recurrent Ovarian Cancer: A Randomized Clinical Trial. JAMA oncology, 5(1), e183773.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.3773>
 - Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M., Jackson, S. P., Smith, G. C., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature, 434(7035), 917–921.
<https://doi.org/10.1038/nature03445>
 - Frenel, J. S., Kim, J. W., Aryal, N., Asher, R., Berton, D., Vidal, L., Pautier, P., Ledermann, J. A., Penson, R. T., Oza, A. M., Korach, J., Huzarski, T., Pignata, S., Colombo, N., Park-Simon, T. W., Tamura, K., Sonke, G. S.,

Freimund, A. E., Lee, C. K., & Pujade-Lauraine, E. (2022). Efficacy of subsequent chemotherapy for patients with BRCA1/2-mutated recurrent epithelial ovarian cancer progressing on olaparib versus placebo maintenance: post-hoc analyses of the SOLO2/ENGOT Ov-21 trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 33(10), 1021–1028.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.06.011>

- Friedberg, J. W., Mahadevan, D., Cebula, E., Persky, D., Lossos, I., Agarwal, A. B., Jung, J., Burack, R., Zhou, X., Leonard, E. J., Fingert, H., Danaee, H., & Bernstein, S. H. (2014). Phase II study of alisertib, a selective Aurora A kinase inhibitor, in relapsed and refractory aggressive B- and T-cell non-Hodgkin lymphomas. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(1), 44–50.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.8793>

- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T., & Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*, 437(7061), 1043–1047.
<https://doi.org/10.1038/nature04217>

- Geyer, C. E., Jr, Garber, J. E., Gelber, R. D., Yothers, G., Taboada, M., Ross, L., Rastogi, P., Cui, K., Arahmani, A., Aktan, G., Armstrong, A. C., Arnedos, M., Balmaña, J., Bergh, J., Bliss, J., Delaloge, S., Domchek, S. M., Eisen, A., Elsafy, F., Fein, L. E., ... OlympiA Clinical Trial Steering Committee and Investigators (2022). Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high-risk, early breast cancer. *Annals of oncology: official*

- journal of the European Society for Medical Oncology, 33(12), 1250–1268. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.09.159>
- Gică, N., Peltecu, G., Chirculescu, R., Gică, C., Stoicea, M. C., Serbanica, A. N., & Panaitescu, A. M. (2022). Ovarian Germ Cell Tumors: Pictorial Essay. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 12(9), 2050. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092050>
- Goodall, J., Mateo, J., Yuan, W., Mossop, H., Porta, N., Miranda, S., Perez-Lopez, R., Dolling, D., Robinson, D. R., Sandhu, S., Fowler, G., Ebbs, B., Flohr, P., Seed, G., Rodrigues, D. N., Boysen, G., Bertan, C., Atkin, M., Clarke, M., Crespo, M., ... TOPARP-A investigators (2017). Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer discovery*, 7(9), 1006–1017. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0261>
- Görgün, G., Calabrese, E., Hideshima, T., Ecsedy, J., Perrone, G., Mani, M., Ikeda, H., Bianchi, G., Hu, Y., Cirstea, D., Santo, L., Tai, Y. T., Nahar, S., Zheng, M., Bandi, M., Carrasco, R. D., Raje, N., Munshi, N., Richardson, P., & Anderson, K. C. (2010). A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood*, 115(25), 5202–5213. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259523>
- Graff, J. N., Higano, C. S., Hahn, N. M., Taylor, M. H., Zhang, B., Zhou, X., Venkatakrishnan, K., Leonard, E. J., & Sarantopoulos, J. (2016). Open-label, multicenter, phase 1 study of alisertib (MLN8237), an aurora A kinase inhibitor, with docetaxel in patients with solid tumors. *Cancer*, 122(16), 2524–2533. <https://doi.org/10.1002/cncr.30073>

- Gritsko, T. M., Coppola, D., Paciga, J. E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S. A., Fiorica, J. V., Nicosia, S. V., & Cheng, J. Q. (2003). Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(4), 1420–1426.
- Han, M., Liu, X., Hailati, S., Nurahmat, N., Dilimulati, D., Baishan, A., Aikebaier, A., & Zhou, W. (2024). Evaluation of the Efficacy of OSU-2S in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer and Screening of Potential Targets of Action. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 17(5), 582. <https://doi.org/10.3390/ph17050582>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Harter, P., Mouret-Reynier, M. A., Lorusso, D., Cropet, C., Guerra, E. M., Wolfrum-Ristau, P., ... & Ray-Coquard, I. L. (2023). Efficacy of subsequent therapies in patients (pts) with advanced ovarian cancer (AOC) in the phase III PAOLA-1/ENGOT-ov25 trial according to whether disease progression occurred during or after the end of olaparib (ola) maintenance.
- Hartman, A. R., Kaldate, R. R., Sailer, L. M., Painter, L., Grier, C. E., Endsley, R. R., Griffin, M., Hamilton, S. A., Frye, C. A., Silberman, M. A., Wenstrup, R. J., & Sandbach, J. F. (2012). Prevalence of BRCA mutations

- in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer*, 118(11), 2787–2795. <https://doi.org/10.1002/cncr.26576>
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., & Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, 114(5), 585–598. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00642-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00642-1)
- Hole, S., Pedersen, A. M., Lykkesfeldt, A. E., & Yde, C. W. (2015). Aurora kinase A and B as new treatment targets in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 149(3), 715–726. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3284-8>
- Hu, T., Wang, X., Xia, Y., Wu, L., Ma, Y., Zhou, R., & Zhao, Y. (2022). Comprehensive analysis identifies as a critical prognostic prediction gene in breast cancer. *Chinese medical journal*, 135(18), 2218–2231. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002025>
- Huang, T. T., Burkett, S. S., Tandon, M., Yamamoto, T. M., Gupta, N., Bitler, B. G., Lee, J. M., & Nair, J. R. (2022). Distinct roles of treatment schemes and BRCA2 on the restoration of homologous recombination DNA repair and PARP inhibitor resistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 41(46), 5020–5031. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02491-8>
- Hunn, J., & Rodriguez, G. C. (2012). Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clinical obstetrics and gynecology*, 55(1), 3–23. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31824b4611>

- Iglehart, J. D., & Silver, D. P. (2009). Synthetic lethality--a new direction in cancer-drug development. *The New England journal of medicine*, 361(2), 189–191. <https://doi.org/10.1056/NEJMMe0903044>
- Imai, Y., Hasegawa, K., Matsushita, H., Fujieda, N., Sato, S., Miyagi, E., Kakimi, K., & Fujiwara, K. (2018). Expression of multiple immune checkpoint molecules on T cells in malignant ascites from epithelial ovarian carcinoma. *Oncology letters*, 15(5), 6457–6468. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8101>
- Imyanitov, E., & Sokolenko, A. (2021). Mechanisms of acquired resistance of BRCA1/2-driven tumors to platinum compounds and PARP inhibitors. *World journal of clinical oncology*, 12(7), 544–556. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i7.544>
- Islam, M. R., Rahman, M. M., Dhar, P. S., Nowrin, F. T., Sultana, N., Akter, M., Rauf, A., Khalil, A. A., Gianoncelli, A., & Ribaudo, G. (2023). The Role of Natural and Semi-Synthetic Compounds in Ovarian Cancer: Updates on Mechanisms of Action, Current Trends and Perspectives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(5), 2070. <https://doi.org/10.3390/molecules28052070>
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., & Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. *Lancet* (London, England), 384(9951), 1376–1388. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7)
- Jiang, Y., Zhang, Y., Lees, E., & Seghezzi, W. (2003). AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene*, 22(51), 8293–8301. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206873>

- Jing, X. L., & Chen, S. W. (2021). Aurora kinase inhibitors: a patent review (2014-2020). *Expert opinion on therapeutic patents*, 31(7), 625–644. <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1890027>
- Khan, J., Ezan, F., Crémet, J. Y., Fautrel, A., Gilot, D., Lambert, M., Benaud, C., Troadec, M. B., & Prigent, C. (2011). Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumour formation. *PloS one*, 6(10), e26512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026512>
- Kim, G., Ison, G., McKee, A. E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., Sridhara, R., Lee, E., Tzou, A., Philip, R., Chiu, H. J., Ricks, T. K., Palmby, T., Russell, A. M., Ladouceur, G., Pfuma, E., Li, H., Zhao, L., Liu, Q., Venugopal, R., ... Pazdur, R. (2015). FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(19), 4257–4261. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0887>
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., & Okano, Y. (1999). Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *The Journal of biological chemistry*, 274(11), 7334–7340. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7334>
- King, M. C., Marks, J. H., Mandell, J. B., & New York Breast Cancer Study Group (2003). Breast and ovarian cancer risk due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5645), 643–646. <https://doi.org/10.1126/science.1088759>
- Kondrashova, O., Nguyen, M., Shield-Artin, K., Tinker, A. V., Teng, N. N. H., Harrell, M. I., Kuiper, M. J., Ho, G. Y., Barker, H., Jasins, M., Prakash, R., Kass, E. M., Sullivan, M. R., Brunette, G. J., Bernstein, K. A.,

Coleman, R. L., Floquet, A., Friedlander, M., Kichenadasse, G., O'Malley, D. M., ... AOCS Study Group (2017). Secondary Somatic Mutations Restoring RAD51C and RAD51D Associated with Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. *Cancer discovery*, 7(9), 984–998. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0419>

- Kossaï, M., Leary, A., Scoazec, J. Y., & Genestie, C. (2018). Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 85(1-2), 41–49. <https://doi.org/10.1159/000479006>

- Kudelova, E., Smolar, M., Holubekova, V., Hornakova, A., Dvorska, D., Lucansky, V., Koklesova, L., Kudela, E., & Kubatka, P. (2022). Genetic Heterogeneity, Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 14937. <https://doi.org/10.3390/ijms232314937>

- Kulkarni, A. A., Loddo, M., Leo, E., Rashid, M., Eward, K. L., Fanshawe, T. R., Butcher, J., Frost, A., Ledermann, J. A., Williams, G. H., & Stoeber, K. (2007). DNA replication licensing factors and aurora kinases are linked to aneuploidy and clinical outcome in epithelial ovarian carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(20), 6153–6161. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0671>

- Kurokawa, C., Geekiyange, H., Allen, C., Iankov, I., Schroeder, M., Carlson, B., Bakken, K., Sarkaria, J., Ecsedy, J. A., D'Assoro, A., Friday, B., & Galanis, E. (2017). Alisertib demonstrates significant antitumor activity in bevacizumab resistant, patient derived orthotopic models of

- glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 131(1), 41–48.
<https://doi.org/10.1007/s11060-016-2285-8>
- Kuroki, L., & Guntupalli, S. R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ (Clinical research ed.)*, 371, m3773.
<https://doi.org/10.1136/bmj.m3773>
 - Landen, C. N., Jr, Lin, Y. G., Immaneni, A., Deavers, M. T., Merritt, W. M., Spannuth, W. A., Bodurka, D. C., Gershenson, D. M., Brinkley, W. R., & Sood, A. K. (2007). Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(14), 4098–4104.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0431>
 - Lassmann, S., Shen, Y., Jütting, U., Wiehle, P., Walch, A., Gitsch, G., Hasenburg, A., & Werner, M. (2007). Predictive value of Aurora-A/STK15 expression for late-stage epithelial ovarian cancer patients treated by adjuvant chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(14), 4083–4091. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2775>
 - Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., Matei, D., Macpherson, E., Watkins, C., Carmichael, J., & Matulonis, U. (2012). Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *The New England journal of medicine*, 366(15), 1382–1392.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105535>
 - Ledford, L. R. C., & Lockwood, S. (2019). Scope and Epidemiology of Gynecologic Cancers: An Overview. *Seminars in oncology nursing*, 35(2), 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.03.002>

- Lheureux, S., Braunstein, M., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(4), 280–304. <https://doi.org/10.3322/caac.21559>
- Lheureux, S., Oaknin, A., Garg, S., Bruce, J. P., Madariaga, A., Dhani, N. C., Bowering, V., White, J., Accardi, S., Tan, Q., Braunstein, M., Karakasis, K., Cirlan, I., Pedersen, S., Li, T., Fariñas-Madrid, L., Lee, Y. C., Liu, Z. A., Pugh, T. J., & Oza, A. M. (2020). EVOLVE: A Multicenter Open-Label Single-Arm Clinical and Translational Phase II Trial of Cediranib Plus Olaparib for Ovarian Cancer after PARP Inhibition Progression. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(16), 4206–4215. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-4121>
- Li, D., Zhu, J., Firozi, P. F., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Cleary, K., Friess, H., & Sen, S. (2003). Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(3), 991–997.
- Li, L., Song, Y., Liu, Q., Liu, X., Wang, R., Kang, C., & Zhang, Q. (2018). Low expression of PTEN is essential for maintenance of a malignant state in human gastric adenocarcinoma via upregulation of p-AURKA mediated by activation of AURKA. *International journal of molecular medicine*, 41(6), 3629–3641. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3544>
- Li, Y., Zhou, W., Tang, K., Chen, X., Feng, Z., & Chen, J. (2017). Silencing Aurora A leads to re-sensitization of breast cancer cells to Taxol

through downregulation of SRC-mediated ERK and mTOR pathways. *Oncology reports*, 38(4), 2011–2022.

<https://doi.org/10.3892/or.2017.5908>

- Liao, Y., Liao, Y., Li, J., Li, J., Fan, Y., & Xu, B. (2018). Polymorphisms in AURKA and AURKB are associated with the survival of triple-negative breast cancer patients treated with taxane-based adjuvant chemotherapy. *Cancer management and research*, 10, 3801–3808.

<https://doi.org/10.2147/CMAR.S174735>

- Lin, Y., Richards, F. M., Krippendorff, B. F., Bramhall, J. L., Harrington, J. A., Bapiro, T. E., Robertson, A., Zheleva, D., & Jodrell, D. I. (2012). Paclitaxel and CYC3, an aurora kinase A inhibitor, synergise in pancreatic cancer cells but not bone marrow precursor cells. *British journal of cancer*, 107(10), 1692–1701.

<https://doi.org/10.1038/bjc.2012.450>

- Liu, Y., Hawkins, O. E., Su, Y., Vilgelm, A. E., Sobolik, T., Thu, Y. M., Kantrow, S., Splittergerber, R. C., Short, S., Amiri, K. I., Ecsedy, J. A., Sosman, J. A., Kelley, M. C., & Richmond, A. (2013). Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF-κB impairs this drug-induced senescence. *EMBO molecular medicine*, 5(1), 149–166. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201378>

- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6330), 1152–1158. <https://doi.org/10.1126/science.aam7344>

- Machida, H., Tokunaga, H., Matsuo, K., Matsumura, N., Kobayashi, Y., Tabata, T., Kaneuchi, M., Nagase, S., & Mikami, M. (2020). Survival outcome and perioperative complication related to neoadjuvant chemotherapy with carboplatin and paclitaxel for advanced ovarian

cancer: A systematic review and meta-analysis. European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, 46(5), 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.11.520>

- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complements of the human genome. *Science* (New York, N.Y.), 298(5600), 1912–1934.

<https://doi.org/10.1126/science.1075762>

- Margenthaler, J. A., & Ollila, D. W. (2016). Breast Conservation Therapy Versus Mastectomy: Shared Decision-Making Strategies and Overcoming Decisional Conflicts in Your Patients. *Annals of surgical oncology*, 23(10), 3133–3137. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5369-y>

- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., & Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(51), 51786–51795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306275200>

- Marumoto, T., Zhang, D., & Saya, H. (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nature reviews. Cancer*, 5(1), 42–50. <https://doi.org/10.1038/nrc1526>

- Matulonis, U. A., Sharma, S., Ghamande, S., Gordon, M. S., Del Prete, S. A., Ray-Coquard, I., Kutarska, E., Liu, H., Fingert, H., Zhou, X., Danaee, H., & Schilder, R. J. (2012). Phase II study of MLN8237 (alisertib), an investigational Aurora A kinase inhibitor, in patients with platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian, fallopian tube, or primary

- peritoneal carcinoma. *Gynecologic oncology*, 127(1), 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.06.040>
- McLaughlin S. A. (2013). Surgical management of the breast: breast conservation therapy and mastectomy. *The Surgical clinics of North America*, 93(2), 411–428.
<https://doi.org/10.1016/j.suc.2012.12.006>
- McMullen, M., Karakasis, K., Madariaga, A., & Oza, A. M. (2020). Overcoming Platinum and PARP-Inhibitor Resistance in Ovarian Cancer. *Cancers*, 12(6), 1607. <https://doi.org/10.3390/cancers12061607>
- Melichar, B., Adenis, A., Lockhart, A. C., Bennouna, J., Dees, E. C., Kayaleh, O., Obermannova, R., DeMichele, A., Zatloukal, P., Zhang, B., Ullmann, C. D., & Schusterbauer, C. (2015). Safety and activity of alisertib, an investigational aurora kinase A inhibitor, in patients with breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, head and neck squamous-cell carcinoma, and gastro-oesophageal adenocarcinoma: a five-arm phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 16(4), 395–405.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70051-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70051-3)
- Mendiola, M., Barriuso, J., Mariño-Enríquez, A., Redondo, A., Domínguez-Cáceres, A., Hernández-Cortés, G., Pérez-Fernández, E., Sánchez-Navarro, I., Vara, J. A., Suárez, A., Espinosa, E., González-Barón, M., Palacios, J., & Hardisson, D. (2009). Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Human pathology*, 40(5), 631–638.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.10.011>
- Meraldi, P., Honda, R., & Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *The EMBO journal*, 21(4), 483–492.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.483>

- Min, M., Mayor, U., & Lindon, C. (2013). Ubiquitination site preferences in anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) substrates. *Open biology*, 3(9), 130097. <https://doi.org/10.1098/rsob.130097>
- Mirza, M. R., Åvall Lundqvist, E., Birrer, M. J., dePont Christensen, R., Nyvang, G. B., Malander, S., Anttila, M., Werner, T. L., Lund, B., Lindahl, G., Hietanen, S., Peen, U., Dimoula, M., Roed, H., Ør Knudsen, A., Staff, S., Krog Vistisen, A., Bjørge, L., Mäenpää, J. U., & AVANOVA investigators (2019). Niraparib plus bevacizumab versus niraparib alone for platinum-sensitive recurrent ovarian cancer (NSGO-AVANOVA2/ENGOT-ov24): a randomised, phase 2, superiority trial. *The Lancet. Oncology*, 20(10), 1409–1419. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30515-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30515-7)
- Miyoshi, Y., Iwao, K., Egawa, C., & Noguchi, S. (2001). Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *International journal of cancer*, 92(3), 370–373. <https://doi.org/10.1002/ijc.1200>
- Mossé, Y. P., Lipsitz, E., Fox, E., Teachey, D. T., Maris, J. M., Weigel, B., Adamson, P. C., Ingle, M. A., Ahern, C. H., & Blaney, S. M. (2012). Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of MLN8237, an investigational oral selective small-molecule inhibitor of Aurora kinase A: a Children's Oncology Group Phase I Consortium study. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(21), 6058–6064. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3251>
- Murai, J., Feng, Y., Yu, G. K., Ru, Y., Tang, S. W., Shen, Y., & Pommier, Y. (2016). Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation

- can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget*, 7(47), 76534–76550. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12266>
- Murata-Hori, M., & Wang, Y. L. (2002). The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Current biology: CB*, 12(11), 894–899. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00848-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00848-5)
 - Nair, J. S., Ho, A. L., & Schwartz, G. K. (2012). The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(4), 807–817. <https://doi.org/10.4161/cc.11.4.19323>
 - Nakai, H., & Matsumura, N. (2022). The roles and limitations of bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *International journal of clinical oncology*, 27(7), 1120–1126. <https://doi.org/10.1007/s10147-022-02169-x>
 - Norquist, B., Wurz, K. A., Pennil, C. C., Garcia, R., Gross, J., Sakai, W., Karlan, B. Y., Taniguchi, T., & Swisher, E. M. (2011). Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(22), 3008–3015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.2980>
 - O'Connor, O. A., Özcan, M., Jacobsen, E. D., Roncero, J. M., Trotman, J., Demeter, J., Masszi, T., Pereira, J., Ramchandren, R., Beaven, A., Caballero, D., Horwitz, S. M., Lennard, A., Turgut, M., Hamerschlak, N., d'Amore, F. A., Foss, F., Kim, W. S., Leonard, J. P., Zinzani, P. L., ... Lumiere Study Investigators (2019). Randomized Phase III Study of Alisertib or Investigator's Choice (Selected Single Agent) in Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology*:

- official journal of the American Society of Clinical Oncology, 37(8), 613–623. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00899>
- Okuma, H. S., & Yonemori, K. (2017). BRCA Gene Mutations and Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1026, 271–286. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6020-5_13
 - Pérez Fidalgo, J. A., Roda, D., Roselló, S., Rodríguez-Braun, E., & Cervantes, A. (2009). Aurora kinase inhibitors: a new class of drugs targeting the regulatory mitotic system. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 11(12), 787–798. <https://doi.org/10.1007/s12094-009-0447-2>
 - Perren, T. J., Swart, A. M., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M. S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., du Bois, A., Sehouli, J., Kimmig, R., Stähle, A., Collinson, F., Essapen, S., Gourley, C., Lortholary, A., Selle, F., Mirza, M. R., ... ICON7 Investigators (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *The New England journal of medicine*, 365(26), 2484–2496. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103799>
 - Pignata, S., Scambia, G., Ferrandina, G., Savarese, A., Sorio, R., Breda, E., Gebbia, V., Musso, P., Frigerio, L., Del Médico, P., Lombardi, A. V., Febbraro, A., Scollo, P., Ferro, A., Tamperi, S., Brandes, A., Ravaioli, A., Valerio, M. R., Aitini, E., Natale, D., ... Perrone, F. (2011). Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: the MITO-2 randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(32), 4131–4138. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.45.10000>

- the American Society of Clinical Oncology, 29(27), 3628–3635.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.8566>
- Pishvaian, M. J., Biankin, A. V., Bailey, P., Chang, D. K., Laheru, D., Wolfgang, C. L., & Brody, J. R. (2017). BRCA2 secondary mutation-mediated resistance to platinum and PARP inhibitor-based therapy in pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 116(8), 1021–1026.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2017.40>
- Pitts, T. M., Bradshaw-Pierce, E. L., Bagby, S. M., Hyatt, S. L., Selby, H. M., Spreafico, A., Tentler, J. J., McPhillips, K., Klauck, P. J., Capasso, A., Diamond, J. R., Davis, S. L., Tan, A. C., Arcaroli, J. J., Purkey, A., Messersmith, W. A., Ecsedy, J. A., & Eckhardt, S. G. (2016). Antitumor activity of the aurora a selective kinase inhibitor, alisertib, against preclinical models of colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(31), 50290–50301.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10366>
- Plevritis, S. K., Munoz, D., Kurian, A. W., Stout, N. K., Alagoz, O., Near, A. M., Lee, S. J., van den Broek, J. J., Huang, X., Schechter, C. B., Sprague, B. L., Song, J., de Koning, H. J., Trentham-Dietz, A., van Ravesteyn, N. T., Gangnon, R., Chandler, Y., Li, Y., Xu, C., Ergun, M. A., ... Mandelblatt, J. S. (2018). Association of Screening and Treatment with Breast Cancer Mortality by Molecular Subtype in US Women, 2000–2012. *JAMA*, 319(2), 154–164. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.19130>
- Pujade-Lauraine, E., Ledermann, J. A., Selle, F., Gebski, V., Penson, R. T., Oza, A. M., Korach, J., Huzarski, T., Poveda, A., Pignata, S., Friedlander, M., Colombo, N., Harter, P., Fujiwara, K., Ray-Coquard, I., Banerjee, S., Liu, J., Lowe, E. S., Bloomfield, R., Pautier, P., ... SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators (2017). Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed

ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 18(9), 1274–1284. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30469-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30469-2)

- Pusztai, L., Yau, C., Wolf, D. M., Han, H. S., Du, L., Wallace, A. M., String-Reasor, E., Boughey, J. C., Chien, A. J., Elias, A. D., Beckwith, H., Nanda, R., Albain, K. S., Clark, A. S., Kemmer, K., Kalinsky, K., Isaacs, C., Thomas, A., Shatsky, R., Helsten, T. L., ... Esserman, L. J. (2021). Durvalumab with olaparib and paclitaxel for high-risk HER2-negative stage II/III breast cancer: Results from the adaptively randomized I-SPY2 trial. *Cancer cell*, 39(7), 989–998.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.05.009>

- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews*, 33(1), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>

- Roh, M. H., Yassin, Y., Miron, A., Mehra, K. K., Mehrad, M., Monte, N. M., Mutter, G. L., Nucci, M. R., Ning, G., McKeon, F. D., Hirsch, M. S., Wa, X., & Crum, C. P. (2010). High-grade fimbrial-ovarian carcinomas are unified by altered p53, PTEN and PAX2 expression. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(10), 1316–1324. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.119>

- Sak, M., Zumbar, C. T., King, P. D., Li, X., Mifsud, C. S., Usualieva, A., Anderson, C. D., Chesnick, H. M., McElroy, J. P., Chakravarti, A., Burton, E. C., & Lehman, N. L. (2019). Cytotoxic synergy between alisertib and carboplatin versus alisertib and irinotecan are inversely dependent on

- MGMT levels in glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology*, 143(2), 231–240. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03164-5>
- Sakai, W., Swisher, E. M., Jacquemont, C., Chandramohan, K. V., Couch, F. J., Langdon, S. P., Wurz, K., Higgins, J., Villegas, E., & Taniguchi, T. (2009). Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma. *Cancer research*, 69(16), 6381–6386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1178>
 - Sakai, W., Swisher, E. M., Karlan, B. Y., Agarwal, M. K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D. J., Couch, F. J., Urban, N., & Taniguchi, T. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182), 1116–1120. <https://doi.org/10.1038/nature06633>
 - Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Shimomura, K., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T., & Yamagishi, H. (2001). Tumour-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *British journal of cancer*, 84(6), 824–831. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1684>
 - Sambasivan S. (2022). Epithelial ovarian cancer: Review article. *Cancer treatment and research communications*, 33, 100629. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100629>
 - Sasai, K., Katayama, H., Stenoien, D. L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E. A., Earnshaw, W. C., Brinkley, W. R., & Sen, S. (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in

- mitotic cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 59(4), 249–263. <https://doi.org/10.1002/cm.20039>
- Schultz, K. A., Harris, A. K., Schneider, D. T., Young, R. H., Brown, J., Gershenson, D. M., Dehner, L. P., Hill, D. A., Messinger, Y. H., & Frazier, A. L. (2016). Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors. *Journal of oncology practice*, 12(10), 940–946. <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.016261>
 - Seeling, J. M., Farmer, A. A., Mansfield, A., Cho, H., & Choudhary, M. (2017). Differential Selective Pressures Experienced by the Aurora Kinase Gene Family. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.3390/ijms19010072>
 - Sehdev, V., Peng, D., Soutto, M., Washington, M. K., Revetta, F., Ecsedy, J., Zaika, A., Rau, T. T., Schneider-Stock, R., Belkhiri, A., & El-Rifai, W. (2012). The aurora kinase A inhibitor MLN8237 enhances cisplatin-induced cell death in esophageal adenocarcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 11(3), 763–774. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0623>
 - Shao, Y., Li, H., Wu, Y., Wang, X., Meng, J., Hu, Z., Xia, L., Cao, S., Tian, W., Zhang, Y., Feng, X., Zhang, X., Li, Y., & Yang, G. (2023). The feedback loop of AURKA/DDX5/TMEM147-AS1/let-7 drives lipophagy to induce cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Cancer letters*, 565, 216241. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216241>
 - Shaw, P. A., Rouzbahman, M., Pizer, E. S., Pintilie, M., & Begley, H. (2009). Candidate serous cancer precursors in fallopian tube epithelium of BRCA1/2 mutation carriers. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(9), 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.89>

- Shih, I. M., Wang, Y., & Wang, T. L. (2021). The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *The American journal of pathology*, 191(1), 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.006>
- Shionome, Y., Lin, W. H., Shiao, H. Y., Hsieh, H. P., Hsu, J. T., & Ouchi, T. (2013). A novel aurora-A inhibitor, BPR1K0609S1, sensitizes colorectal tumor cells to 5-fluorofracil (5-FU) treatment. *International journal of biological sciences*, 9(4), 403–411. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5806>
- Siddiqi, T., Frankel, P., Beumer, J. H., Kiesel, B. F., Christner, S., Ruel, C., Song, J. Y., Chen, R., Kelly, K. R., Alilawadhi, S., Kaesberg, P., Popplewell, L., Puverel, S., Piekarz, R., Forman, S. J., & Newman, E. M. (2020). Phase 1 study of the Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) combined with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in lymphoid malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 61(2), 309–317. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1672052>
- Slatnik, C. L., & Duff, E. (2015). Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *The Nurse practitioner*, 40(9), 47–54. <https://doi.org/10.1097/01.NPR.0000450742.00077.a2>
- Song, A., Andrews, D. W., Werner-Wasik, M., Kim, L., Glass, J., Bar-Ad, V., Evans, J. J., Farrell, C. J., Judy, K. D., Daskalakis, C., Zhan, T., & Shi, W. (2019). Phase I trial of alisertib with concurrent fractionated stereotactic re-irradiation for recurrent high-grade gliomas. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 132, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.12.019>
- Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H. A., Jr, & Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant

- setting. *Nature reviews. Clinical oncology*, 12(1), 27–41.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.163>
- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in oncology nursing*, 35(2), 151–156.
<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
- Sun, H., Wang, H., Wang, X., Aoki, Y., Wang, X., Yang, Y., Cheng, X., Wang, Z., & Wang, X. (2020). Aurora-A/SOX8/FOKK1 signaling axis promotes chemoresistance via suppression of cell senescence and induction of glucose metabolism in ovarian cancer organoids and cells. *Theranostics*, 10(15), 6928–6945.
<https://doi.org/10.7150/thno.43811>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tang, A., Gao, K., Chu, L., Zhang, R., Yang, J., & Zheng, J. (2017). Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. *Oncotarget*, 8(14), 23937–23954. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14893>
- Taylor, S. S., & Kornev, A. P. (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in biochemical sciences*, 36(2), 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>
- Tsai, M. Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., & Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nature cell biology*, 5(3), 242–248. <https://doi.org/10.1038/ncb936>

- Tschernichovsky, R., & Goodman, A. (2017). Risk-Reducing Strategies for Ovarian Cancer in BRCA Mutation Carriers: A Balancing Act. *The oncologist*, 22(4), 450–459.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0444>
- Venkataraman, S., Alimova, I., Tello, T., Harris, P. S., Knipstein, J. A., Donson, A. M., Foreman, N. K., Liu, A. K., & Vibhakar, R. (2012). Targeting Aurora Kinase A enhances radiation sensitivity of atypical teratoid rhabdoid tumor cells. *Journal of neuro-oncology*, 107(3), 517–526. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0795-y>
- Vergote, I., Coens, C., Nankivell, M., Kristensen, G. B., Parmar, M. K. B., Ehlen, T., Jayson, G. C., Johnson, N., Swart, A. M., Verheijen, R., McCluggage, W. G., Perren, T., Panici, P. B., Kenter, G., Casado, A., Mendiola, C., Stuart, G., Reed, N. S., Kehoe, S., EORTC, ... MRC CHORUS study investigators (2018). Neoadjuvant chemotherapy versus debulking surgery in advanced tubo-ovarian cancers: pooled analysis of individual patient data from the EORTC 55971 and CHORUS trials. *The Lancet. Oncology*, 19(12), 1680–1687. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30566-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30566-7)
- Vilgelm, A. E., Pawlikowski, J. S., Liu, Y., Hawkins, O. E., Davis, T. A., Smith, J., Weller, K. P., Horton, L. W., McClain, C. M., Ayers, G. D., Turner, D. C., Essaka, D. C., Stewart, C. F., Sosman, J. A., Kelley, M. C., Ecsedy, J. A., Johnston, J. N., & Richmond, A. (2015). Mdm2 and aurora kinase a inhibitors synergize to block melanoma growth by driving apoptosis and immune clearance of tumor cells. *Cancer research*, 75(1), 181–193. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2405>
- Vinayak, S., Tolaney, S. M., Schwartzberg, L., Mita, M., McCann, G., Tan, A. R., Wahner-Hendrickson, A. E., Forero, A., Anders, C., Wulf, G.

- M., Dillon, P., Lynce, F., Zarwan, C., Erban, J. K., Zhou, Y., Buerstatte, N., Graham, J. R., Arora, S., Dezube, B. J., & Telli, M. L. (2019). Open-label Clinical Trial of Niraparib Combined with Pembrolizumab for Treatment of Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA oncology*, 5(8), 1132–1140.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1029>
- Walker, J. L., Powell, C. B., Chen, L. M., Carter, J., Bae Jump, V. L., Parker, L. P., Borowsky, M. E., & Gibb, R. K. (2015). Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer*, 121(13), 2108–2120. <https://doi.org/10.1002/cncr.29321>
 - Wallis, B., Bowman, K. R., Lu, P., & Lim, C. S. (2023). The Challenges and Prospects of p53-Based Therapies in Ovarian Cancer. *Biomolecules*, 13(1), 159.
<https://doi.org/10.3390/biom13010159>
 - Walter, A. O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., & Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*, 19(42), 4906–4916.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203847>
 - Whicker, M. E., Lin, Z. P., Hanna, R., Sartorelli, A. C., & Ratner, E. S. (2016). MK-2206 sensitizes BRCA-deficient epithelial ovarian adenocarcinoma to cisplatin and olaparib. *BMC cancer*, 16, 550.
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2598-1>
 - Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P. N., & Rogister, B. (2018). The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell division*, 13, 7.
<https://doi.org/10.1186/s13008-018-0040-6>

- Won, K. A., & Spruck, C. (2020). Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *International journal of oncology*, 57(6), 1245–1261. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>
- Wright, A. A., Bohlke, K., Armstrong, D. K., Bookman, M. A., Cliby, W. A., Coleman, R. L., Dizon, D. S., Kash, J. J., Meyer, L. A., Moore, K. N., Olawaiye, A. B., Oldham, J., Salani, R., Sparacio, D., Tew, W. P., Vergote, I., & Edelson, M. I. (2016). Neoadjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed, Advanced Ovarian Cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(28), 3460–3473. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.6907>
- Xu, J., Wu, X., Zhou, W. H., Liu, A. W., Wu, J. B., Deng, J. Y., Yue, C. F., Yang, S. B., Wang, J., Yuan, Z. Y., & Liu, Q. (2013). Aurora-A identifies early recurrence and poor prognosis and promises a potential therapeutic target in triple negative breast cancer. *PloS one*, 8(2), e56919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056919>
- Yang, D. H., Smith, E. R., Cohen, C., Wu, H., Patriotis, C., Godwin, A. K., Hamilton, T. C., & Xu, X. X. (2002). Molecular events associated with dysplastic morphologic transformation and initiation of ovarian tumorigenicity. *Cancer*, 94(9), 2380–2392. <https://doi.org/10.1002/cncr.10497>
- Yang, G., Chang, B., Yang, F., Guo, X., Cai, K. Q., Xiao, X. S., Wang, H., Sen, S., Hung, M. C., Mills, G. B., Chang, S., Multani, A. S., Mercado-Uribe, I., & Liu, J. (2010). Aurora kinase A promotes ovarian tumorigenesis through dysregulation of the cell cycle and suppression of BRCA2. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(24), 5937–5946. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0081>

- Research, 16(12), 3171–3181. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3171>
- Yang, H., Ou, C. C., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Kruk, P. A., & Cheng, J. Q. (2004). Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. *Cancer research*, 64(2), 463–467. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2907>
 - Yang, Y., Ding, L., Zhou, Q., Fen, L., Cao, Y., Sun, J., Zhou, X., & Liu, A. (2020). Silencing of AURKA augments the antitumor efficacy of the AURKA inhibitor MLN8237 on neuroblastoma cells. *Cancer cell international*, 20, 9. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1072-y>
 - Zeitlin, S. G., Shelby, R. D., & Sullivan, K. F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 155(7), 1147–1157. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108125>
 - Zhang, D., Hirota, T., Marumoto, T., Shimizu, M., Kunitoku, N., Sasayama, T., Arima, Y., Feng, L., Suzuki, M., Takeya, M., & Saya, H. (2004). Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene*, 23(54), 8720–8730. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208153>
 - Zhou, N., Singh, K., Mir, M. C., Parker, Y., Lindner, D., Dreicer, R., Ecsedy, J. A., Zhang, Z., Teh, B. T., Almasan, A., & Hansel, D. E. (2013). The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(16), 4260–4269. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2700>

Bibliografía

American Association for Cancer Research, 19(7), 1717–1728.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2383>

- Zullo, K. M., Guo, Y., Cooke, L., Jirau-Serrano, X., Mangone, M., Scotto, L., Amengual, J. E., Mao, Y., Nandakumar, R., Cremers, S., Duong, J., Mahadevan, D., & O'Connor, O. A. (2015). Aurora A Kinase Inhibition Selectively Synergizes with Histone Deacetylase Inhibitor through Cytokinesis Failure in T-cell Lymphoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(18), 4097–4109. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0033>

7. ANEXOS.

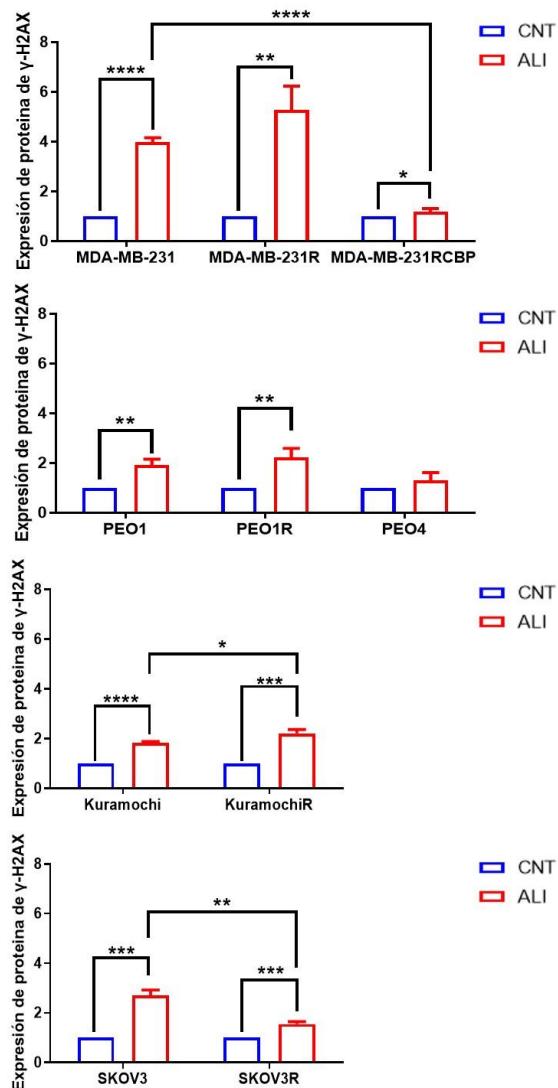


Figura S1: Cuantificación de las bandas de Western Blot de la Figura 21. Determinación de la intensidad relativa de la banda de γ-H2AX antes (CNT) y después (ALI) del tratamiento con la IC₅₀ de ALI correspondiente a las líneas celulares parentales durante 72 horas, en todas las líneas celulares utilizadas. Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en el CNT y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** p < 0.0001.

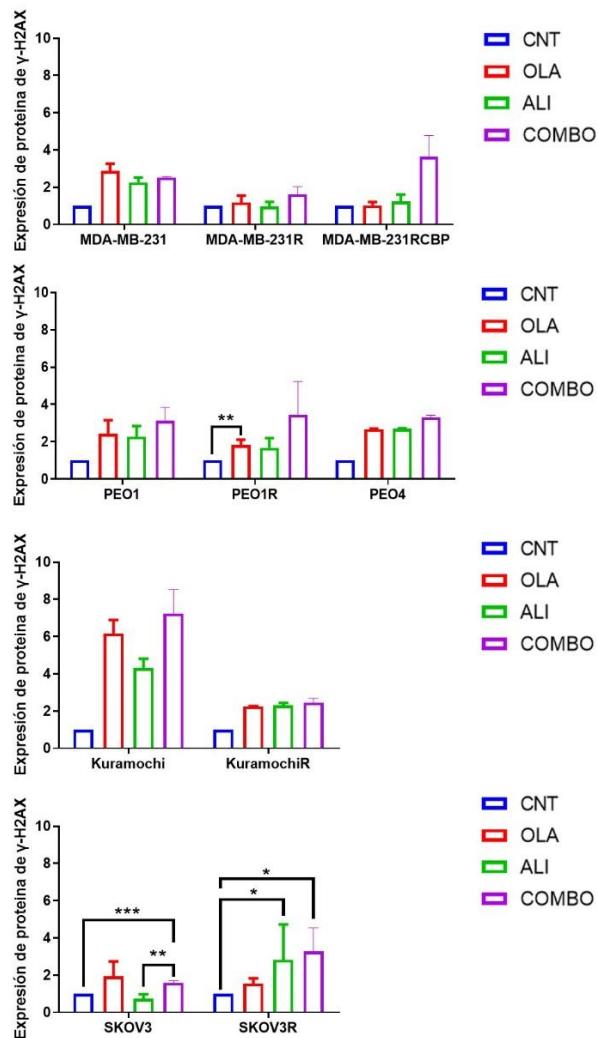


Figura S2: Cuantificación de las bandas de Western Blot de la Figura 27. Determinación de la intensidad relativa de la banda de γ-H2AX sin tratamiento (CNT), tras el tratamiento durante 72 horas con la IC50 para OLA (OLA), tras el tratamiento durante 72 horas con la IC50 para ALI (ALI) y tras el tratamiento durante 72 horas con la IC50 para OLA y ALI combinadas (COMBO), durante 72 horas, en todas las líneas celulares utilizadas. Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en el CNT y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

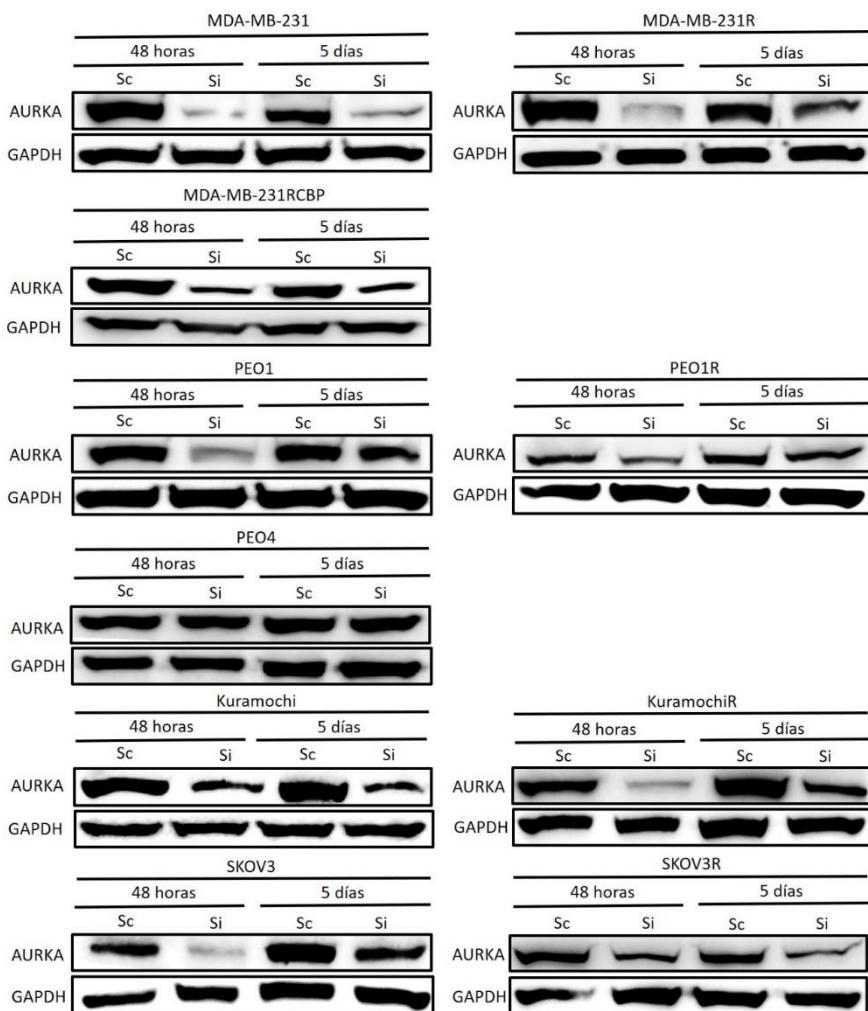


Figura S3: Análisis de la expresión proteica de AURKA en las líneas celulares de COAG y CMTN parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. Análisis mediante Western Blot de la expresión proteica de AURKA en todas las líneas celulares tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc) a las 48 horas y 5 días después de la transfección.

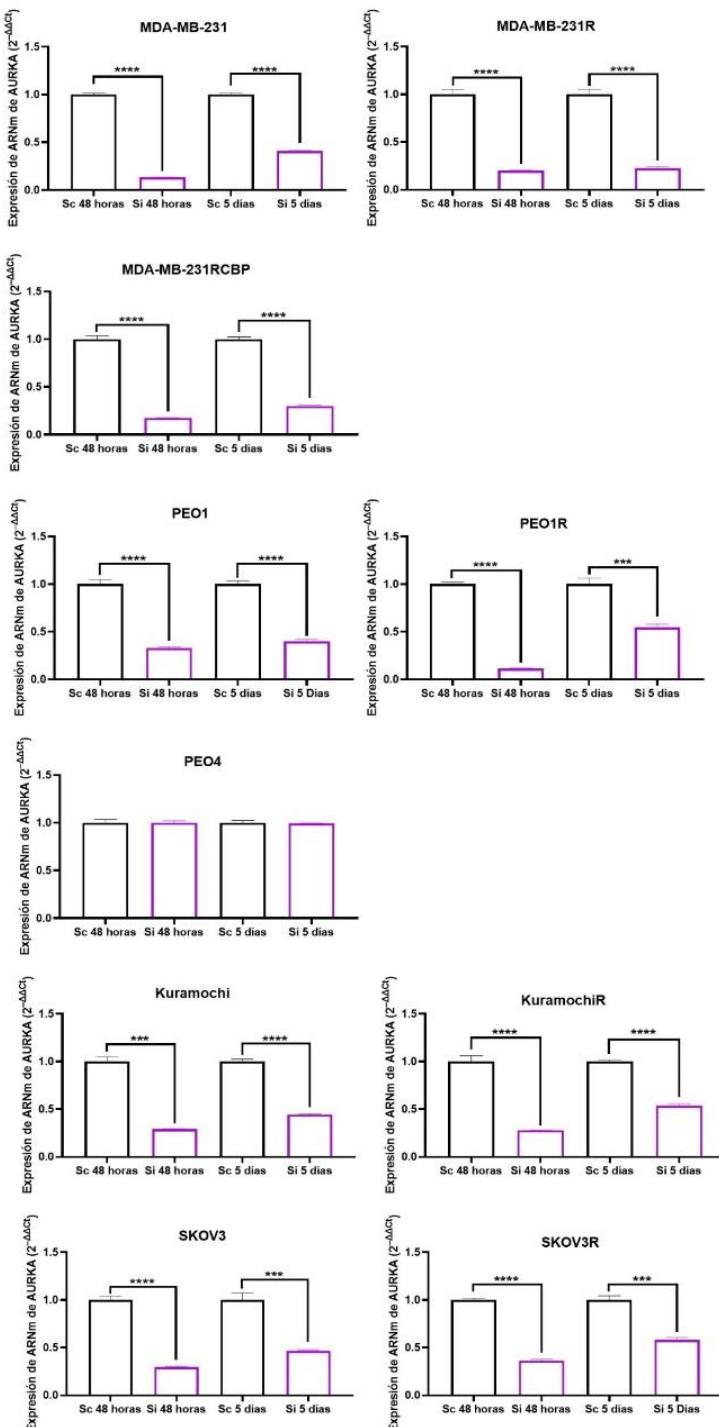


Figura S4: Análisis de la expresión de ARNm de AURKA en las líneas celulares de COAG y CMTN parentales y resistentes a OLA y CBP, respectivamente. La expresión de AURKA fue analizada mediante RT-qPCR en todas las líneas celulares tras el silenciamiento de AURKA (Si) y sin silenciamiento de AURKA (Sc) a las 48 horas y 5 días después de la transfección. Todos los valores de expresión están normalizados en base a la expresión en el CNT y se representan como la media ± DS. Se utilizó una prueba T-Student para el análisis estadístico. *** P < 0.001, **** p < 0.0001.