



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del silenciamiento de MAPK3 sobre la
viabilidad en líneas celulares de cáncer de
páncreas CFPAC y HPAF II

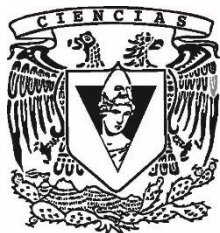
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Azalea Libertad Rivera Valdenegro



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ela Alcántara Flores
CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Rivera
Valdenegro
Azalea Libertad
55 30 38 79 53
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311334306

2. Datos del tutor
Dra
Ela
Alcántara
Flores
3. Datos del sinodal 1
Dr
Pérez
Carreón
Julio Isael
4. Datos del sinodal 2
Dr
Alcántara
Sánchez
Felipe
5. Datos del sinodal 3
Dra
Cancino
Rodenzo
María de los Ángeles
6. Datos del sinodal 4
Dra
Lizárraga
Sánchez
Florida Josefina
7. Datos del trabajo escrito
Efecto del silenciamiento de MAPK3
sobre la viabilidad en las líneas celulares
de cáncer de páncreas de CFPAC y HPAF II
77 p
2019



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer a cargo del Dr. Jorge Meléndez Zajgla en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de la Dra. Ela Alcántara Flores.

*A mis padres por todo su cariño y apoyo
que me ayudaron a llegar muy lejos.*

*“No lo intentes. Hazlo, o no lo hagas, pero no lo
intentas.” (Yoda a Luke Skywalker. STAR WARS,
episodio V, El Imperio Contrataca).*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por permitirme formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio y la atención que tuvo en todo momento.

A la Dra. Ela Alcántara Flores, por permitirme ser su alumna de licenciatura, por todo el apoyo que me ha brindado, la paciencia que ha tenido, y todos los consejos que me ha dado tanto de manera académica como para la vida.

Al Dr. Javier Gaytán por compartirme todos sus conocimientos sobre las practicas experimentales durante mis primeros meses en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer y por siempre apoyarme en momentos tanto buenos como malos.

Al cuerpo Académico de la Facultad de Ciencias, porque a través del conocimiento que me brindaron, me dieron las suficientes herramientas para mi formación académica y profesional.

A mi mamá, porque siempre me ha sabido escuchar y apoyar en momentos clave de mi vida y por decirme que puedo lograr todo lo que me proponga.

A mi papá por darme la oportunidad de seguir estudiando, por apoyarme siempre en mi formación académica y por mostrarme que nunca es tarde para alcanzar tus metas.

A mi hermano Misael por siempre darme consejos, por preocuparse por mí, y darme momentos muy felices a lo largo de mi vida, además de motivarme cada día para ser mejor.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, Marisol, Karla, Jessica, por compartir muchas experiencias tanto buenas como malas, por siempre escucharme y brindarme su hombro en momentos muy difíciles. A mi amigo Alejandro Luna por siempre estar ahí cuando más lo necesite, por las risas que compartimos y por su apoyo incondicional.

A mis amigos de laboratorio, Alejandro, Alejandra, Benjamín, Ixchel, por todas las experiencias que hemos pasado, por las risas, por todo su apoyo que me han dado en momentos que yo sentía perdidos y ayudarme a salir adelante.

A mi amiga Samantha por ser mi compañera de baile y compartir experiencias muy agradables, por siempre apoyarme y darme ánimos.

Al halau Ka Maka Ahi O Pele por brindarme una perspectiva más amplia de la vida y ser mejor persona cada día, además de enseñarme valores como la lealtad, perseverancia y lo que significa tener una Ohana.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque me abrió las puertas al conocimiento, las cuales permitieron que me desarrollara tanto académicamente y culturalmente. Pero sobre todo porque me enseñó que "*por mi raza hablara el espíritu*".

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. CÁNCER.....	2
1.1. Desarrollo tumoral.....	5
1.2. Epidemiología.....	6
2. Biología del Páncreas.....	8
3. Cáncer de páncreas.....	11
3.1. Tipos de cáncer de páncreas.....	11
3.2. Factores de riesgo para el cáncer de páncreas.....	12
3.3. Biología molecular del cáncer de páncreas.....	14
4. Tratamientos para cáncer de páncreas.....	15
4.1. Quimioterapia.....	16
5. Gemcitabina.....	17
5.1. Mecanismo de acción.....	17
5.2. Quimioresistencia a gemcitabina.....	21
III. ANTECEDENTES	23
1. Función de las cinasas.....	23
2. Familia de las MAPK.....	24
2.1. MAPK3.....	25
3. Silenciamiento de genes.....	26
3.1 Short Hairpin RNA.....	26
3.2 Proceso celular de los shRNA.....	27
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. HIPÓTESIS	31
VI. OBJETIVOS	32
1. Objetivo general.....	32
2. Objetivos específicos.....	32
VII. METODOLOGÍA	33
Esquema del flujo de trabajo.....	33

Cultivo celular	34
Diseño de Short Hairpin RNA.....	34
Clonación dirigida del shRNA MAPK3 en el vector pSIREN-Retro Q	35
Purificación del vector	36
Clonación dirigida del shRNA MAPK3 en el vector pSIREN-RETRO Q	37
Transformación de bacterias DH5 α	37
Extracción de ADN plasmídico por Miniprep	38
Extracción de ADN plasmídico por Midiprep	39
Transfección de células CFPAC y HPAF II con Xfect™	40
Obtención de líneas estables.....	40
Extracción de RNA por el método de trizol	41
Síntesis de ADN complementario.....	41
Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	42
Determinación de la viabilidad celular mediante reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en células CFPAC y HPAF-II.....	44
VIII. RESULTADOS	46
Corte del plásmido pSIREN-retro Q con enzimas de restricción BamH I y EcoR I.....	46
Ligación del vector pSIREN-RETRO Q.....	47
Transformación de bacterias DH5 α	47
Extracción de plásmido.....	48
Digestión con Mlu I	49
Secuenciación	50
Estandarización del RT-PCR para MAPK3	50
Expresión del RNA mensajero	51
Viabilidad celular	53
IX. DISCUSIÓN.....	60
X. CONCLUSIONES.....	63
XI. PERSPECTIVAS	64
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Marcadores clave para la caracterización del cáncer	2
Figura 2 Desarrollo tumoral del Cáncer	5
Figura 3 Incidencia mundial del cáncer.....	6
Figura 4 Muertes estimadas por cáncer a nivel mundial.....	6
Figura 5 Muertes estimadas por cáncer en México.....	7
Figura 6 Anatomía del páncreas	8
Figura 7 Componente exocrino del páncreas.....	9
Figura 8 Islote de Langerhans	10
Figura 9 Compuestos análogos de gemcitabina.....	18
Figura 10 Mecanismo de acción de la gemcitabina.....	19
Figura 11 Terminación de la cadena enmascarada.....	20
Figura 12 Estructura de un shRNA.....	27
Figura 13 Procesamiento de shRNA	29
Figura 14 Líneas celulares.....	34
Figura 15 Secuencias de los oligos Top y Botton.....	35
Figura 16 Digestión enzimática con BAMH I y EcoR I.....	46
Figura 17 Ligación del plásmido pSIREN -RETRO Q con el shRNA MAPK3.....	47
Figura 18 Placas de Lb con ampicilina.....	48
Figura 19 Digestión del plásmido con la enzima de restricción MLU-I.....	49
Figura 20 Secuenciación del shRNA-MAPK3 insertado en el vector pSIREN-RETRO Q.....	50
Figura 21 Estandarización de MAPK3.....	51
Figura 22 Expresión de MAPK3 en CFPAC-1	52
Figura 23 Expresión de MAPK3 en HPAF II	53
Figura 24 Viabilidad celular en CFPAC tratadas con gemcitabina a 1000 μ M....	54
Figura 25 Viabilidad celular en HAPAF II tratadas con gemcitabina a 1000 μ M.	55
Figura 26 Viabilidad celular en CFPAC-1 sin transfectar.....	56
Figura 27 Viabilidad celular en CFPAC transfectadas.....	57
Figura 28 Viabilidad celular en HPAF II sin transfectar	58
Figura 29 Viabilidad celular en HPAF II transfectadas.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de oncogenes y genes supresores de tumor.....	4
Tabla 2. Oncogenes y genes supresor de tumor asociados a cáncer de páncreas	15
Tabla 3. Familias identificadas de las cinasas.....	24
Tabla 4. Cuantificación de MiniPrep.....	48

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
CDP	Citidina difosfato
dCDP	Desoxicitidina difosfato
DCK	Desoxicitidina cinasa
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dFdC	2,2 -difluoro-2-desoxicitidina
dFdCDP	Gemcitabina difosfato
dFdCMP	Gemcitabina monofosfato
dFdCTP	Gemcitabina trifosfato
dsRNA	RNA de doble cadena
ERK 1 /2	Proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señal extracelular
hCTN	Transportadores nucleosídicos de concentración
hENT	Transportadores nucleosídicos de equilibrio
hNT	Transportadores de nucleósidos humanos
MAP2	Microtúbulos asociado a proteína 2
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MAPK3	Proteína cinasa activada por mitógeno 3
NDPK	Nucleósido difosfato cinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasas
RRM1	Ribonucleotido reductasa
shRNA	Ácido ribonucleico de horquilla pequeña
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia

UMP-CMP Pirimidina nucleósido monofosfato cinasa

ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y SÍMBOLOS

C°	Grados centígrados
CTRL	Control
μM	Micromolar
μl	Microlitro
ml	Mililitro
min	Minutos
ng	Nanogramos
rpm	Revoluciones por minuto
Kb	Kilo bases
pb	Pares de bases

I. RESUMEN

El cáncer de páncreas es considerado la séptima causa de muerte para ambos sexos a nivel mundial, debido a la falta de un buen diagnóstico, por la ausencia de marcadores moleculares en etapas tempranas y por una respuesta limitada a la quimioterapia y a la radioterapia. Es el tipo de cáncer con la menor supervivencia, cerca del 95% de los pacientes fallecerán en los 5 años posteriores al diagnóstico.

Existen diferentes tratamientos para el cáncer de páncreas: cirugía, radioterapia, y quimioterapia. El fármaco más utilizado por su eficacia como agente quimioterapéutico es la gemcitabina, la cual elimina las células neoplásicas mediante el bloqueo de la progresión del ciclo celular en el checkpoint de G1/S. Sin embargo, la eficiencia terapéutica de la gemcitabina está limitada por el desarrollo de resistencia de las células pancreáticas cancerosas. La resistencia puede manifestarse de manera intrínseca o adquirida.

Estudios previos en el laboratorio, han permitido identificar un grupo de cinasas, las cuales podrían estar involucradas en la resistencia intrínseca a fármacos antineoplásicos. Una de las cinasas que presentó cambios en su expresión fue MAPK3, la cual presentaba sobreexpresión en líneas celulares tratadas con gemcitabina. Se ha reportado que MAPK3 actúa en varios procesos celulares como proliferación, diferenciación y progresión del ciclo celular en respuesta a diversos estímulos. Por lo tanto, en este estudio se determinó el efecto del silenciamiento de MAPK3 sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de páncreas CFPAC-1 y HPAF II tratadas con gemcitabina. En las dos líneas celulares, se realizaron los ensayos de viabilidad con las células transfectadas con el shRNA MAPK3. Los resultados mostraron que hay una mayor sensibilidad al ser tratadas con gemcitabina una vez silenciado el gen MAPK3 ya que para ambas líneas celulares se observa una tendencia a disminuir la viabilidad celular.

II. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

El cáncer comprende un conjunto de enfermedades que tiene en común el crecimiento celular desordenado y la colonización tisular debido a mutaciones en el genoma y alteraciones epigenéticas que alteran las propiedades normales de las células (Brandan, *et al.*, 2014). En las células normales, hay genes que están regulando varios procesos, como el crecimiento y división celular, sin embargo, en células cancerosas estos procesos están alterados provocando cambios que van desde alteraciones de su morfología, la disminución en la adhesión celular o la resistencia a fármacos, hoy en día se han propuesto 10 puntos clave para la caracterización del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011) (Fig. 1).



Fig. 1. Marcadores clave para la caracterización del cáncer. Se muestran 10 puntos clave que determinan el comportamiento de células cancerosas. Modificado de Hanahan, D. & Weinberg, R., 2011.

En la actualidad, sabemos que las células pueden volverse cancerosas después de que acumulan mutaciones en diversos genes que regulan diversas vías, entre las cuales se encuentran las relacionadas con el ciclo celular. Según la investigación del Proyecto del Genoma del Cáncer, la mayoría de las células cancerosas poseen más de 60 mutaciones (Stratton, 2009).

Estas mutaciones pueden proporcionar ventajas microevolutivas que le permitan a la célula tener diferentes adaptaciones para persistir en ambientes desafiantes, como puede ser la hipoxia o la acidosis así como evadir la respuesta inmune, incluso algunas de estas mutaciones propiciarían que las células adquirieran la capacidad de hacer metástasis a otros órganos o sobrevivan a agentes quimioterapéuticos (Aktipis, Boddy, & Gatenby, 2013). Las mutaciones que provocan alteraciones en los genes han sido asociadas a diferentes formas del cáncer y pueden hacer que protooncogenes se conviertan en oncogenes o que genes supresores de tumor se inactiven, algunos ejemplos de estos genes se muestran en la Tabla 1.

Los protooncogenes son genes que cuando se activan en oncogén favorecen que una célula normal adquiera características de una célula cancerosa, debido a que sus funciones en la célula son regular el crecimiento, la diferenciación celular y la muerte celular programada (Adamson, 1987, Chial, 2008).

Por otro lado, los genes supresores de tumores en una célula normal, previenen la proliferación celular, regulando los puntos de control en la duplicación; inician el proceso de apoptosis y también están involucrados en la reparación del DNA, sin embargo, en una célula cancerosa, estos genes se encuentran inactivos a causa de mutaciones provocando así la proliferación celular descontrolada (Cooper, 2000).

Tabla 1. Ejemplos de oncogenes y genes supresores de tumor

Gen	Función	Oncogén	Gen supresor
Akt	Regulación de la proliferación celular, angiogénesis, supervivencia celular		●
PI3K	Involucrada en la respuesta inmune, proliferación, supervivencia	●	
Bcl2	Involucrada en la apoptosis, estimula la angiogénesis	●	
Cdk-2	Regulación del ciclo celular	●	
Cdk-4	Progresión del ciclo celular		●
Ciclina E	Control del ciclo celular en la transición de G1/S		●
p16	Arresto en el ciclo celular en G1 y G2		●
Rb	Regulación del ciclo celular		●
BCRA 1	Reparación del ADN		●
p53	Regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN		●

Modificado de Cell Signaling Technology, 2018.

1.1. Desarrollo tumoral

El desarrollo tumoral es un proceso que se divide en 5 etapas: la primer etapa es cuando las células están genéticamente alteradas, debido a que acumulan una o varias mutaciones , confiriendo una ventaja de crecimiento celular con respecto a las células normales. En la segunda etapa ocurre la hiperplasia, donde las células comienzan a dividirse mucho más rápido, es importante añadir que las células aún tienen características de células normales. La tercer etapa es la displasia, en donde las células pierden totalmente las características de una célula normal. La cuarta etapa se denomina carcinoma *in situ*, en el cual las células se han expandido más, pierden su fenotipo, formando una población de células cancerosas. Finalmente en la quinta etapa está el cáncer invasivo, donde las células tumorales dejan el tumor primario y salen al torrente sanguíneo o linfático y de esta manera comienza a invadir tejidos adyacentes y así generar un nuevo tumor (Fig.2) (Weinberg, 1996).

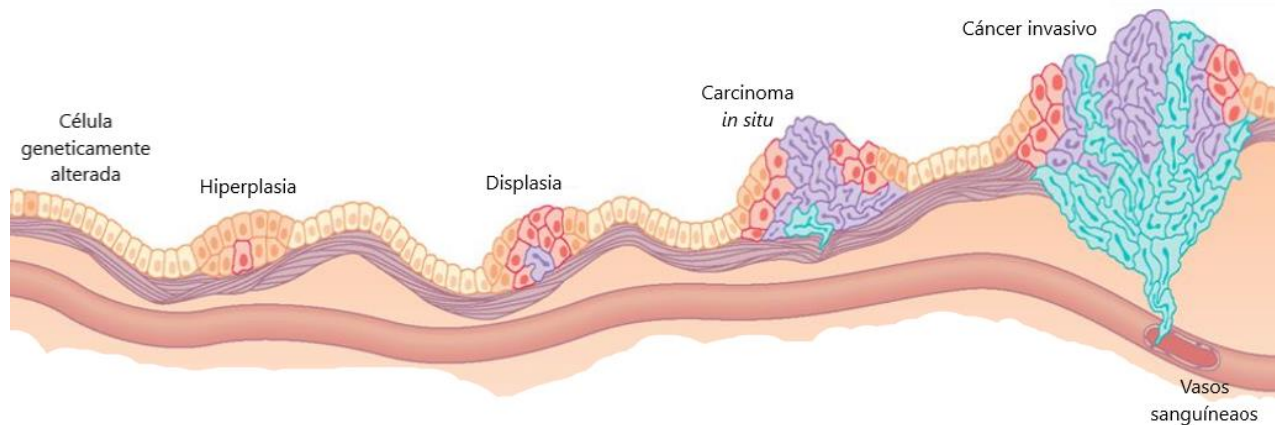


Fig. 2. Desarrollo tumoral del Cáncer. Se muestra las etapas por las cuales pasa una célula cuando tiene alteraciones genéticas que la llevan a convertirse en tumor. Modificado de Wainberg, 1996.

1.2. Epidemiología

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se estima que en el 2018 hubo 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.6 millones de muertes a causa de este padecimiento (GLOBOCAN, 2018). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los principales tipos de cáncer que causan mayor número de muertes para ambos sexos son el cáncer pulmonar, colorrectal, estómago, hígado, mama, esófago, y páncreas, por género, se establece que el cáncer de mama, pulmón, colorrectal, cuello uterino, estomago, hígado y páncreas afectan a mujeres mientras que cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago, hígado, esófago y páncreas a hombres (Fig. 3 y Fig. 4).

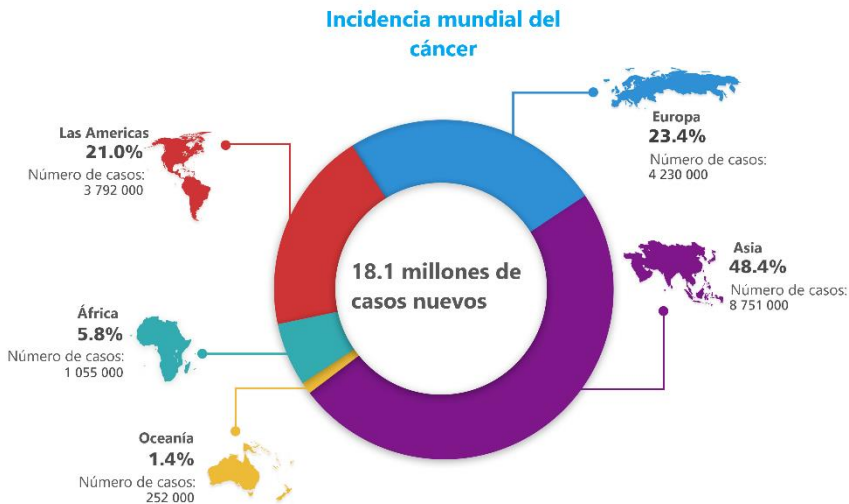
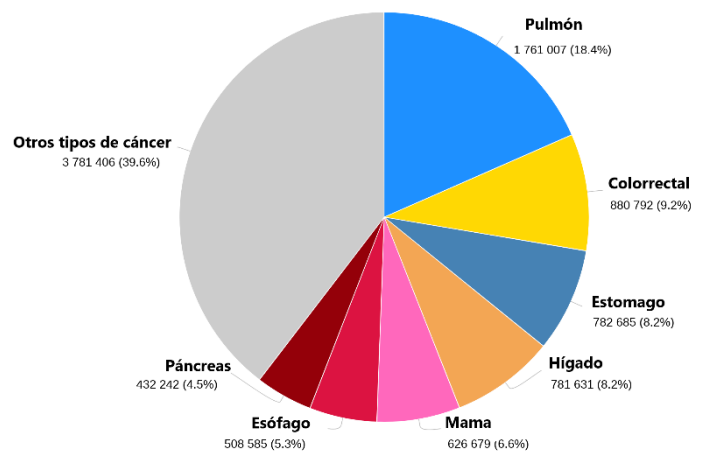


Figura 3 Incidencia mundial del cáncer. Número estimado de casos incidentes de todos los tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial. Modificado de GLOBOCAN, 2018.

Figura 4. Muertes estimadas por cáncer a nivel mundial. Número estimado de muertes a nivel mundial, de todos los tipos de cáncer para ambos sexos en el 2018. Modificado de GLOBOCAN, 2018.

Número de muertes por cáncer a nivel mundial en el 2018 en ambos sexos



En México el cáncer ocupa el tercer lugar de muerte en la población general, 14 de cada 100 mexicanos fallecen por enfermedades oncológicas. Los tipos de cáncer que más afectan a la población mexicana son próstata, mama, colorrectal, pulmón, hígado, estómago y páncreas (Fig. 5) (Secretaría de Salud, 2017; GLOBOCAN, 2018).

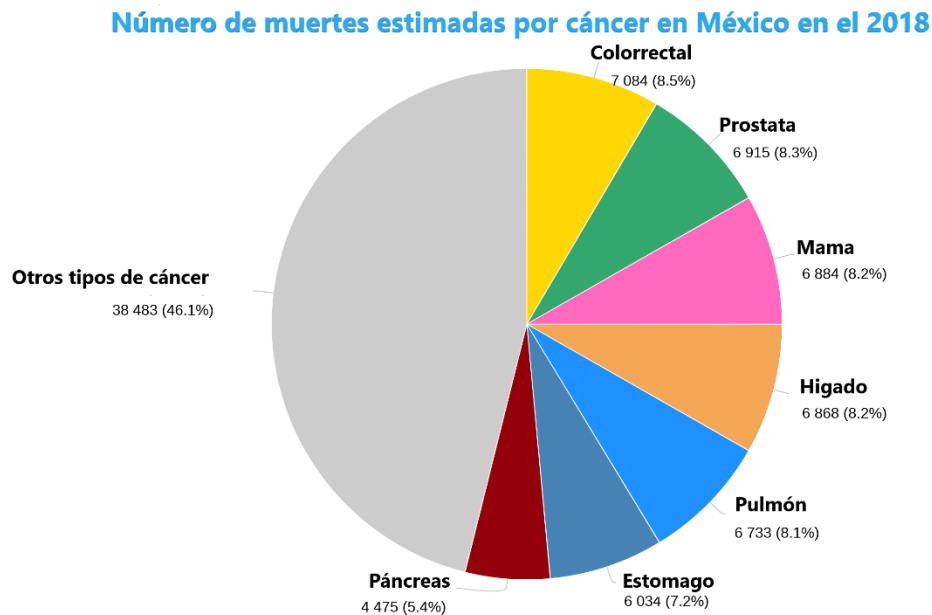


Figura 5. Muertes estimadas por cáncer en México. Número estimado de muertes en México de los tipos de cáncer que más afectan a la población para ambos sexos. Modificado de GLOBOCAN, 2018.

Los principales factores de riesgo que atribuyen a la población mexicana a padecer cáncer se deben a factores ambientales y al estilo de vida, por ejemplo, al consumo de tabaco, alcohol, sedentarismo, consumo de alimentos calóricos, bebidas azucaradas y a la falta de ejercicio (Secretaría de Salud, 2017).

2. Biología del Páncreas

El páncreas es un órgano que se localiza en el espacio rectoperitoneal, está rodeado por el estómago, intestino delgado, hígado, el bazo y la vesícula biliar, tiene una forma de pera plana. De manera morfológica, el extremo ancho del páncreas se le conoce como cabeza, las secciones medias son el cuello y el cuerpo y el extremo delgado es la cola (Fig. 6).

De manera fisiológica, está constituido por dos tipos de células secretoras que regulan dos procesos importantes: digestión y metabolismo, a las cuales se les conoce como componente exocrino y componente endocrino.

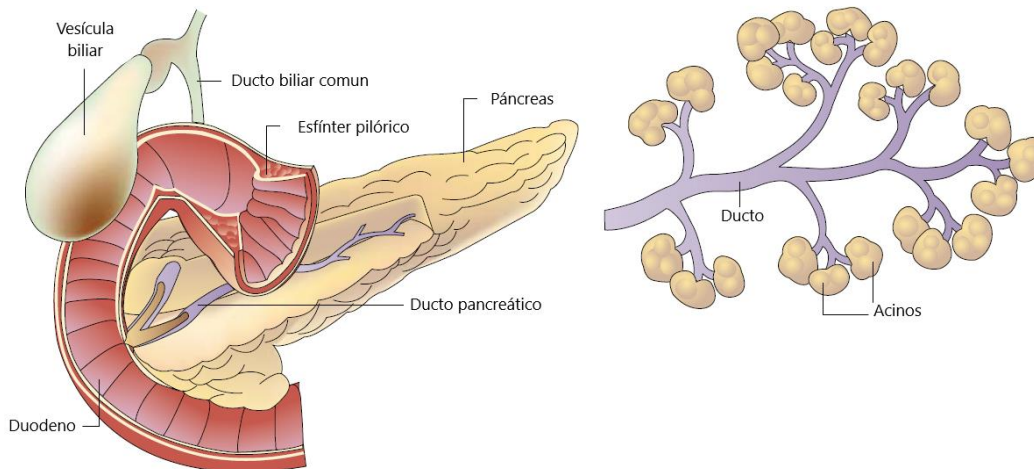


Figura 6. Anatomía del páncreas. El páncreas está constituido por células secretoras que regulan los procesos de metabolismo de la glucosa y digestión. Modificado de Nabeel Bardeesy N. DePinho R.,2002

El componente exocrino recubre el 98% del páncreas y se caracteriza por ser una glándula serosa. En cuanto a su morfología, está dividido en pequeños lóbulos, los cuales representan una subdivisión del parénquima y es drenado por un ducto intralobular único (Brandan, Llanos, Miño, & Rodríguez, 2011).

Así mismo, dentro de los lóbulos se encuentran las células acinares y las células ductales. Estas células son las encargadas de sintetizar, almacenar y secretar enzimas hacia el duodeno que son necesarias para la digestión de alimentos (Bardeesy & Dephino, 2002). Las células acinares, están organizadas en grupos de 15 a 100 células, estas se especializan en la producción y exportación de grandes cantidades de proteínas, por lo tanto, cuentan con un amplio retículo endoplásmico rugoso (Fig. 7) (Boron & Boulpaep, 2012).

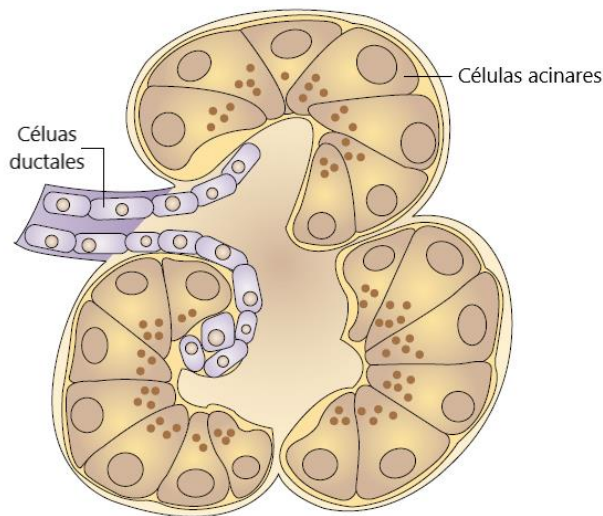


Figura 7. Componente exocrino del páncreas. El páncreas exocrino está formado por lóbulos de forma de racimos de uva, donde se encuentran las células acinares y las células ductales. Modificado de Nabeel Bardeesy N. & DePinho R.,2002.

Estas células contienen gránulos secretores, en los cuales se encuentra una mezcla de zimógenos (precursores inactivos de enzimas) y enzimas requeridas para la digestión. La glándula salival, por ejemplo, es la principal célula acinar y secreta α -amilasa, mucina y proteínas ricas en prolina. (Boron & Boulpaep, 2012).

Las células ductales contienen un transportador de membrana específico y una gran cantidad de mitocondrias para proveer energía para el transporte activo. La principal función de las células ductales es la secreción de bicarbonato (HCO_3), que alcaliniza e hidrata las proteínas para las células acinares.

Por otro lado, el componente endocrino recubre el 2% restante del páncreas y es el encargado de regular el metabolismo de carbohidratos, así como de proteínas y lípidos (Brandan, Llanos, Miño, & Rodríguez, 2011).

Dentro de este componente se encuentran las células llamadas islotes de Langerhans, las cuales se dividen en cuatro tipos principales de células. Las células α secretan glucagón que produce hiperglucemia por su actividad glucogenolítica en el hígado. Las células β producen insulina, única hormona hipoglucemiante. Las células δ contienen somatostatina que suprime la liberación de insulina y de glucagón. Finalmente, las células PP contienen un polipéptido pancreático exclusivo con diversas acciones digestivas como estimular la secreción de enzimas gástricas e intestinales e inhibir la motilidad (Fig. 8) (Bardeesy & DePino, 2002. Brandan *et al.*, 2011).

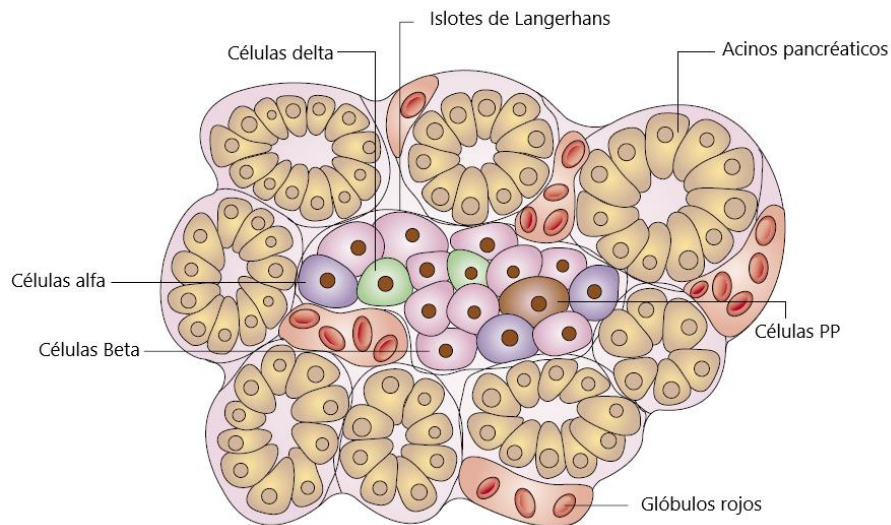


Figura 8. Islote de Langerhans. El páncreas endocrino está formado por cuatro tipos de células que se encuentran dentro de los islotes de Langerhans, las cuales secretan hormonas hacia el torrente sanguíneo. Modificado de Bardeesy N. & DePinho R., 2002.

De igual manera, las células que están dentro de los islotes pueden comunicarse entre sí e influir en la secreción. Esta comunicación se divide en tres categorías:

comunicación humoral, comunicación célula-célula y comunicación neural. Cuando existe un mal funcionamiento en el páncreas pueden derivarse enfermedades como pancreatitis, fibrosis quística y cáncer de páncreas.

3. Cáncer de páncreas

Según las estimaciones de GLOBOCAN 2018 el cáncer de páncreas ocasiona 432,244 muertes al año y es considerado la séptima causa de muerte para ambos sexos (Ilic & Ilic, 2016) debido a la falta de un buen diagnóstico, principalmente porque no presenta síntomas, por su localización anatómica y por la ausencia de marcadores moleculares en etapas tempranas.

Ahora bien, la tasa de supervivencia estimada a cinco años es inferior al 5% y tanto la incidencia como la mortalidad se correlaciona con el aumento de la edad y es más alto en hombres que en mujeres. Sin embargo, en las últimas décadas la mortalidad ha aumentado en ambos sexos en países como Estados Unidos, países europeos, Japón y China (Ilic & Ilic, 2016).

En México, el cáncer de páncreas ocupa el 13° lugar en incidencia con 4,847 casos nuevos de cáncer y ocupa el 7° lugar con 4 475 muertes al año, con una tasa de supervivencia menor al 5% (GLOBOCAN, 2018).

3.1. Tipos de cáncer de páncreas

Existen diferentes tipos de neoplasias que afectan al páncreas tanto de manera exocrina y endocrina. Cerca del 95% de los casos de tumor se presentan de manera exocrina, estos incluyen a los adenocarcinomas pancreáticos ductales, los cuales se presenta en el 90 % de los casos. Se caracterizan por la formación de masas fibróticas firmes mal definidas, son de color blanco-amarillo, y oscurecen la arquitectura lobular normal del páncreas, esta característica sirve para distinguir entre una pancreatitis crónica y adenocarcinoma pancreático. De manera

histológica, presenta una estructura glandular bien desarrollada que imitan conductos pancreáticos normales, incrustados en estroma desmoplásico (Hruban & Fukushima, 2007).

También se encuentran los carcinomas de células acinares, pocos frecuentes, con una ocurrencia del 1- 2 %, se caracterizan por un citoplasma granuloso y por un único núcleo prominente (Kleeff *et al.*, 2016, Al-Hader, Al-Rohil, Han, & Von Hoff, 2017). Otro tipo de neoplasia pancreática son los pancreatoblastomas, considerado el tumor más común en niños, en este, los componentes epiteliales pueden formar corpúsculos acinares o escamosos (Omiyale, 2015). Los tumores sólidos pseudopapilares, es otro tipo de neoplasia pancreática, es de bajo potencial de malignidad y ocurre en mujeres menores de treinta años (Shuja & Alkimawi, 2014, Anselmo, *et al* , 2017).

Por otro lado, entre las neoplasias que afectan al páncreas de manera endocrina, se encuentran los tumores neuroendocrinos, éstos se originan en los islotes de Langerhans y se clasifican en dos tipos: funcionales y no funcionales. Los funcionales están asociados a hormonas y síndromes específicos, por ejemplo, al síndrome Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1, Von Hippel Lindau (VHL), Von Recklinghausen, entre otros, y pueden ocasionar, insulinoma, gastrinoma, VIPoma, glucagonoma. Los no funcionales, por el contrario, no están asociados a ningún síndrome, sino a la propia naturaleza del tumor (Ro, Chai, Yu, & Yu, 2013).

3.2. Factores de riesgo para el cáncer de páncreas

Existen diferentes factores de riesgo tanto ambientales y genéticos que pueden contribuir a la formación de cáncer. El aumento de la edad es un factor determinante, ya que se ha reportado que el 80 % de las neoplasias se han presentado en pacientes de 60 a 80 años (Ilic & Ilic, 2016). El consumo de tabaco contribuye al desarrollo de cáncer pancreático en un 30 % de los casos, debido a

que el cigarro contiene 250 sustancias químicas que son dañinos y 60 son carcinógenos (Pandol *et al.*, 2012, Ilic & Ilic, 2016).

La obesidad y la falta de actividad física, son factores que se atribuyen al desarrollo de cáncer. Se ha reportado que el riesgo aumenta un 50% para las personas con obesidad, esto se ve asociado con la inflamación del tejido adiposo que promueve el crecimiento del cáncer a través de la secreción de citocinas proinflamatorias tales como ; factor de necrosis tumoral α , factor de crecimiento transformante β , interleucina-6 y leptina. Además la obesidad está muy relacionada con la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2, también relacionado con el cáncer de páncreas, ya que altera el metabolismo energético y desequilibra el perfil hormonal, además de que está asociado a altos niveles de factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) que promueve la supervivencia y la proliferación en cáncer (Li, 2012).

La pancreatitis crónica es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación del páncreas y esta afectación se ha correlacionado con el aumento a padecer cáncer pancreático, debido a las alteraciones genéticas que surgen durante la inflamación, por lo cual, las células afectadas están expuestas a un microambiente y a factores de crecimiento que estimulan el desarrollo del tumor (Zavoral, Minarikova, Zavada, Salek, & Minarik, 2011).

El historial familiar también influye la posibilidad de padecer cáncer pancreático, se ha estimado que un componente hereditario puede estar implicado en casi 10% de todos los casos de cáncer (Carrera *et al.*, 2017). Existen diferentes síndromes y genes que incrementan el riesgo de padecer cáncer pancreático, por ejemplo, síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, síndrome de Peutz–Jeghers, síndrome de Lynch, entre otros. En cuanto genes alterados se encuentra BRCA2, BRCA1, CDKN2A, ATM, STK11, PRSS1, MLH1 y PALB2 (Carrera *et al.*, 2017).

3.3. Biología molecular del cáncer de páncreas

Los mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer pancreático aún no están definidos totalmente, sin embargo, se han asociado diferentes oncogenes y genes supresores de tumores que están implicados en diferentes vías de señalización, entre los más importantes se encuentra K-Ras, un oncogén que está sobre expresado en el 90 % de los pacientes con cáncer de páncreas (Karanikas *et al.*, 2016). K-Ras es muy importante para las células cancerosas ya que les confiere mayor capacidad proliferación afectando la vía de señalización RAF/MEK/ERK (Karanikas *et al.*, 2016) (Tabla 2).

K-Ras también está involucrado en la señalización de fosfoinosítido 3 cinasas (PI3K) / cinasa dependiente del 3 -fosfoinosítido 1 (PDK-1) / Akt, factores de intercambio de nucleótidos de guanina Ral (por sus siglas en ingles RalGEF) y fosfolipasa C ϵ , los cuales están involucrados en la capacidad metastásica de las células (Polireddy & Chen, 2016; Cicenias *et al.*, 2017).

Entre los genes supresores de tumores se encuentra p16/CDKN2A, que se encuentra inactivo aproximadamente en el 90 % de los carcinomas pancreáticos (Karanikas *et al.*, 2016) este inhibe la fosforilación mediada por CDK 4/6 de la proteína retinoblastoma (RB), bloqueando la entrada en la fase S del ciclo celular lo cual conllevaría al desarrollo de cáncer pancreático (Polireddy & Chen, 2016). Otro gen supresor de tumor importante es p53, que se encuentra alterado en el 70% de casos de carcinoma (Cicenias *et al.*, 2017) y está implicado en la respuesta al estrés citotóxico contribuyendo al arresto celular y apoptosis (Karanikas *et al.*, 2016).

SMAD4 es un transductor de señal clave de la ruta de señalización de TGF- β , el cual se ha reportado que se inactiva aproximadamente en el 50 % de los casos de cáncer de páncreas (Cicenias *et al.*, 2017) y proporciona una ventaja al favorecer la proliferación descontrolada de las células de cáncer, anulando así las

señales inhibitoras del crecimiento mediadas por TGF- β (Polireddy & Chen, 2016).

Tabla 2. Oncogenes y genes supresor de tumor asociados a cáncer de páncreas.

Gen	Tipo	Vía de señalización
K-Ras	Oncogén	Ras / Raf / MAPK
p53	Gen supresor de Tumor	Control del ciclo celular / Apoptosis
CDKN2A	Gen supresor	Ciclo celular
CTNNB1	Oncogén	Wnt
SMAD4	Gen supresor	TNFBeta / SMAD
Apc	Gen supresor	Wnt
PIK3CA	Gen supresor	PTEN / PI3K / AKT

Modificado de Zavoral, *et al.*, 2011.

4. Tratamientos para cáncer de páncreas

Los tratamientos para cáncer de páncreas depende del tipo y la etapa en la que se encuentre. Estos pueden administrarse solos o en combinación, ya que pueden actuar tanto a nivel local como lo son la cirugía y la radioterapia o pueden actuar

sobre todas las células cancerosas y no cancerosas que se hayan diseminado en el cuerpo mediante la quimioterapia (Husain, 2014).

Según la American Cancer Society existen tres diferentes procedimientos de cirugía para eliminar el tumor: procedimiento de Whipple o pancreatoduodenectomía, pancreatetonomía distal y pancreatetonomía total. Sin embargo son pocos los pacientes candidatos para este tipo de tratamiento y es una cirugía muy complicada dado que el páncreas se localiza en el espacio rectoperitoneal.

Por otro lado la radioterapia consiste en utilizar rayos X o sustancias radiactivas para disminuir el tamaño del tumor y eliminar células cancerosas. Existen diferentes tipos de radioterapia. Por ejemplo la radiación adyuvante, la cual es administrada después de la cirugía o de la quimioterapia para consolidar en tratamiento local. La radiación radical, se administra como único tratamiento con el fin de curar la enfermedad como y mantener la función del órgano y la radiación neoadyuvante, la cual suele ir asociada a la quimioterapia para sensibilizar a las células.

4.1. Quimioterapia

Para pacientes con cáncer de páncreas en estados avanzados, el tratamiento utilizado es la quimioterapia. Según la United States Food and Drug Administration (FDA) se emplean cinco fármacos, el primero y el más utilizado es Gemzar® (gemcitabina), ABRAXANE® (paclitaxel unido a albúmina), ONIVYDE® (inyección de liposoma de irinotecán) y por último FOLFIRENOX que es una combinación de fármacos para quimioterapia y está compuesto por ácido folínico o leucovorina, 5-fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino (Thota, *et al.* 2015).

5. Gemcitabina

El tratamiento con gemcitabina fue aprobado en 1996 por la FDA (Binenbaum, Na'ara, & Gil, 2015) y desde entonces ha sido el tratamiento estándar para cáncer de páncreas avanzado y metastásico. La gemcitabina también ha sido un fármaco utilizado en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para tratar cáncer de ovario, de pulmón de células pequeñas y mama (de Sousa & Monteiro, 2014).

La gemcitabina (2,2 -difluoro-2-desoxicitidina; dFdC) es un análogo de desoxicitidina y citosina arabinósido y tiene como objetivo que las células que estén en síntesis activa de ADN (fase S) entren en apoptosis y bloqueen la progresión del ciclo celular en el límite de fase G1/S (Huang , Chubb, Hertel, & Plunkett, 1991) (Fig.9).

5.1. Mecanismo de acción

La manera por la cual la gemcitabina es metabolizada consiste en primera instancia en la captación celular por medio de transportadores de nucleósidos humanos (hNT) que se encuentran embebidos en la membrana plasmática. Los hNT pueden clasificarse en dos grupos, los transportadores nucleosídicos de equilibrio (hENT) y los de concentración (hCNT) (Spratlin, *et al.*, 2004). Y a su vez dividirse en subgrupos, los cuales dos de hENT (hENT1,hENT2) y tres de hCNT ((hCNT1, hCNT2, hCNT3) están involucrados en la captación de gemcitabina (Mini, Nobili, Caciagli, Landini, & Mazzei, 2006) (Fig. 10).

Una vez dentro de la célula, en el citoplasma específicamente, la gemcitabina es activada mediante la fosforilación de la desoxicitidina cinasa (DCK) a gemcitabina

monofosfato (dFdCMP) y posteriormente vuelve a ser fosforilada por la pirimidina nucleósido monofosfato cinasa (UMP-CMP cinasa) para obtener gemcitabina difosfato (dFdCDP) que después va a formar gemcitabina trifosfato (dFdCTP) por medio del nucleósido difosfato cinasa (NDPK) (Jiaa & Xie, 2015).

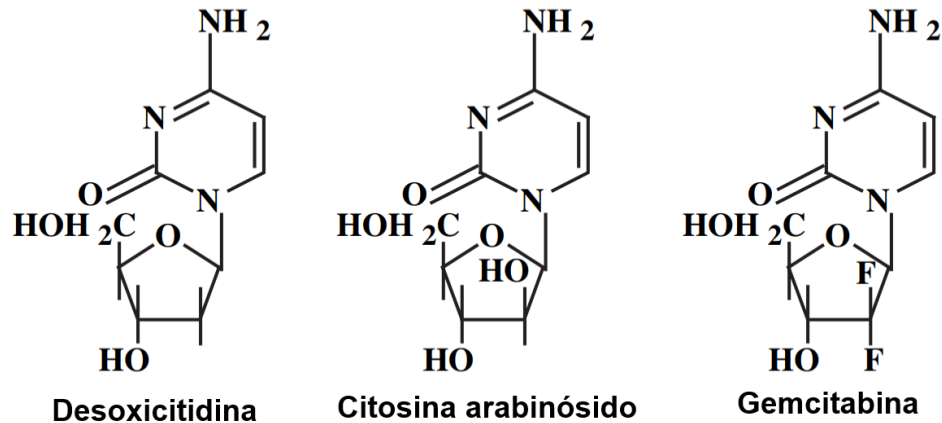


Fig. 9. Compuestos análogos de gemcitabina. Modificado de Mini, Nobili, Caciagli, Landini, & Mazzei, 2006.

El principal mecanismo de acción de la gemcitabina es inhibir la síntesis del ADN, (Huang, Chubb, Hertel, & Plunkett, 1991) ya que al incorporarse gemcitabina trifosfato (dFdCTP) en la cadena del ADN durante la replicación y competir con la desoxicitidina trifosfato (dCTP, nucleósido trifosfato) que contiene la base citosina, inhibirá la elongación de la cadena del ADN causando la muerte celular (Adamskaa *et. al.*, 2018). A este mecanismo se le conoce como “terminación de la cadena enmascarada” (de Sousa & Monteiro, 2014) (Fig. 10).

Otra de las funciones que tiene la gemcitabina, es que esta mejora su activación mediante un proceso llamado auto-potenciación, que consiste en que estando fosforilada como gemcitabina difosfato (dFdCDP) inhibe a la ribonucleótido reductasa M1 o M2 (RRM1 / RRM2) que convierte la citidina difosfato (CDP) a

desoxicitidina difosfato (dCDP), lo que conduce a la reducción de las reservas de dCTP y facilita la incorporación de dFdCTP en el ADN (Jia & Xie, 2015).

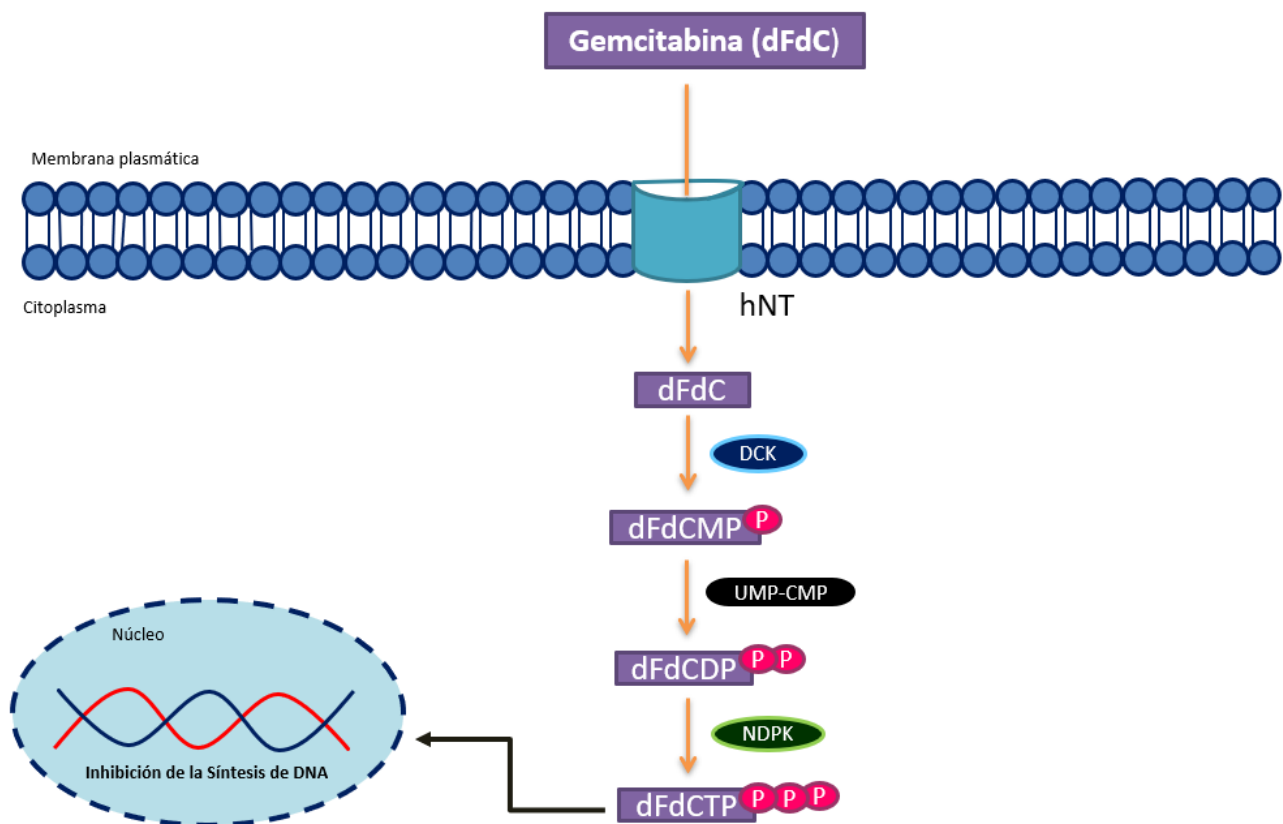


Fig. 10. Mecanismo de acción de la gemcitabina. La gemcitabina es captada por los hNT en el citoplasma, es fosforilada por DCK hasta llegar al núcleo celular donde su forma trifosforilada inhibe la síntesis de ADN. Modificada de Jia & Xie, 2015.

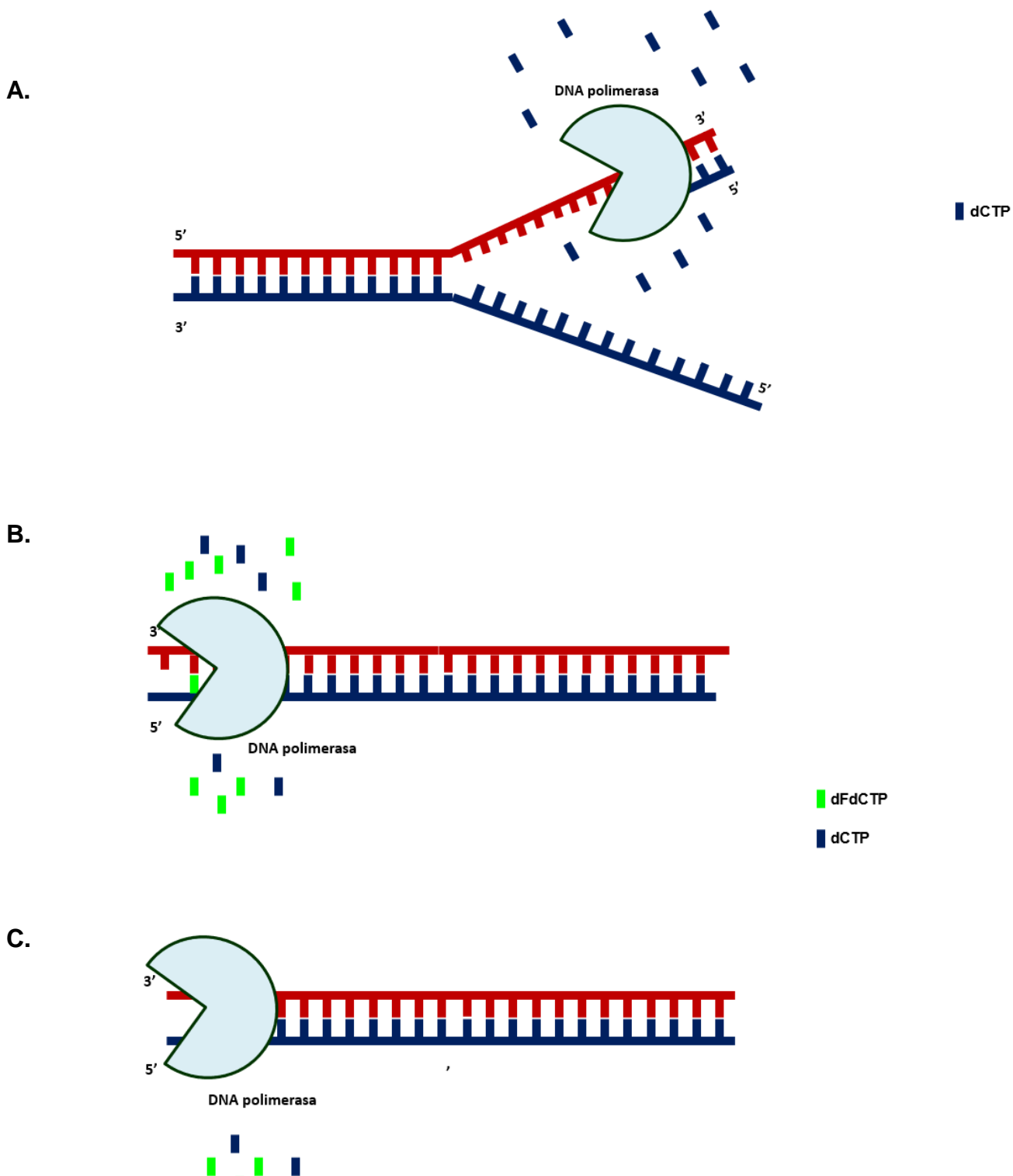


Fig. 11. Terminación de la cadena enmascarada. Durante la replicación A. la ADN polimerasa incorpora dCTP a la cadena de ADN. Cuando la gemcitabina entra al núcleo en su forma trifosfatada B, se sustituyen los dCTP por los dFCTP provocando la inhibición de la síntesis de la cadena de ADN C. Modificado de Sousa & Monteiro, 2014.

5.2. Quimioresistencia a gemcitabina

A pesar de que la gemcitabina es uno de los tratamientos estándar para el cáncer de páncreas, uno de los problemas con que nos enfrentamos es la resistencia a la quimioterapia, (lo cual provoca que el cáncer de páncreas sea una de las neoplasias más agresivas y malignas (Adamskaa *et. al.*, 2018).

La quimioresistencia se da de dos maneras : intrínseca y adquirida. La resistencia intrínseca ocurre cuando la quimioterapia es ineficaz desde un inicio debido a factores genéticos como factor de receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) Notch, proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), NF-kB (Amrutkar & Gladhaug, 2017). La resistencia adquirida se presenta cuando se observa una respuesta favorable en los pacientes al inicio del tratamiento, como por ejemplo, la disminución en el tamaño del tumor, sin embargo, después de recibir varias dosis, no se observa mejoría. Esto podría deberse a mutaciones genéticas derivadas del tratamiento, respuestas adaptativas y selección natural de una subpoblación tumoral resistente a medicamentos (Amrutkar & Gladhaug, 2017, Adamskaa *et. al.*, 2018).

Estudios recientes han demostrado que la resistencia a gemcitabina se debe a diferentes factores del microambiente tisular como moleculares. En cuanto a microambiente se encuentran las células estrelladas pancreáticas (PSC), células iniciadoras de tumor, fibroblastos y microvesículas. Estos inician la hipoxia y fibrosis dentro del estroma formando una barrera (desmoplasia) que al final desempeña una papel en la quimioresistencia (Adamskaa *et al.*, 2018). Entre los factores genéticos se encuentra hENT1, desoxisicitidina cinasa (DCK), ribonucleotido reductasa (RR) (Samulitis, Pond, & Pond, 2015) que afectan las señales celulares e inducen la inestabilidad de sistemas moleculares como

crecimiento, división, apoptosis y migración. De igual manera también se ha reportado a p53, proteínas de choque térmico (HSP), vía NF-kB, desacetilación de histonas y la vía de MAPK (Binenbaum, Na'ara, & Gil, 2015).

III. ANTECEDENTES

En el grupo de trabajo del laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del INMEGEN, se llevó a cabo una investigación utilizando una biblioteca de 4,675 shARN dirigido a la familia de las proteínas cinasas (Protein Kinase Library Dharmacon 0cat. RH56078). Los resultados permitieron identificar algunas cinasas que podrían estar involucradas en la resistencia intrínseca a fármacos antineoplásicos. Una de las cinasas que presentó cambios en su expresión fue MAPK3, la cual presentaba sobreexpresión en líneas celulares tratadas con gemcitabina (resultados no publicados, sometidos a protección intelectual).

1. Función de las cinasas

Las proteínas cinasas están agrupadas en 8 familias y son un tipo de reguladores funcionales que están involucradas en varios procesos celulares, incluidos el metabolismo, transcripción, ciclo celular, reordenamiento del citoesqueleto, apoptosis y diferenciación (Maning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002). Su principal función es adicionar grupos fosfatos a otras moléculas, como proteínas o azúcares provocando su activación o inactivación. El descontrol en alguna de estas funciones puede provocar la inhibición o sobreexpresión de otras proteínas, lo cual es causa de múltiples patologías, incluido el cáncer (Shchemelinin, Sefc, & Necas, 2006). Por lo tanto, las proteínas cinasas juegan un papel de suma importancia como iniciadores del proceso de carcinogénesis (Tabla 3).

Tabla 3. Familias identificadas de las cinasas

Grupo de cinasa	Descripción
AGC	PKA, PKG, PKC
CAMK	Calcio/ calmodulina dependiente de cinasa
CK1	Caseína cinasa 1
CMGC	CDK, MAPK, GSK3, CLK
STE	Activan miembros de MAPK
TK	Tirosina cinasa
TKL	Similar a la tirosina cinasa
RGC	Sin definir

Modificado de Maning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002.

2. Familia de las MAPK

La proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) pertenece a la superfamilia CMGC, es uno de los importantes mecanismos de señalización de membrana a núcleo (Zhao *et al.*, 2006). La vía de señalización de MAPK regula varios procesos celulares como proliferación, diferenciación, metabolismo, supervivencia y apoptosis, además de que está involucrado en la respuesta inmune (Boon & Zhang, 2016).

Dentro de la vía o la familia las MAPK sé que han identificado tres vías importantes: cinasa 1 y 2 regulada por señal extracelular (ERK 1/2), c-Jun N-terminal cinasa (JNK) y p38 MAP cinasa (Plotnikov, Zehorai, & Procacci, 2010, Burotto, Chiou, & Min, 2014). La vía ERK 1/2 participa en el desarrollo,

diferenciación y crecimiento a través de la regulación de la transcripción, traducción y reordenamiento del citoesqueleto, mientras que JNK y p38 MAP cinasa están involucradas en inflamación, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular (Boon & Zhang, 2016) .

Cuando la vía de señalización de MAPK está desregulada conduce a un crecimiento y a la proliferación descontrolada provocando la formación de tumores, además de presentar una quimioresistencia a fármacos. Esta vía se ha visto involucrada en carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma gástrico y carcinoma de células renales (Burotto, Chiou, & Min, 2014, Boon & Zhang, 2016).

2.1. MAPK3

La proteína cinasa 3 activada por mitógeno (MAPK3), también conocida como cinasa regulada por señal extra celular (ERK 1), está ubicada en el citoplasma y en el núcleo. Pertenece a la familia de las MAP cinasa y se identificó inicialmente como una proteína cinasa estimulada por insulina que tiene una actividad hacia la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2).

Está involucrada en la vía de señalización ERK/MAP, la cual está implicada en el control de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Tuncay & Banerjee, 2010).

Se ha reportado que una sobre expresión de MAPK3 está presente en varios tipos de cáncer, en los que se incluye, cáncer gástrico, colon, riñón, próstata, pulmón de células no pequeñas, vejiga, condrosarcomas y glioblastoma multiforme. Cabe mencionar que la vía de señalización de ERK/MAPK también puede promover la motilidad celular y la migración de las células tumorales (Tuncay & Banerjee, 2010).

3. Silenciamiento de genes

Fire y Mello (1998) demostraron en el modelo animal de *Caenorhabditis elegans* que al introducir RNA de doble cadena (dsRNA) es posible inducir la degradación de RNA mensajero provocando el silenciamiento de un gen específico, a lo que llamó RNA de interferencia (RNAi) (Fire, Xu, Montgomery, & Kostas, 1998). Esta herramienta ha sido de gran ayuda para muchos investigadores ya que con el silenciamiento génico se puede llegar a comprender el funcionamiento de ciertos genes que están involucrados en diversas patologías como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas e infecciosas.

El silenciamiento puede ocurrir a nivel transcripcional o traduccional. No obstante, con el avance de nuevas tecnologías se comenzaron a descubrir y emplear otras moléculas como los siRNAs, microRNA, piRNAs, lentivirus, shRNAs y más recientemente el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9.

3.1 Short Hairpin RNA

Los short hairpin RNA (shRNA) son secuencias clonadas en un vector de DNA que puede ser introducido en las células mediante la transfección, electroporación o infección (lentivirus). La estructura de un shRNA consta de 19-29 pb, la cadena antisentido y sentido están unidas formando un "hairpin" u horquilla. (Kim, 2005, Lambeth & Smith, 2012) (Fig 12).

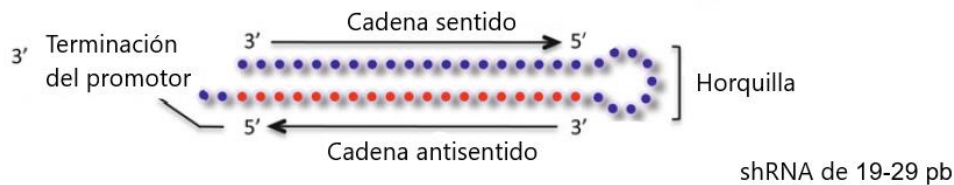


Fig. 12. Estructura de un shRNA. Modificado de Lambeth & Smith, 2012.

Los shRNA a diferencia de los siRNA tienen un mayor tiempo de silenciamiento debido a que son sintetizados en el núcleo de la célula, son procesados y transportados al citoplasma donde son incorporados a la actividad de RISC (Cullen, 2005).

3.2 Proceso celular de los shRNA

Los shRNA son sintetizados de la misma manera que los microRNA, primero son llevados al núcleo y son transcritos por el promotor U6 y a este se le une la RNA pol III. El promotor U6 es una secuencia promotora fuerte que ayuda a que se transcriba con eficiencia el shRNA ya que esto favorece que se exprese y por ende haya una inhibición del gen por la transcripción del shRNA (Yuan, Wang, Zhang, & Hu, 2006, Wang, Rao, Senzer, & Nemunaitis, 2011) (Fig. 13).

Una vez en el núcleo es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 para formar un pre-shRNA, posteriormente son exportados al citoplasma por una exportina dependiente de Ran-GTP llamada Exportina 5 (Bohnsack, Czaplinski, & Görlich, 2004, Rao, Vorhies, & Senzer, 2009, Lambeth & Smith, 2012). Ya en citoplasma, el pre-shRNA es reconocido por un complejo que contiene a Dicer una enzima tipo

RNAsa III y TRBP/PACT, el cual va a procesar a la horquilla del shRNA para formar pequeños siRNAs de doble cadena con dos bases libres en los extremos 3' hidroxilo y un extremo 5' fosfato (Kim, 2005, (Rao, Vorhies, & Senzer, 2009, Lambeth & Smith, 2012).

Dado que los shRNA fueron madurados por Dicer, el siguiente paso importante es el comienzo de la degradación del mRNA, para ello se involucra el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual está conformado por las proteínas Argonautas, en donde la proteína Ago 2 tiene un papel importante, debido a su actividad endonucleasa que permiten que libere la hebra complementaria dirigida al mRNA. Por lo tanto, Ago2 se une al siRNA, que será guía para que RISC se una a los sitios complementarios de mRNA provocando la degradación del mRNA y de como resultado el silenciamiento a través de la inhibición de la traducción (Rao, Vorhies, & Senzer, 2009).

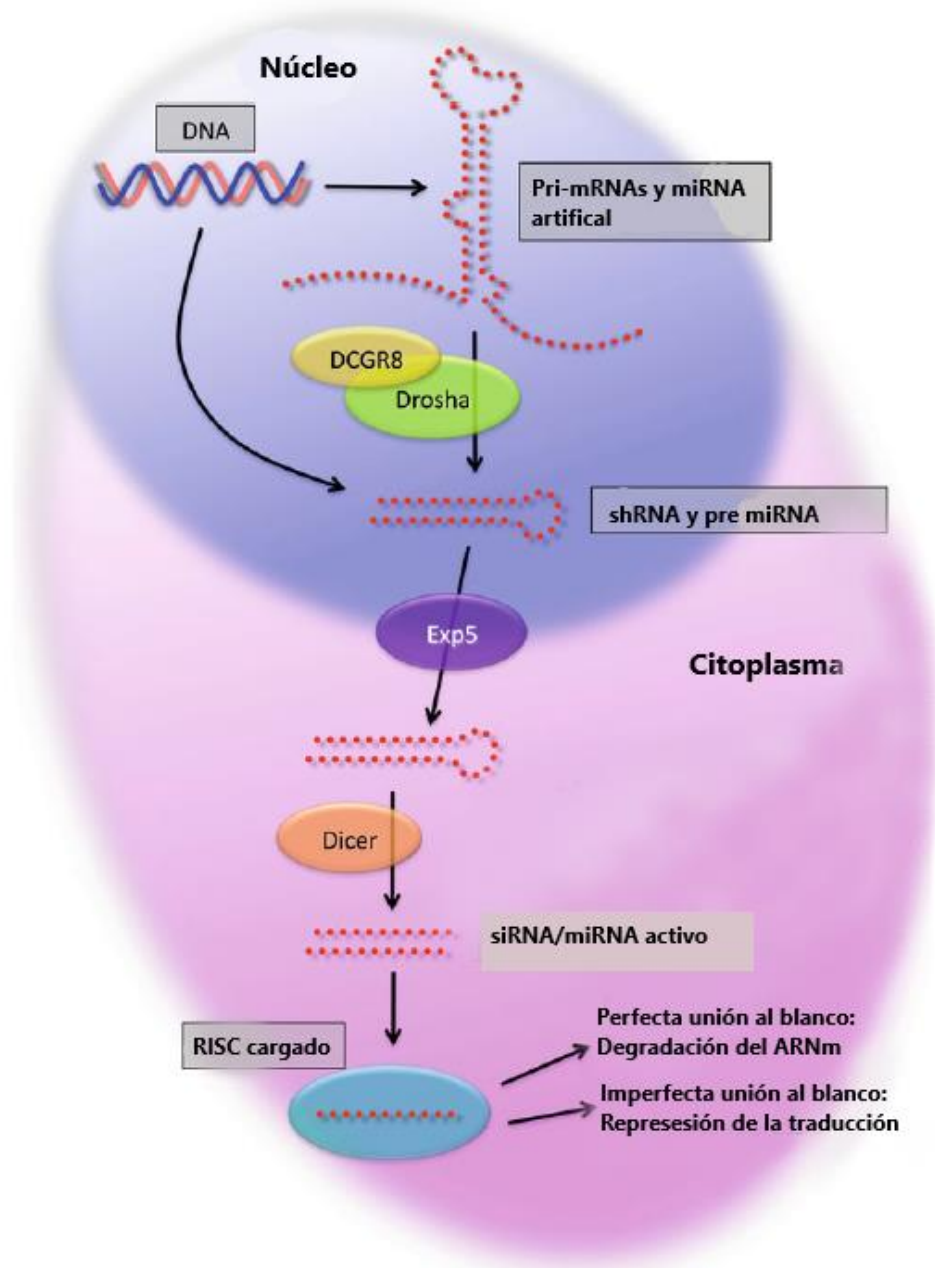


Fig. 13. Procesamiento de shRNA. Los shRNA primero son llevados al núcleo y son procesados por Drosha/DGCR8, posteriormente son exportados al citoplasma por Exp5, donde van a ser madurados por Dicer y finalmente se va a llevar a cabo la degradación del mRNA por el complejo RISC. Modificado de Lambeth & Smith, 2012.

IV. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de resistencia a gemcitabina en cáncer de páncreas no ha sido descifrado pero podría involucrar MAPK3, por lo que proponemos silenciar esta cinasa en las líneas CFPAC y HPAF-II derivadas de adenocarcinoma pancreático con la finalidad de determinar el efecto que MAPK3 tiene en la sensibilidad al fármaco.

V. HIPÓTESIS

El silenciamiento del gen de MAPK3 aumenta la sensibilidad al tratamiento con gemcitabina en las líneas celulares humanas de cáncer pancreático CFPAC y HPAF-II.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

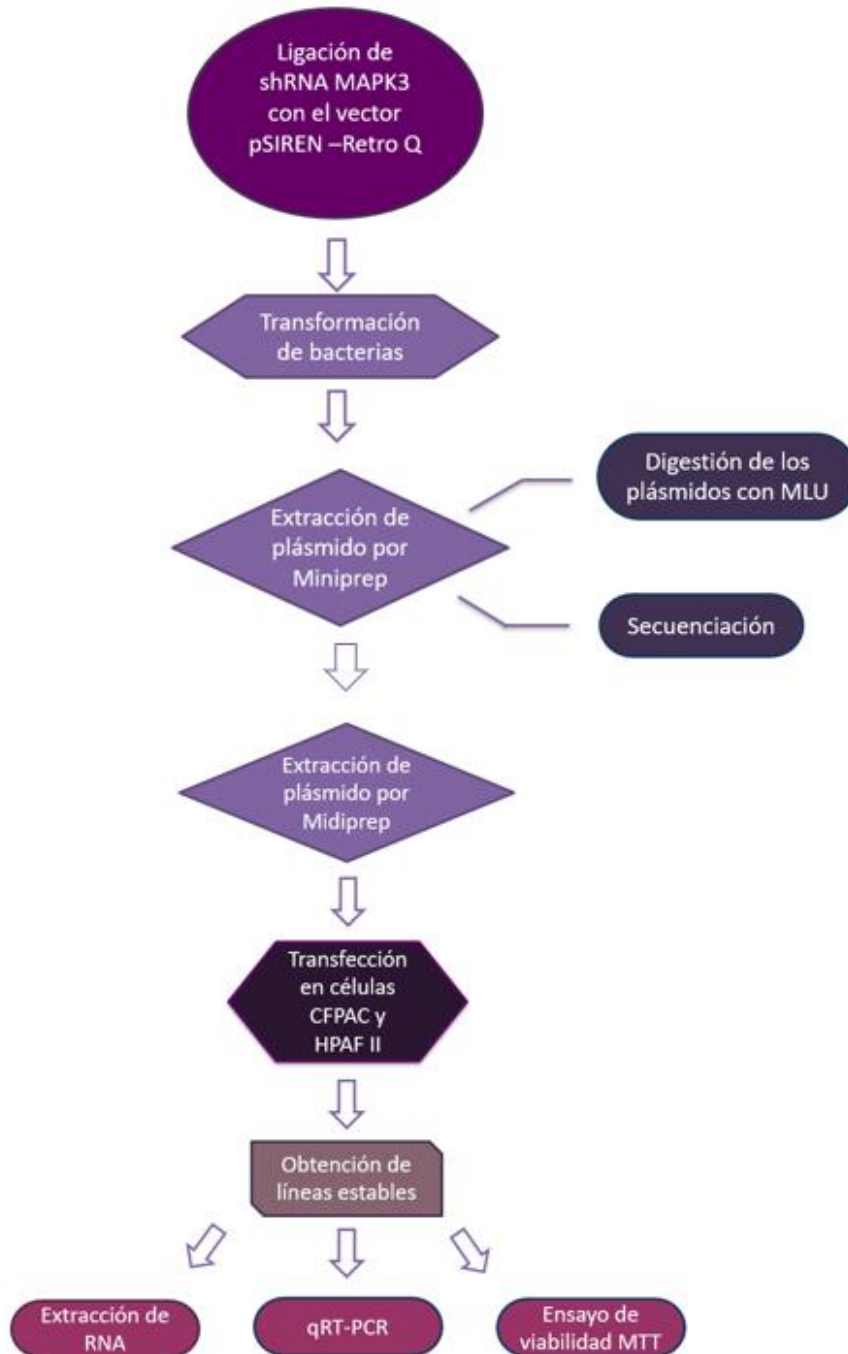
Determinar el efecto de la inhibición de MAPK3 sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de páncreas tratadas con gemcitabina.

2. Objetivos específicos

1. Diseño de un shRNA para silenciar MAPK3
2. Generar líneas celulares estables
3. Evaluar la inhibición de la expresión del mensajero MAPK3 en las células transfectadas utilizando qRT-PCR
4. Evaluar la viabilidad en células transfectadas con el shRNA MAPK3

VII. METODOLOGÍA

Esquema del flujo de trabajo



Cultivo celular

La línea celular CFPAC (Número CRL-1918 TM, ATCC), fue cultivada en Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) al 10 % a 37°C con 5% CO₂, con cambio de medio cada tercer día (Fig.14 A).

La línea celular HPAF II (Número CRL-1997 TM, ATCC); fue cultivada en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C con 5% CO₂, con cambio cada tercer día (Fig.14 B).

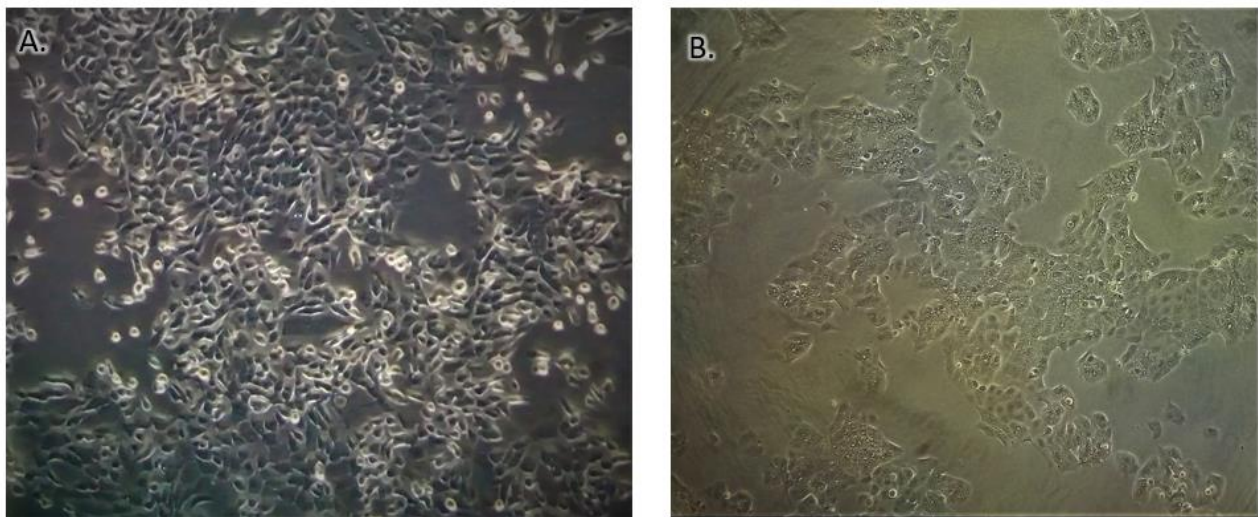


Figura 14. Líneas celulares. Microscopía de campo claro 10x. A) Línea celular CFPAC, 90 % de confluencia. B) Línea HPAF II, 80% de confluencia.

Diseño de Short Hairpin RNA

Los oligos de MAPK3 utilizados fueron diseñados en el laboratorio con la herramienta RNAi designer de Clontech (<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/frontpage.jsp>) (Fig. 15).

Top

BamH1 **Secuencia blanco sentido** Bucle **Secuencia blanco antisentido** MluI
 5'-gatcc**CGACCTTAAGATTTGTGATTTT**CAAGAGAA**AAATCACAAATCTTAAGGTCG**TTTTTT acgCGTg---3'

Bottom

EcoR1
 5'-aatcACGCGTAAAAAA**CGACCTTAAGATTTGTGATTTT**CTCTTGAA**AAATCACAAATCTTAAGGTCG**Cg-3'

Figura 15. Secuencias de los oligos Top y Botton

Los oligonucleótidos sintetizados se resuspendieron en Buffer TE a una concentración de 100 µM. Se mezcló la hebra codificante y complementaria en una proporción 1:1 para obtener una concentración final de 50 µM. La mezcla se llevó a un termociclador para la alineación de los oligonucleótidos donde se realizó el siguiente procedimiento:

Calentamiento a 95° C por 3 segundos para remover la estructura secundaria y promover el alineamiento.

Calentamiento a 72° C por 2 minutos, 37° C por 2 minutos, y finalmente 25° C por 2 minutos, para alineación.

Los oligos shRNA MAPK3 y shRNA Luc se almacenaron a -20°C. El shRNA Luc se utilizó como control, dado que la secuencia se dirige a la luciferasa de la luciérnaga y no tiene homología con ninguna transcripción de mamíferos.

Clonación dirigida del shRNA MAPK3 en el vector pSIREN-Retro Q

En primera instancia se empleó la técnica Midiprep con el Kit HiSpeed Plasmid de QIAGEN para extraer el plásmido de bacterias *Escherichia coli* DH 5 α competentes que contienen el vector RNAi Ready pSIREN-Retro Q.

Una vez obtenido el plásmido se realizó la linearización del vector mediante el corte con dos enzimas de restricción: BamH I y EcoR I (New England Biolabs).

Mezcla de digestión:

Reactivos	Cantidad
DNA del plásmido pSIREN-RetroQ (5µg)	35 µl
Enzima BamH I (20 000 U/ml)	1 µl
Enzima EcoR I (20 000 U/ml)	1 µl
Buffer EcoR I	5 µl
Agua Mili Q	8 µl
Volumen final	50 µl

La reacción se realizó incubando a 37 °C durante 3h.

Purificación del vector

Para determinar si el vector se linearizó, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1%. Utilizamos el marcador de peso molecular 2 log BioRad N3200S. La electroforesis se realizó a 100 volts durante 1h.

Una vez comprobado en el gel la obtención de dos fragmentos uno de 6.4 Kb que corresponden al plásmido linearizado y el otro de 1 Kb que corresponden al gen que no es de interés, se realizó la extracción de DNA con el kit QIAquick Gel Extraction de QIAgen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se cortó el fragmento de DNA del gel de agarosa, se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL en donde se añadieron 3 volúmenes de buffer QG, se incubó en el termo-shaker a 50° C por 15 minutos, transcurrido el tiempo, se agregó 1 volumen de isopropanol. La mezcla se colocó en un tubo de columna de 2 ml proporcionada en el kit y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm.

Se añadieron 750 μ l de buffer PE a la columna, se incubó durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugó 1 min. Posteriormente la columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml en donde se agregaron 30 μ l de agua mili Q al centro de la membrana para eluir el DNA, se incubó por 2 minutos y se centrifugó por 1 minuto, finalmente se guardó en un congelador REVCO a -20° C.

Clonación dirigida del shRNA MAPK3 en el vector pSIREN-RETRO Q

Teniendo el vector pSIREN-RETRO Q linearizado se llevó a cabo la clonación dirigida del oligo de shRNA MAPK3 mediante la siguiente mezcla de reacción:

Reactivos	Cantidad
Plásmido RNAi Ready pSIREN-RetroQ linearizado (25 ng/ μ l)	2 μ l
Oligo shRNA MAPK3 50 μ M	1 μ l
Rapid ligation Buffer 5x	4 μ l
Agua libre de nucleasas	12 μ l
T4 DNA ligasa	5 U/ μ l
Volumen final	20 μ l

Se incubó 1 hora a 22° C en el termoblock y se guardó a 4° C.

*El oligo se diluyó a una concentración de 0.5 μ M.

Transformación de bacterias DH5 α

Para la transformación de bacterias se utilizó el kit TransformAid Bacterial Transformation de Thermofisher (Catalogo K2710). En placas con medio LB sin antibiótico, se sembraron 20 μ L de bacterias *E. coli DH5 α* , se dejaron incubando a 37° C toda la noche.

Se raspo un cuadro de 4x4 mm de bacterias y se colocaron en 1.5 ml de medio C precalentado a 37° C, se incubaron 2 horas a 37° C en agitación a 200

rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, las bacterias se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron durante 1 minuto para obtener un pellet. El pellet se resuspendió en 300 μ l de solución T (Solución A y B) y se incubó en hielo durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó durante 1 min, se eliminó el sobrenadante, el pellet obtenido se resuspendió una vez más en 120 μ l de solución T y se incubó en hielo durante 5 minutos,

Posteriormente en tubos de 500 μ l, se adicionaron 5 μ l de la mezcla de ligación más 50 μ l de las bacterias, se mezcló mediante pipeteo y se incubó en hielo durante 5 minutos. El control no contenía mezcla de ligación eran solo las bacterias competentes. Se plaqueó inmediatamente utilizando un triángulo de vidrio, añadiendo 50 μ l en cajas con medio LB con ampicilina (100 μ g/ μ l) y las cajas se colocaron en la incubadora a 37°C toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron 4 colonias de bacterias y se sembraron en 4 tubos con 3 ml de medio precalentado LB con ampicilina (100 μ g/ μ l), se incubó 16 horas a 37°C con agitación.

Extracción de ADN plasmídico por Miniprep

Para la extracción de ADN plasmídico de las 4 colonias seleccionadas, se realizó la técnica de Miniprep y se utilizó el Kit QIAprep Spin Miniprep (250) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Una vez crecidas las bacterias se congelaron 187 μ l de bacterias con 14 μ l de DMSO al 10% y se guardaron a -70°C hasta su uso. El resto de las bacterias se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 8000 rpm durante tres minutos.

El botón se resuspendió en 250 μ l de buffer P1 que contiene RNAsa, posteriormente se agregaron 250 μ l de buffer p2, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 350 μ l de buffer N3 y se mezcló invirtiendo el tubo, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a la columna y se

volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y la columna se lavó con 750 µl de buffer PE, se dejó incubando por 5 minutos .

Transcurridos los 5 minutos de incubación, se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 13000 por 1 minuto para secar la columna. Posteriormente se colocó la columna sobre un tubo limpio de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de agua miliQ en el centro de la columna, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, una vez teniendo el eluido se llevó a cuantificar en Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) para medir la concentración del DNA. Las muestras se almacenaron en un REVCO a -20°C.

Para verificar la inserción el plásmido se realizó una digestión enzimática con la enzima Mlu I, en donde se añadieron 10 µl del plásmido obtenido, 0.5 µl de enzima Mlu I, 2 µl de buffer 3.0 NEB y 7.5 µl de agua MiliQ, se dejó incubando 3 horas a 37°C. Para comprobar que la secuencia del oligo fuera correcta, se analizó mediante la secuenciación de Sanger en la Unidad de Secuenciación del INMEGEN.

Extracción de ADN plasmídico por Midiprep

Se seleccionó la colonia de la cual se obtuvo mayor rendimiento de ADN plasmídico para realizar la extracción de ADN plasmídico por MidiPrep. Se sembraron por dilución 10 µl de bacterias en cajas de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), las cuales se dejaron crecer durante 16 hr a 37°C. Para el preinóculo, se picó una colonia y se hizo crecer en 3 ml de medio LB Broth líquido con ampicilina, se incubó agitando a 300 rpm durante 8 horas a 37°C.

Posteriormente se tomaron 300 µl del preinóculo y se agregaron a un matraz con 150 ml de medio LB Broth atemperado al cual se le añadieron 150 µl de ampicilina

(100 µg/ml), se dejó crecer 16 horas en agitación a 300 rpm a 37°C. Al día siguiente se cosecharon las bacterias por centrifugación a 6000 X g durante 15 minutos a 4°C; se utilizó el kit HiSpeed Plasmid Purification Handbook, se siguieron las instrucciones del fabricante.

Transfección de células CFPAC y HPAF II con Xfect™

Para ambas líneas celulares se sembraron 3×10^5 células en cajas de cultivo de 35 mm con 2 ml de medio y 10% de suero fetal bovino (SFB). Adicionalmente se sembró un control que corresponde al gen de la Luciferasa clonado en el vector pSIREN-Retro Q con resistencia a puromicina.

Transcurridas 24h post-siembra, se realizó la transfección de las células, utilizando el Kit Xfect Transfection Reagent (cat: 63131 Clontech Laboratory), siguiendo el protocolo de transfección Xfect™ Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance (PT5003-2), se utilizó la proporción 0.75 µl de polímero Xfect: 2.5 µg de DNA del plásmido pSIREN-RetroQ-shMAPK3, se utilizó la misma proporción para el control positivo Luciferasa que se encuentra dentro del vector pSIREN-Retro Q. Se agregaron 900 µl de medio sin SFB a cada caja de células y posteriormente se agregó la mezcla de Xfect dejando incubar 4 horas, transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 2 ml de medio con 10 % de SFB. Las cajas se mantuvieron en incubación a 37° C con 5% de CO₂ por 48 horas.

Obtención de líneas estables

Las células transfectadas con el shRNA MAPK3 y shRNA Luc fueron seleccionadas con puromicina 1µg/ml. Se realizaron cambios de medio cada tercer día hasta que todas las células del control muriera.

Una vez que el 100% de las células control murieron, se dejó de administrar puromicina a las células transfectadas para favorecer el crecimiento de las células seleccionadas y evitar posible generación de resistencia a puromicina.

Extracción de RNA por el método de trizol

Las células transfectadas se sembraron hasta que alcanzaron el 70-80% de confluencia. Posteriormente se realizó la extracción de RNA total de las dos líneas celulares transfectadas con shRNA MAPK3 y shRNA Luc. Las células fueron despegadas con un raspador, resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo y transferidas a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

El pellet se resuspendió en 1 ml de Trizol para lisar las células y se dejó incubando durante 10 minutos, posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo incubando en hielo por 10 minutos para separar la solución en una fase acuosa y una fase orgánica, la fase acuosa que contenía el RNA fue transferida cuidadosamente a un tubo limpio. A este último se le adicionaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN. Se incubó 10 min en hielo y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min. El botón obtenido fue lavado con etanol 70%, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, y por último se resuspendió en 50 µl de agua Elix. EL RNA obtenido fue cuantificado en nanodrop y se verificó la integridad en geles de agarosa al 1% desnaturizante. Se almacenó en un congelador REVCO a -70°C.

Síntesis de ADN complementario

Una vez obtenido el RNA total de las células estables y sus controles, se prosiguió a realizar la síntesis de cDNA mediante RT-PCR utilizando el Kit High Capacity cDNA Reverse Transcripción de Thermofisher número de catálogo 4368814.

Para la reacción se hizo una mezcla con los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
RNA	1000 µg
RT buffer 10x	2 µl
dntps 25x	0.8 µl
Multienzima transcriptasa reversa	1 µl
Agua libre de nucleasas	4. 2 µl
Volumen final	25 µl

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de AB Applied Biosystems; con el siguiente programa : 25 °C 10 min, 37° c 120 min, 85 °C 5 min, 4ª 10 min.

Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

La estandarización de la expresión de MAPK3 se realizó mediante PCR semi-cuantitativo con las siguientes condiciones:

	Programa				40 ciclos	
Temperatura °C	95	95	59	72	72	4
Tiempo	10 m	30 s	30 s	30 s	5 min	α

El qRT-PCR se realizó utilizando el kit Master Mix SYBR® Green (Applied Biosystems) en el equipo 7900 HT Fast Real TIME PCR-Systems (Applied Biosystems).

Para la reacción se utilizó un Master Mix con los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad
Master Mix	10 µl
Primer Forward MAPK3 10 µM	0.3 µl
Primer Reverse MAPK3 10 µM	0.3 µl
H ₂ O libre de nucleasas	8.4 µl
Volumen final	20 µl

La secuencia de los primers para MAPK3 es la siguiente:

Forward : ACACGCAGTTGCAGTACATC

Reverse: TGGCAGTAGGTCTGATGTTTCG

Como gen constitutivo se utilizó PPIA dado que la expresión fue constante en células CFPAC-1 y HPAF II a comparación de otros genes constitutivos, la secuencia es la siguiente:

Forward: ATGCTGGACCCAACACAAAT

Reverse: TCTTTCACCTTTGCCAAACACC

Condiciones de amplificación

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación de UDG	50 °C	2 min	Mantener
DNA polimerasa AmpliTaq [®] , Activación de UP	95 °C	2 min	Mantener
Desnaturalización	95°C	15 s	40
Alineamiento/Extensión	60 °C	1 min	

Determinación de la viabilidad celular mediante reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en células CFPAC y HPAF-II

Para la determinación del IC 50 de las dos líneas celulares CFPAC-1 y HAPF II sin transfectar, se sembraron 5×10^3 células por pozo en una placa de 96, las células se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado técnico donde se sembraron en tres pozos para cada concentración y triplicado biológico donde se repitió lo mismo en cada placa de 96 pozos. 24h post siembra, las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de gemcitabina (gemcitabine hydrochloride # 014M4719 de SIGMA) : 0.1 µM, 1 µM, 1.5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM y 1000 µM .

Para la línea celular CFPAC-1 el tratamiento se siguió a 72 horas, mientras que para HPAF II se siguió a 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas.

Transcurrido el tiempo de tratamiento con gemcitabina, se desechó el medio y se agregaron 100 µl de medio DMEM sin rojo fenol y sin L-glutamina con MTT 5 mg/ml por pozo, se incubó 4 horas a 37 °C y 5 % de CO₂, transcurrida la

incubación, se retiró el medio con MTT, se agregaron 100 μ l de DMSO y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min o hasta que los cristales de formazan se encontraron disueltos. La absorbancia se midió en un lector de placas Elisa Epoch Biotek, a una longitud de onda de 540 nm.

Una vez que se obtuvo el IC₅₀ de las células sin transfectar, se hicieron los ensayos de viabilidad para las células transfectadas con shRNA MAPK3, para la línea CFPAC-1 el tratamiento con gemcitabina se siguió a las 48 horas, mientras que para HPAFII fue a las 72 horas.

VIII. RESULTADOS

Corte del plásmido pSIREN-retro Q con enzimas de restricción BamH I y EcoR I

Para linearizar el vector pSIREN-retro Q, se realizó una digestión con las enzimas de restricción BamH I y EcoR I. Dicha digestión nos permitió liberar un fragmento de aproximadamente 1 Kb clonado previamente en el vector pSIREN-Retro Q .

En la figura 16 se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder, en el segundo carril el vector no digerido para tenerlo como referencia antes del corte enzimático y en el tercer carril se muestran dos bandas con un peso de 6.4 Kb el cual correspondió al vector pSIREN-Retro Q, mientras que el segundo fragmento de 1 Kb corresponde al fragmento liberado.

Una vez que se obtuvieron los dos fragmentos en el gel, se procedió a la purificación del DNA de la banda correspondiente al vector. El rendimiento obtenido fue de 4 µg.

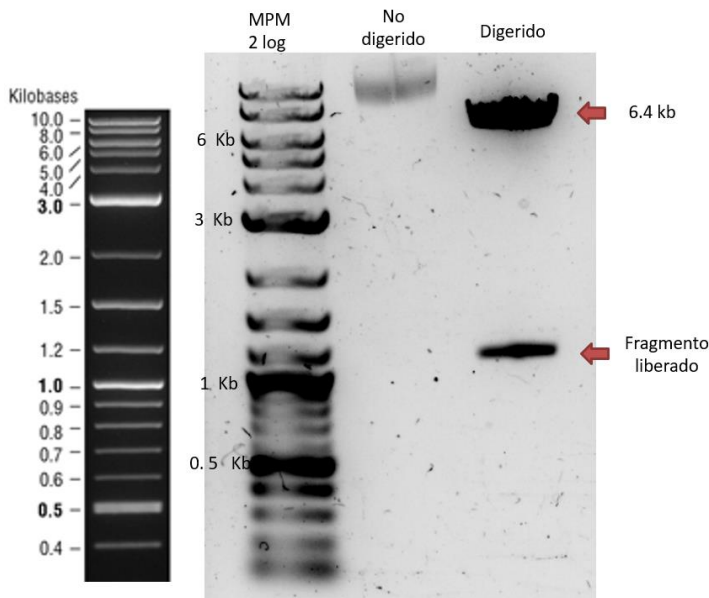


Figura 16. Digestión enzimática con BamH I EcoR I

Ligación del vector pSIREN-RETRO Q

Una vez teniendo el vector linearizado con los cortes de BamH I EcoR I y purificado se procedió a ligación de los oligos alineados del shRNA MAPK3 en el vector pSIREN-RETRO Q (Fig. 17).

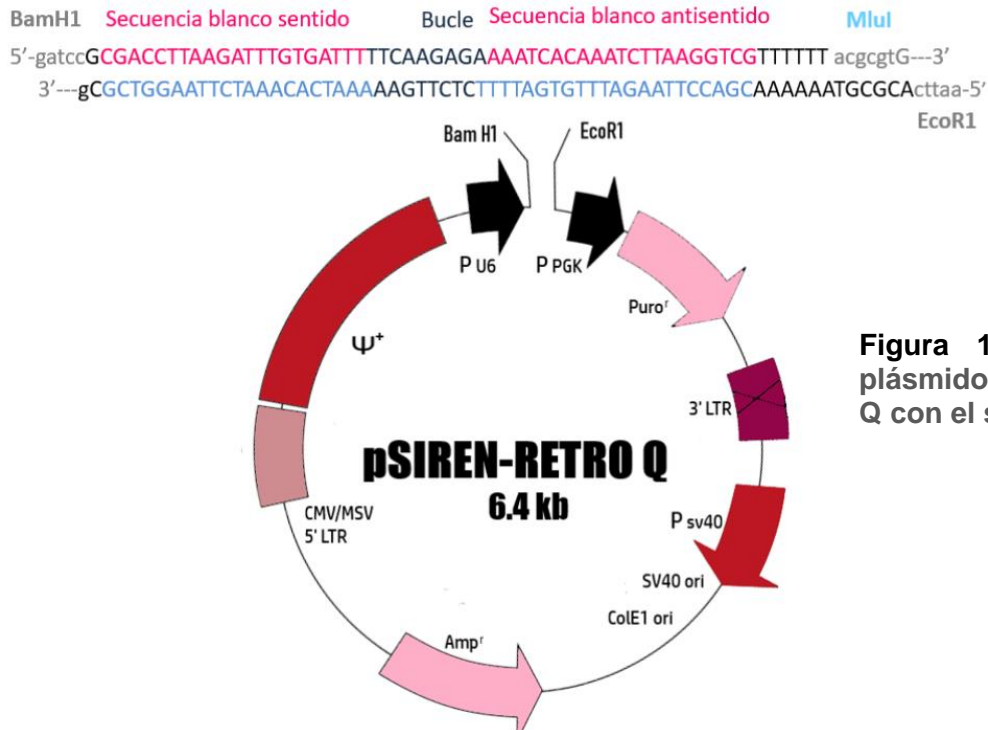


Figura 17. Ligación del plásmido pSIREN -RETRO Q con el shRNA MAPK3.

Transformación de bacterias DH5 α

Con las ligaciones anteriores se transformaron las bacterias competentes, las cuales se crecieron en las cajas de medio LB con ampicilina debido a que el vector le proporcionó resistencia al antibiótico. Al día siguiente se observaron las cajas y se verificó que en los controles negativos hubiera menos colonias que en aquellas bacterias que contenían la ligación. De estas últimas cajas, se seleccionaron cuatro colonias que estuvieran aisladas o que no tuvieran colonias satélite (Fig. 18)

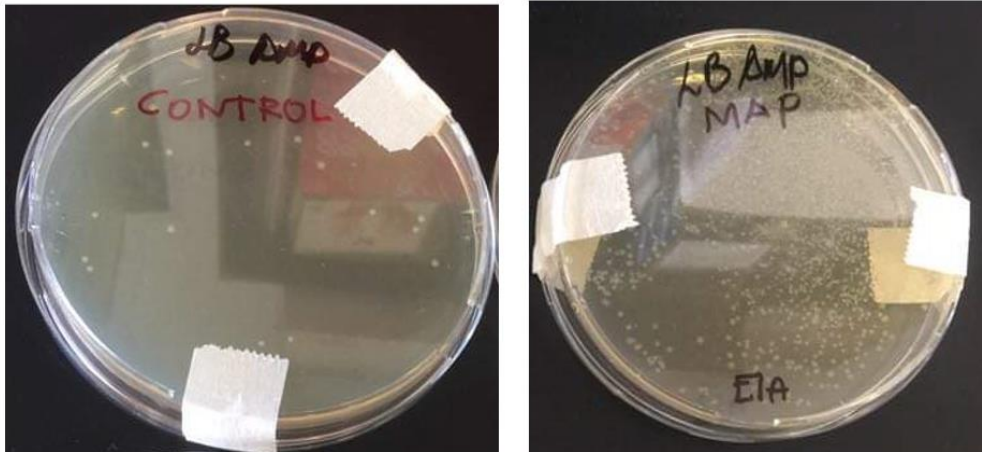


Figura 18. Placas de Lb con ampicilina. A) Bacterias transformadas con el vector vacío (Control) ; B) Bacterias con el inserto MAPK3.

Extracción de plásmido

Se seleccionaron las 4 colonias para realizar MiniPrep y la digestión enzimática con Mlu I los rendimientos se reportan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cuantificación de MiniPrep

Muestra	µg	260/280	260/230
MAPK3-1	10.06	1.90	1.33
MAPK3-2	9.84	1.96	2.13
MAPK3-3	8.02	1.93	2.15
MAPK3-4	7.9	1.94	2.14

Digestión con Mlu I

Para comprobar que el shRNA se integró al plásmido, la construcción se cortó con la enzima de restricción Mlu I, debido a que en el diseño de los shRNA se adicionó la secuencia ACGC que es reconocida por esta enzima. Así se esperaba la digestión sólo de aquellas colonias con el shRNA clonado en el vector.

Para verificar que se realizó el corte se separaron los fragmentos de DNA. En un gel de agarosa al 1.5%, en la figura 19 podemos ver que el primer carril corresponde a el marcador de peso molecular, en el segundo el plásmido sin digerir de la colonia 1, en el tercero, el plásmido digerido colonia 1 y así sucesivamente. Se muestra dos de las tres conformaciones del plásmido, circular relajado y super enrollado, la conformación circular cerrado no fue posible de observar (Fig. 19).

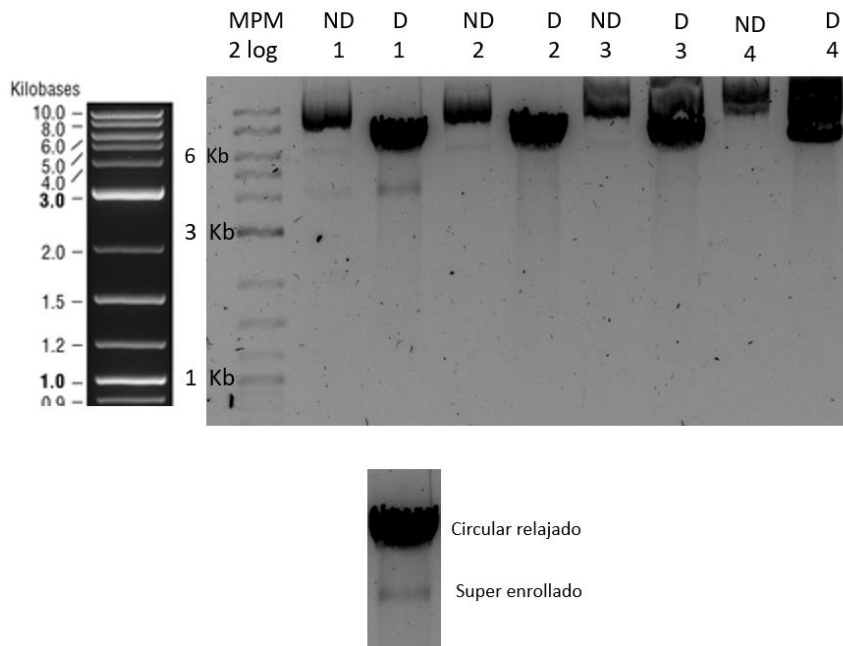


Figura 19. Digestión del plásmido con la enzima de restricción Mlu I.

Secuenciación

Una vez que se verificó esta digestión el vector se mandó a secuenciar para ver que no hubiera alteraciones en la secuencia del shRNA. En el siguiente cromatograma se observa que la secuencia del inserto si corresponde a la secuencia del shRNA MAPK3 (Fig.20).

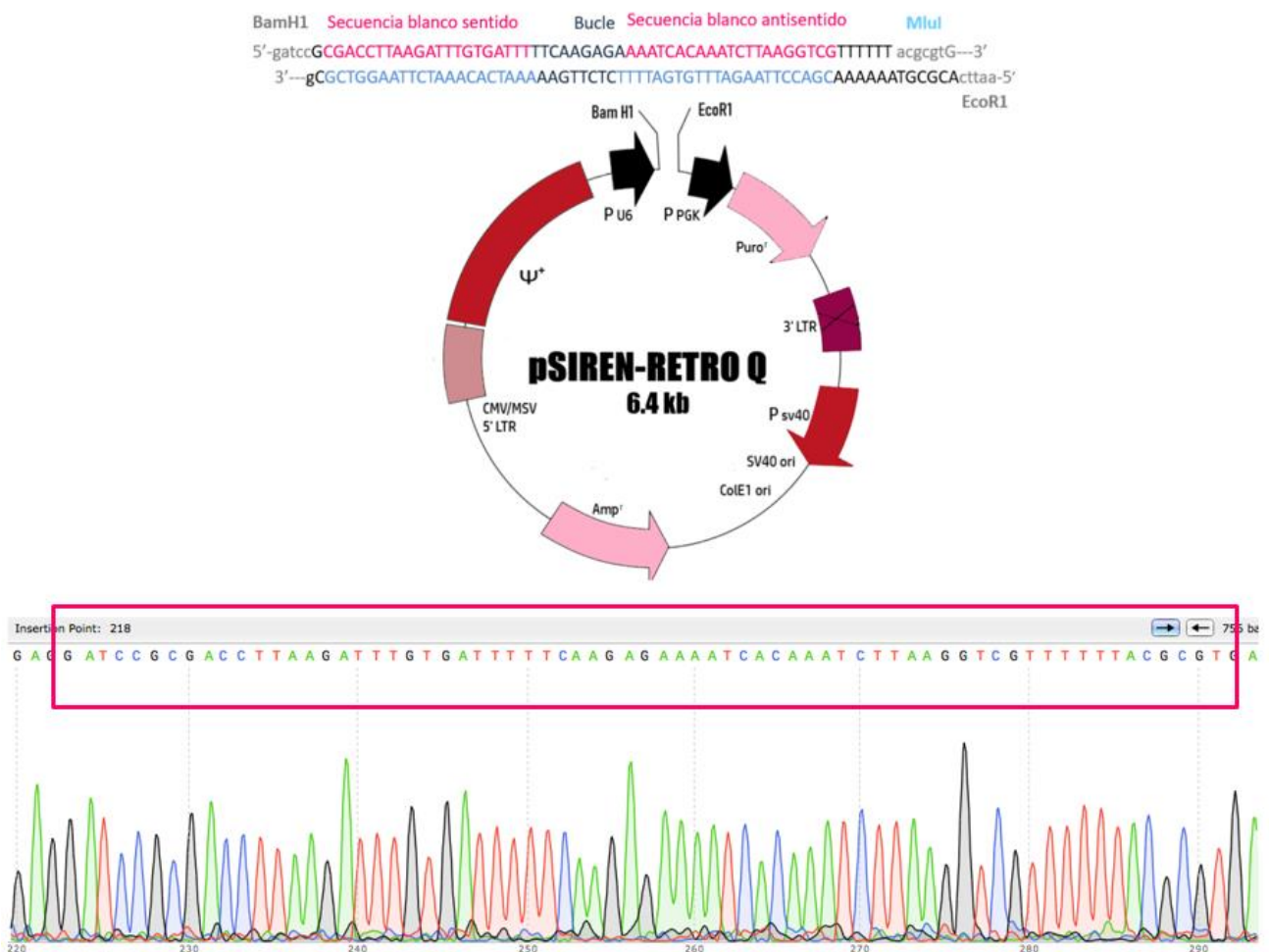


Figura 20. Secuenciación del shRNA-MAPK3 insertado en el vector pSIREN-RETRO Q. Se muestra la secuencia de shRNA-MAPK3 encerrada en un cuadro rosa en el electroferograma.

Estandarización del RT-PCR para MAPK3

Se utilizó cDNA a partir de RNA total de las células para realizar la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), donde se buscaba las condiciones óptimas para la amplificación de MAPK3, el producto esperado es de 124pb (Fig.21). Solo se presento un producto de amplificación

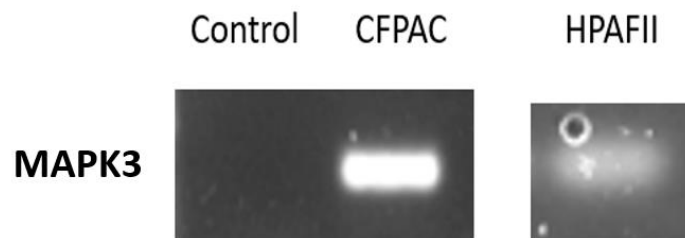


Figura 21. Estandarización de RT-PCR MAPK3. Se muestra un control negativo, es decir que no contiene cDNA, para corroborar que lo que se está observando sea expresión del gen y no por alguna contaminación. En la línea celular CFPAC se observa una banda más nitida con 40 ciclos, en cambio la línea celular HPAFII con 35 ciclos apenas logra visualizarse, por lo tanto se estableció que la condición ideal para la amplificación de MAPK3 son 40 ciclos.

Expresión del RNA mensajero

Posterior a la estandarización del PCR semicuantitativo se extrajo el RNA de las líneas celulares estables de CFPAC y HPAF II con el shRNA de MAPK3, se utilizó como control el shRNA Luciferasa y se realizó un análisis mediante qRT-PCR para determinar la expresión de MAPK3, el RNA mensajero fue normalizado y se utilizó el gen constitutivo Peptidilprolil isomerasa A (PPIA). Como resultado se obtuvo una disminución de la expresión del mensajero del 66 % en las células CFPAC y de 54% en HPAF-II (Fig. 22 y Fig. 23). Es importante añadir que solo se hicieron

tres replicas técnicas y ninguna biológica, por lo tanto no es posible hacer análisis estadísticos.

Inhibición de MAPK3 en la línea celular CFPAC-1

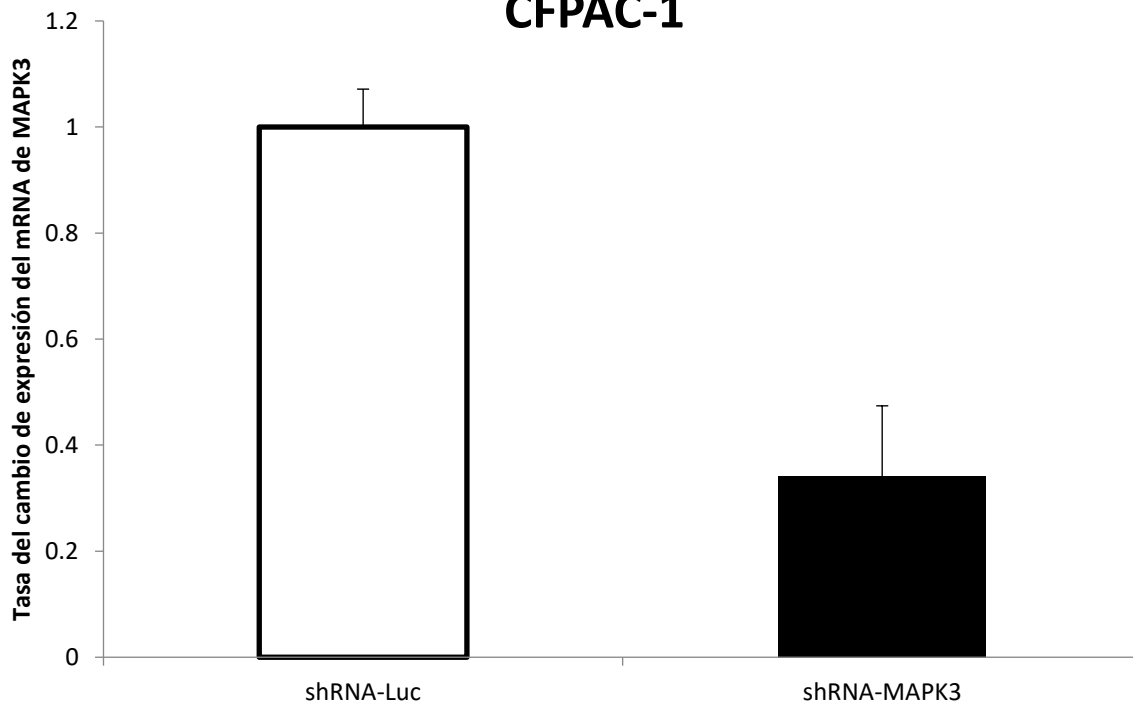


Figura 22. Expresión de MAPK3 en CFPAC. Los niveles de expresión de MAPK3 fueron analizados por qRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta CT}$). La $2^{-\Delta\Delta CT}$ indica que el cambio de expresión de MAPK3 comparados con shRNA-Luc fueron de 0.341.

Inhibición de MAPK3 en la línea celular HPAF II

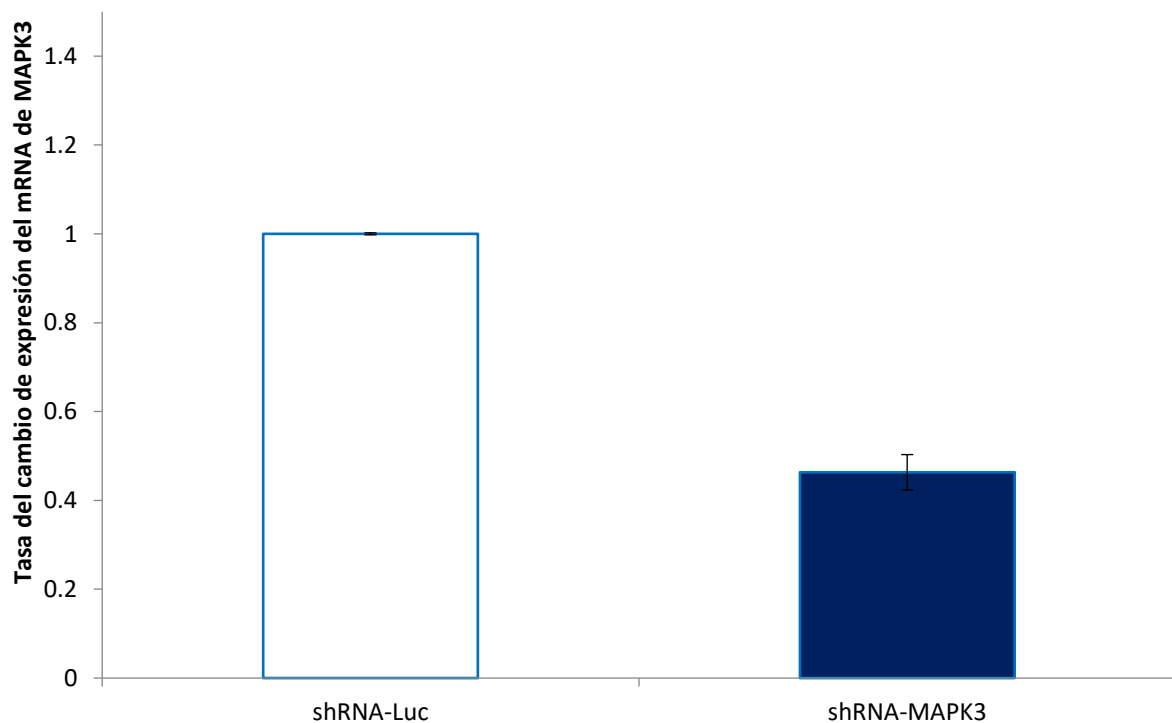


Figura 23. Expresión de MAPK3 en HPAF II. Los niveles de expresión de MAPK3 fueron analizados por qRT -PCR ($2^{-\Delta\Delta CT}$). La $2^{-\Delta\Delta CT}$ indica que el cambio de expresión de MAPK3 comparados con shRNA-Luc fueron de 0.463

Viabilidad celular

Una vez que se observó que el shRNA MAPK3 redujo la expresión de MAPK3, lo siguiente fue determinar si esta afectaría la viabilidad de las células. Previos reportes indican que la MAPK3 participa en diversos procedimientos como proliferación diferenciación y progresión del ciclo celular.

En la línea CFPAC-1 fue evidente el cambio de la morfología de las células al ser tratadas con gemcitabina, lo cual asumimos es debido al efecto del fármaco, ya

que al ser administrado a una concentración de 1000 μM , las células forman cuerpos apoptóticos (Figura 24).

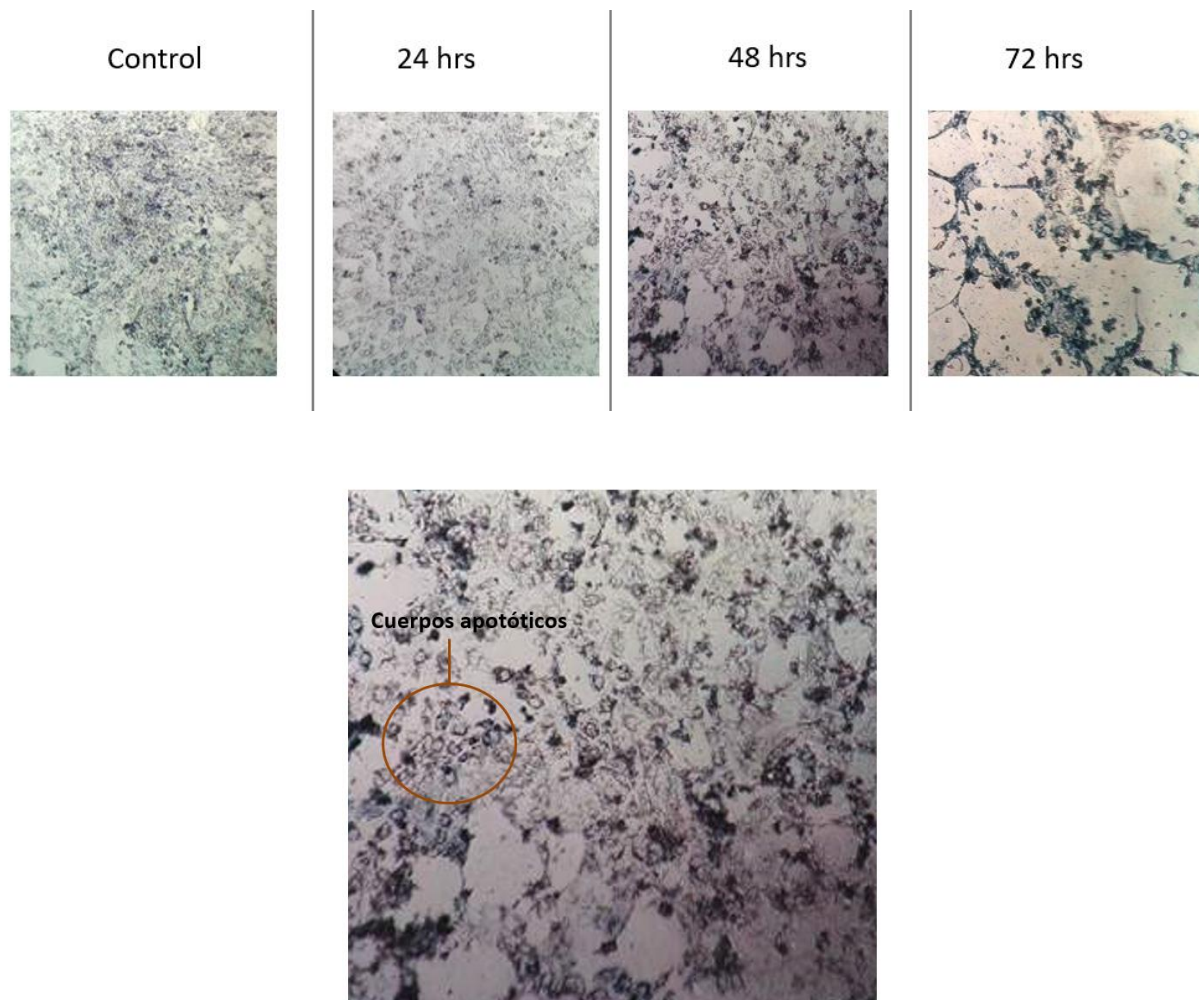


Figura 24. Viabilidad celular en CFPAC-1 tratadas con gemcitabina a 1000 μM . Células expuestas al ensayo de MTT antes de hacer la lectura en el lector de elisa A) Microscopia de campo claro a 40X, se observa que hay un cambio en la morfología conforme pasa el tiempo B) Formación de cuerpos apoptóticos de células tratadas a 48

Se determino el valor de la IC50 de las celulas CFPAC-1 sin transfectar que fue de 1 μM , a las 72 horas de tratamiento con gemcitabina (Figura 25). También se determinó a 24 y 48 horas, sin embargo, no se observaron cambios. Para las tres pruebas se hicieron solo replicas tecnicas.

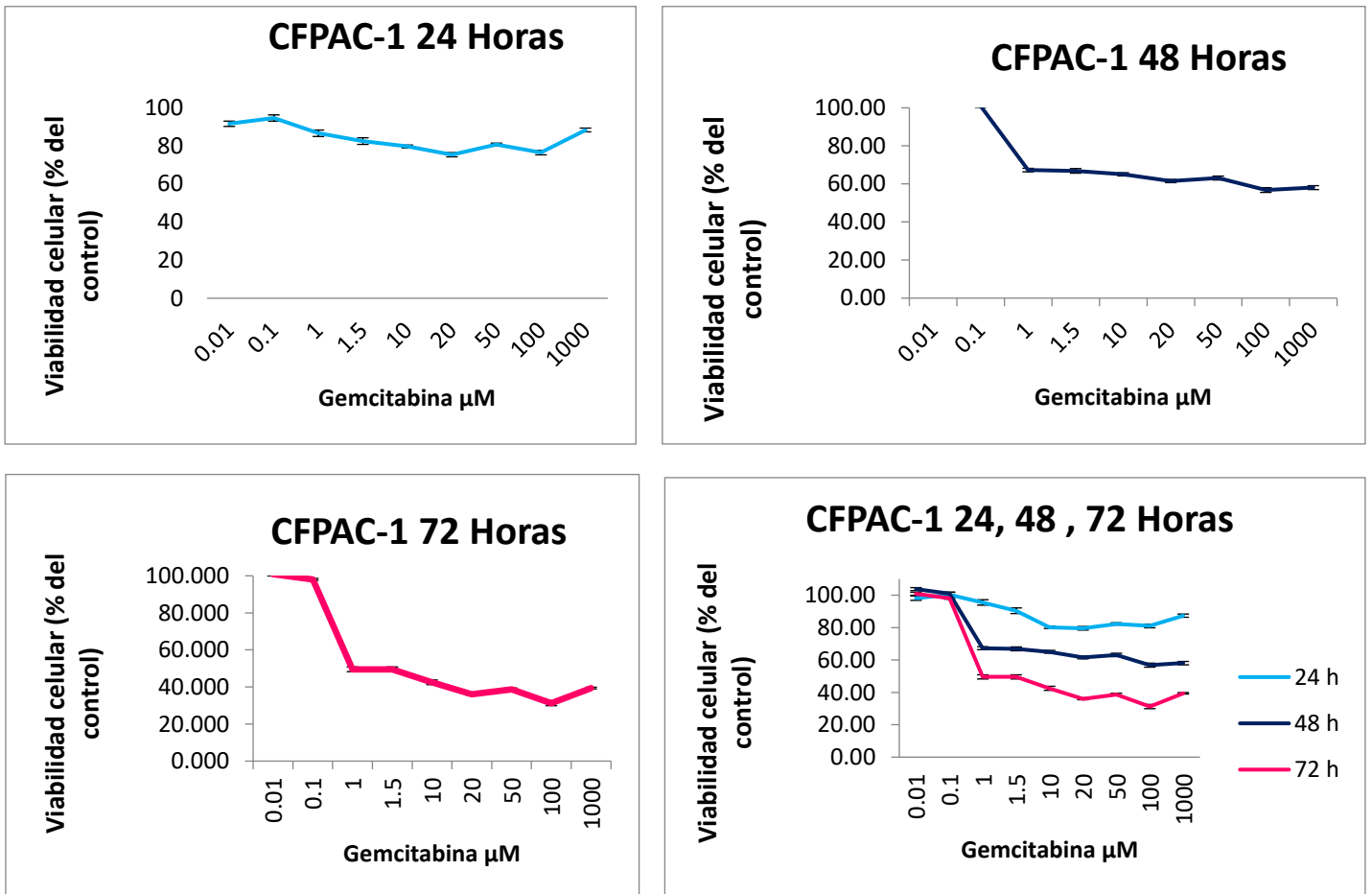


Figura 25. Viabilidad celular en CFPAC-1 sin transfectar. Se muestra diferentes graficas a 24, 48, 72, 96 horas. Se muestra que a 72 horas se logra determinar el IC 50 a 1 μM . En el eje de las “Y” se muestra el porcentaje de viabilidad con respecto al control, mientras que en el eje de “X” representa las diferentes concentraciones de gemcitabina administrada.

Para las células CFPAC-1 transfectadas con el shRNA MAPK3 se observó una mayor sensibilidad al fármaco comparado con el shRNA Luc, además de que éstos valores se obtuvieron a sólo 48 horas de tratamiento con gemcitabina (Figura 26). Los análisis estadísticos muestran una $p < 0.001$ lo cual indica que hay diferencias estadísticamente significantes.

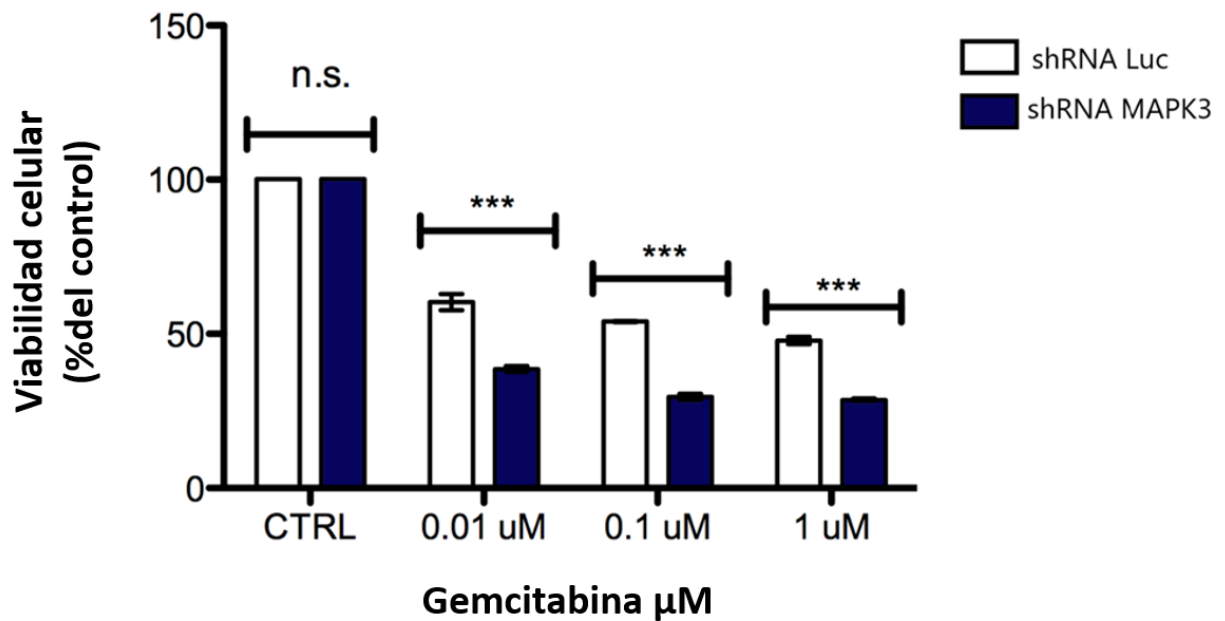
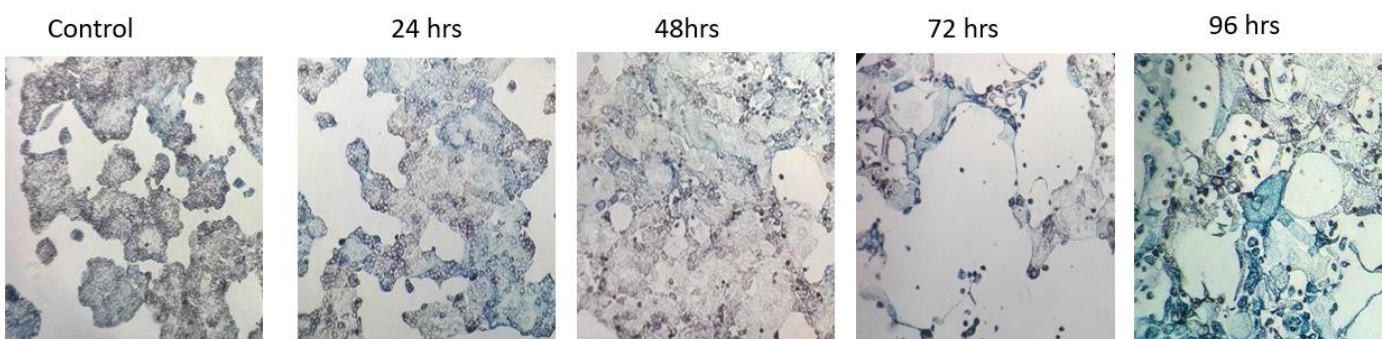


Figura 26. Viabilidad celular en CFPAC transfectadas. En el eje de la “Y se presenta el porcentaje de viabilidad celular, mientras que en el eje de las “X” representa las diferentes concentraciones de gemcitabina a las 48 horas. Se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías reportando los valores-p. *** $p < 0.001$, , n.s. no significativo.

Para la línea celular HPAFII parental, la IC50 determinada fue de 1 μ M a 96 horas de tratamiento con gemcitabina, se puede observar un cambio en la morfología de las células y cuerpos apoptóticos (Figura 27 y Figura 28). En las células transfectadas con el shRNA MAPK3 se logra ver que existe una sensibilidad al fármaco puesto que a las 72 horas después del tratamiento se observa una menor viabilidad celular al hacer el ensayo de MTT (Figura 29), sin embargo, los análisis estadísticos no son significativos.

A)



B)

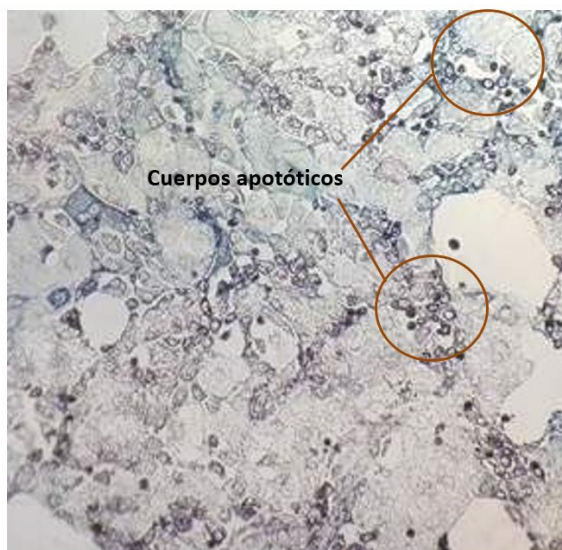


Figura 27. Viabilidad celular en HPAF II tratadas con gemcitabina a 1000 μ M. Células expuestas al ensayo de MTT A)Microscopía de campo claro a 40X, se observa que hay un cambio en la morfología conforme pasa el tiempo B) Formación de cuerpos apoptóticos de células tratadas a 48 horas.

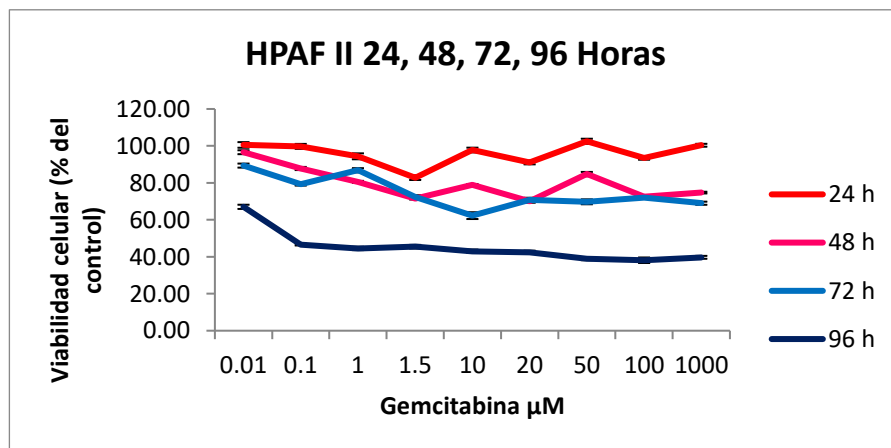
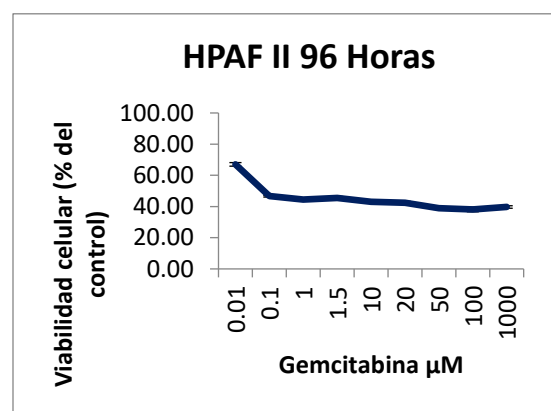
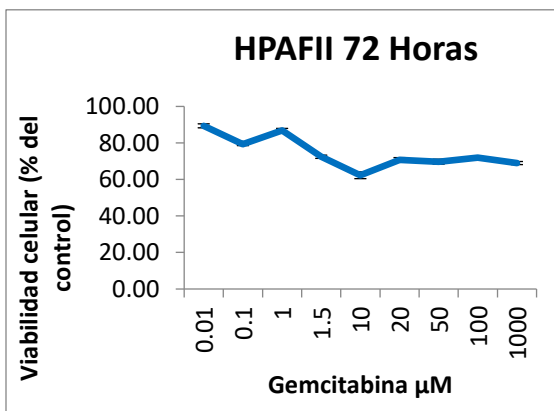
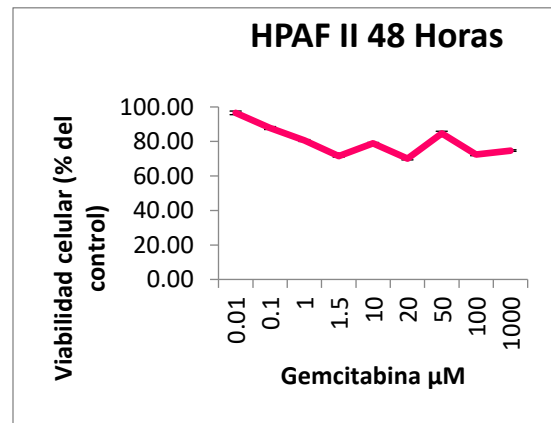
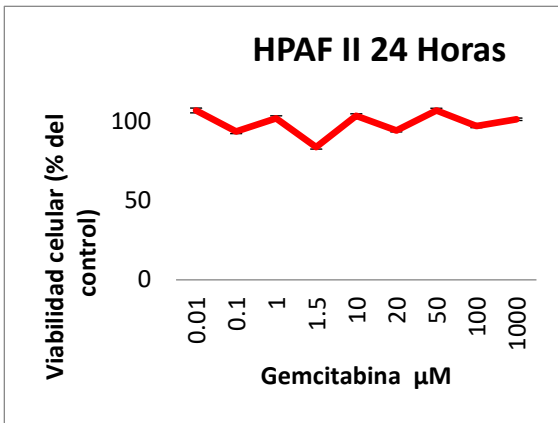


Figura 28. Viabilidad celular en HPAF II sin transfectar. Se muestra diferentes graficas a 24, 48, 72 y 96 horas. Se observa que a las 96 horas se logra determinar el IC 50 a 1 μM . En el eje de las “Y” se muestra el porcentaje de viabilidad con respecto al control, mientras que en el eje de “X” representa las diferentes concentraciones de gemcitabina administrada.

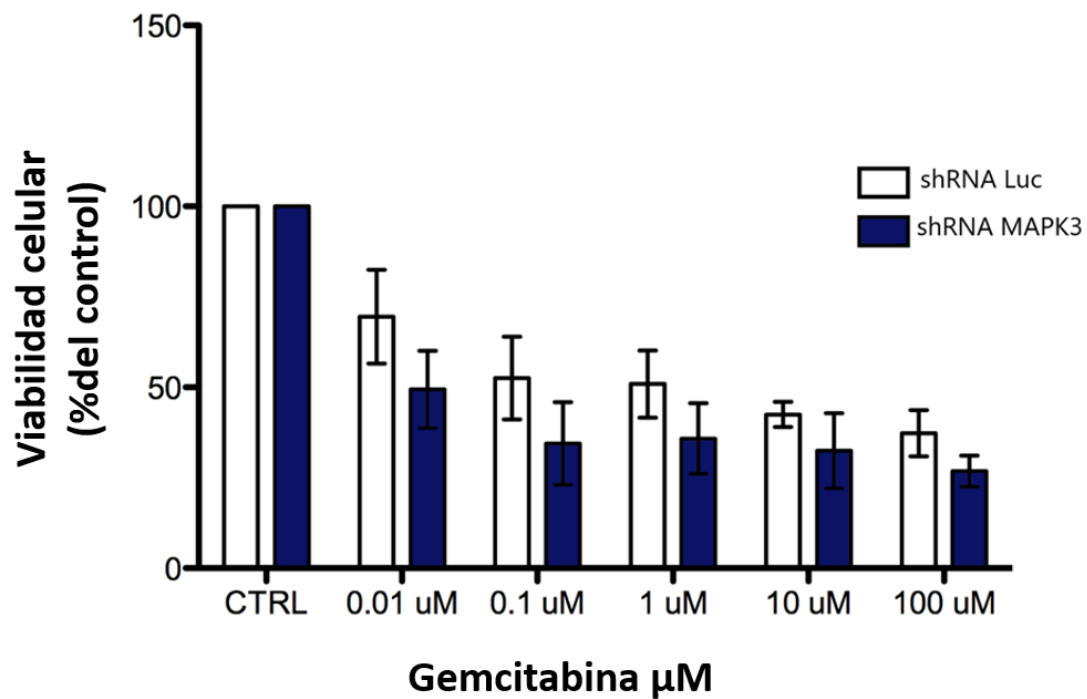


Figura 29. Viabilidad celular en HPAF II transfectadas, En el eje de la “Y se presenta el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control, mientras que en el eje de las “X” representa las diferentes concentraciones de gemcitabina a las 72 horas. Se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías, no se encontraron resultados significativos

IX. DISCUSIÓN

La proteína cinasa 3 activada por mitógeno (MAPK3) o también conocida como cinasa regulada por señal extra celular (ERK 1), actúa en varios procesos celulares como proliferación, diferenciación y progresión del ciclo celular en respuesta a diversos estímulos (Tuncay & Banerjee, 2010). Además se ha reportado un papel activo en las vías de señalización de ERK y mTOR que están involucradas en diversos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de páncreas. Cabe añadir que la activación de ERK1/2 es crucial para la inducción de ciclina D1, la cual es esencial para G1 en la progresión de la fase S en el ciclo celular, además en cáncer de páncreas la vía ERK1/2 se encuentra alterada y está involucrada con la quimioresistencia a gemcitabina (Tuncay & Banerjee, 2010, Zheng, Jiao, & Sun, 2013).

Ahora bien, resultados previos en el laboratorio sugieren que la sobre expresión de MAPK3 en diversas líneas de cáncer dentro de las cuales se encuentra páncreas, presentan una quimioresistencia al ser tratadas con gemcitabina. Por lo tanto, la importancia de este estudio es conocer el papel de MAPK3 en la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer de páncreas CFPAC-1 y HPAFII al inhibir esta cinasa.

Una vez obtenidas las líneas celulares estables para el shRNA-MAPKE CFPAC-1 y HPF II, se hizo la reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), donde se mostró que el cambio de la expresión ($2^{-\Delta\Delta CT}$) normalizado con PPIA indica que la inhibición fue de un 66 % en la línea celular CFPAC-1 Fig. 22, mientras que para HPAF II el porcentaje de inhibición es de 54 % Fig. 23. Estos datos indican que la inhibición de MAPK3 no fue total, sin embargo esta disminución parece ser suficiente para que las células de HAPF II y CFPAC-1 fueran mas sensibles al ser tratadas con gemcitabina. Esto concuerda con el

hecho de que MAPK3 es un gen importante en la vía de señalización de las MAPK, la cual esta alterada en cáncer de páncreas y apoya la hipótesis planteada.

Inicialmente se estableció el valor del IC 50 con gemcitabina para las líneas celulares CFPAC-1 y HPAF II sin ser transfectadas, y se observó que a las 72 horas posterior al tratamiento con gemcitabina, el IC 50 es de 1 μ M para la línea celular CFPAC-1 (Figura 25), sin embargo, en la línea celular HPAF II, el efecto del tratamiento con gemcitabina fue más prolongado ya que el IC50 fue de 1 μ M a las 96 horas (Figura 28), lo cual indica que la línea celular CFPAC-1 es más sensible a gemcitabina, que la línea celular HPAF II, debido posiblemente al tipo de tejido de donde son extraídas, y por lo tanto existan otros factores moleculares diferentes a los de la línea celular HPAF II que estén interviniendo en la respuesta a gemcitabina (Deer, *et. al.*, 2010)

Ahora bien, una vez que se estableció el valor del IC 50 de las dos líneas celulares, se realizaron los ensayos de viabilidad con las células transfectadas con el shRNA MAPK3. Los resultados muestran que al inhibir a la cinasa MAPK3 poseen una mayor sensibilidad al ser tratadas con gemcitabina, ya que para ambas líneas celulares se observa una tendencia a disminuir la viabilidad celular. Para la línea celular CFPAC-1 los análisis estadísticos muestran diferencias estadísticamente significativas, lo que indicaría que a pesar de que la inhibición de MAPK3 fue de un 66 % fue suficiente para incrementar la sensibilidad al tratamiento con gemcitabina, sin embargo, en el caso de la línea celular de HPAF II a pesar de que se observa la misma tendencia a disminuir la viabilidad celular cuando MAPK3 esta inhibida, los análisis estadísticos no muestran que sean significativo. Se puede ver en la gráfica (Fig. 29) la tendencia a disminuir claramente, sin embargo, el error estándar es más alto y para corregir esto probablemente sería aumentar el número de réplicas biológicas.

MAPK3 está involucrada en la vía de señalización ERK 1/ 2, la cual está implicada en el control de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Estudios

han demostrado que la activación de ERK 1/ 2 confiere una quimioresistencia a gemcitabina en líneas células de cáncer de páncreas BxPC3, sin embargo, el mecanismo aun no es claro. No obstante, al inhibir ERK 1/ 2 se demostró que hay una mayor sensibilidad a gemcitabina, provocando que estas células entren a la vía de apoptosis intrínseca (Wang, *et. al*, 2015). Este estudio se relaciona con lo que se está observado en el presente trabajo, dado que la inhibición de MAPK3 provocó que las células fueran más sensibles a gemcitabina, lo cual podría indicar que en efecto la vía de señalización de ERK1/2 está implicada en la resistencia a gemcitabina, y que MAPK3 podría jugar un papel clave en la fosforilación de factores de transcripción, aunque faltarían experimentos adicionales para corroborar dicha hipótesis.

Otros estudios también han demostrado que la combinación de gemcitabina con un inhibidor de ERK 1/ 2 en líneas celulares de cáncer de páncreas BxPC3, PANC-1 promueve la apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral (Zheng, Jiao, & Sun, 2013). Por lo cual podemos decir que el tratamiento con gemcitabina en ambas líneas celulares concuerda con el reporte en donde se observa una relación entre el fármaco y la viabilidad celular y aunando a esto la participación de MAPK3

Por otro lado sería necesario realizar más ensayos de viabilidad celular para la línea HAPF II para corroborar que la inhibición de MAPK3 afecta la sensibilidad al ser tratadas con gemcitabina. Otro ensayo adicional sería realizar xenotrasplantes en el modelo de pez cebra, ya que dadas sus ventajas de desarrollo embrionario, se podría observar *in vivo* si al inyectar estas líneas celulares, CFPAC-1 y HPAF II, con el gen MAPK3 inhibido formarían tumores, o en caso que se forme algún tumor, como reaccionaría este al ser tratado con gemcitabina y así corroborar los resultados obtenidos en modelos de cultivo celular.

X. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron líneas celulares estables transfectadas con el shRNA- MAPK3.
- La inhibición de la expresión del mensajero MAPK3 en las células transfectadas CFPAC-1 y HPAF II fue de 66 % y 54 % respectivamente.
- El silenciamiento de MAPK3 sensibiliza a las células CFPAC-1 y HAPF II al antitumoral gemcitabina.

XI. PERSPECTIVAS

- Realizar xenotransplantes en el modelo de pez cebra para evaluar el desarrollo tumoral.
- Tratar con gemcitabina y utilizar un inhibidor farmacológico u otro shRNA(o combinados) de MAPK3 en embriones de pez cebra con tumores de líneas celulares de cáncer de páncreas.
- Evaluar otras posibles cinasas que estén involucradas en la resistencia a gemcitabina en cáncer de páncreas.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamskaa, A., Elaskalan, O., Emmanouilidia, A., Kima, M., Abdol, N., Metharomb, P., & Falasca, M. (2018). Molecular and cellular mechanisms of chemoresistance in pancreatic cancer. *Advances in Biological Regulation*, 77-87.
2. Adamson, E. (1987). Oncogenes in development. *JOURNAL ARTICLES*, 449-471.
3. Aktipis, A., Boddy, A., & Gatenby, R. (2013). Life history trade-offs in cancer evolution. *NATURE REVIEWS*, 883-892.
4. Al-Hader, A., Al-Rohil, R., Han, H., & Von Hoff, D. (2017). Pancreatic acinar cell carcinoma: A review on molecular profiling of patient tumors. *World Journal Gastroenterology*, 7945-7951.
5. Amrutkar, M., & Gladhaug, I. (2017). Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers*, 1-23.
6. Anselmo, C., Silva, A., Alves, C., Alves, A., Lima, S., Cardoso, E., . . . Macedo, M. (2017). Solid pseudopapillary tumor of the pancreas: Clinical features, diagnosis and treatment. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 219-223.
7. Bardeesy, N., & Dephino, R. (2002). Pancreatic Cancer Biology and Genetics. *Nature Reviews Cancer*, 897-909.
8. Binenbaum, Y., Na'ara, S., & Gil, Z. (2015). Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resistance Updates*, 55-68.
9. Boon, H., & Zhang, Y. (2016). Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune Network*, 85-98.
10. Bohnsack, M., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 185-191.
11. Boron, W., & Boulpaep, E. (2012). Medical Physiology. En C. Marino, & F. Gorelik, *PANCREATIC AND SALIVARY GLANDS* (págs. 912-931). Philadelphia: Saunders Elsevier.
12. Brandan, N., Aguirre, V., Todaro, J., Stoyanoff, T., Heitrich, M., & García, D. (2014). Genética del Cáncer Protoógenes y Genes Supresores de Tumores. Facultad de Medicina y Bioquímica: Universidad Nacional del Noroeste.
13. Brandan, N., Llanos, I., Miño, C., & Rodríguez, A. (2011). *Hormonas pancreáticas*. Obtenido de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hpancreas.pdf>
14. Burotto, M., Chiou, V., & Min, J. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*, 3446-345.
15. Carrera, S., Sancho, A., Azkona, E., Azkuna, J., & Lopez, G. (2017). Hereditary pancreatic cancer: related syndromes and clinical perspective. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 1-9.
16. *Cell Signaling Technology*. (2019). Obtenido de Human Oncogenes & Tumor Suppressor Genes: <https://www.cellsignal.com/contents/resources-reference-tables/human-oncogenes-amp-tumor-suppressor-genes/science-tables-oncogene>

17. Chial, H. (2008). *Nature Education*. Obtenido de Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/proto-oncogenes-to-oncogenes-to-cancer-883>
18. Cicenás, J., Kvederaviciute, K., Meskinyte, I., Meskinyte, E., & Skeberdyte, A. (2017). KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 1-8.
19. Cooper, G. (2000). Tumor Suppressor Genes. En *The Cell: A Molecular Approach* (pág. 625). Boston University: Sinauer Associates. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9894/>
20. Cullen, B. (2005). RNAi the natural way. *Nature Genetics*, 1163-1165.
21. Deer, E., Gonzalez, J., Coursen, J., Shea, J., Ngatia, J., Scaife, C., . . . Mulvihill, S. (2010). Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. 1-24.
22. Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A., & Klöppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World Journal Gastroenterology* , 13833-13841.
23. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., & Kostas , S. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 806–811.
24. GLOBOCAN. (12 de Septiembre de 2018). *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries* . Obtenido de <https://gco.iarc.fr/today/home>
25. Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 646-674.
26. Hruban, R., & Fukushima, N. (2007). Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. *Modern Pathology*, 61-70.
27. Huang , P., Chubb, S., Hertel, L., & Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-Difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. *CANCER RESEARCH*, 61 10-6117.
28. Husain, K. (2014). Pancreatic Cancer Treatment. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*, 1-5.
29. Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 9694-9705.
30. Jiaa, Y., & Xie, J. (2015). Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes & Diseases*, 299-306.
31. Karanikas , M., Esempidis, A., Tzoutze , Z., Deftereou,, T., Antonopoulou, M., Bozali,, F., . . . Man, Y.-G. (2016). Pancreatic Cancer from Molecular Pathways to Treatment Opinion. *Journal of Cancer*, 1328–1339.
32. Kim, N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 376–385.
33. Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Biankin, A., Neale, R., . . . Neoptolemos, J. (2016). Pncreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1-17.
34. Lambeth, L., & Smith, C. (2012). Short Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing. *Methods in Molecular Biology* , 205-232.
35. Li, D. (2012). Diabetes and Pancreatic Cancer. *Mol Carcinog*, 64–74.
36. Maning, G., Whyte, D., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 1912-1934.
37. Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini , I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 7-12.

38. NCBI. (18 de Noviembre de 2018). Obtenido de Gene: MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3) Homo sapiens: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5595>
39. Omiyale, A. (2015). Clinicopathological review of pancreatoblastoma in adults. *Gland Surgery*, 322-328.
40. Pandol , S., Gukovskaya, A., Edderkoui, M., Dawson, D., Eibl, G., & Lugea, A. (2012). Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: Role of the stellate cell. *Journal Gastroenterol Hepatol*, 127–134.
41. Polireddy , K., & Chen, Q. (2016). Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment. *Journal of Cancer*, 1497–1514.
42. Plotnikov, A., Zehorai, E., & Procacci, S. (2010). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1619–1633.
43. Rao, D., Vorhies, J., & Senzer, N. (2009). siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 746-759.
44. Ro, C., Chai, W., Yu, V., & Yu, R. (2013). Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chinese Journal of Cancer*, 312-319.
45. Salud, S. d. (8 de Agosto de 2017). 318. *Cáncer, tercera causa de muerte en México*. Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
46. Samulitis, B., Pond, K., & Pond, E. (2015). Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Cancer Biology & Therapy* , 43-51.
47. Shchemelinin, I., Sefc, L., & Necas, E. (2006). Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)*, 81-100.
48. Shuja, A., & Alkimawi, K. (2014). Solid pseudopapillary tumor: a rare neoplasm of the pancreas. *Gastroenterology Report*, 145–149.
49. Tuncay, S., & Banerjee, S. (2010). MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 1-101.
50. Wang , Z., Rao , D., Senzer , N., & Nemunaitis, J. (2011). RNA Interference and Cancer Therapy. *Springer Science*, 2983–2995.
51. Wang, M., Lu, X., Dong, X., Hao, F., Liu, Z., Ni, G., & Chen, D. (2015). pERK1/2 silencing sensitizes pancreatic cancer BXPC-3 cell to gemcitabine-induced apoptosis via regulating Bax and Bcl-2 expression. *World Journal of Surgical Oncology*, 1-8.
52. Weinberg, R. (1996). How Cancer Arises. *Scientific America*, 62-70.
53. Xiang , S., Fruehauf, j., & Chiang , L. (2006). Short hairpin RNA–expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 697-701.
54. Yuan, J., Wang, X., Zhang, Y., & Hu, X. (2006). shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference. *Molecular Biology Reports*, 43-49.
55. Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World Journal Gastroenterol* , 2897-2908.
56. Zhao, Y., Shen, S., Guo, J., Chen, H., Greenblatt, D., Kleeff, J., . . . Leung, P. (2006). Mitogen-Activated Protein Kinases and Chemoresistance in Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Surgical Research*, 325–335.

57. Zheng, C., Jiao, X., & Sun, S. (2013). ERK1/2 activity contributes to gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Journal of International Medical Research*, 300–306.