



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ATR EN LA RESISTENCIA A GEMCITABINA EN
CÁNCER PANCREÁTICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA TREJO MARTÍNEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA**

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
Trejo
Martínez
María Fernanda
55 67 92 51 19
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311112515
2. Datos del tutor
Dr
Jorge Meléndez
Zajgla
3. Datos del sinodal 1
Dra
Ela Alcántara
Flores
4. Datos del sinodal 2
Rodrigo González
Barrios de la Parra
5. Datos del sinodal 3
Q
Viviana Escobar
Sánchez
6. Datos del sinodal 4
Dr
Gustavo Ulises
Martínez Ruíz
7. Datos del trabajo escrito
ATR en la resistencia a gemcitabina en cáncer pancreático
52 p
2019



Instituto Nacional de Medicina Genómica MÉXICO

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM por las oportunidades brindadas y experiencias internacionales.

A la facultad de ciencias, en especial a mis profesores por todos los conocimientos brindados.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio y del instituto, por ayudarme siempre que lo necesité.

Especialmente a mi familia, mis padres y hermanas, por apoyarme en todo y alentarme a conseguir lo que me propongo. A Abel Segura, por juntos ser un gran equipo.

Al Dr Jorge Meléndez por permitirme ser parte del grupo de investigación y por todo el apoyo brindado. Finalmente a la Dra Ela Alcántara por toda su ayuda y enseñanzas.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanas, amigos y Abel.

ÍNDICE

1.Introducción.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Desarrollo tumoral.....	1
1.2 Cáncer de páncreas.....	2
1.2.1 Tipos de cáncer de páncreas.....	2
1.3 Epidemiología.....	3
1.4 Factores de riesgo.....	5
1.5 Biología molecular del cáncer de páncreas.....	8
1.6 Tratamiento del cáncer de páncreas.....	11
1.7 Resistencia a la quimioterapia.....	14
1.8 Cinasas en el cáncer.....	15
1.8.1 Papel de ATR en el cáncer.....	16
1.9 Técnicas novedosas utilizadas.....	18
2 Antecedentes.....	21
3 Justificación.....	22
4 Objetivos.....	23
5 Hipótesis.....	24
6 Método.....	25
7 Resultados.....	33
8 Discusión.....	42
9 Conclusiones.....	44
10 Anexos.....	45
11 Referencias.....	46

RESUMEN

La quimioterapia con gemcitabina es el principal tratamiento para pacientes con cáncer de páncreas avanzado, sin embargo éste no es efectivo en todos los pacientes, en algunos casos debido a la resistencia intrínseca o adquirida, al fármaco.

En la búsqueda de genes que potencialmente estén implicados en la supervivencia de las células tumorales tratadas con gemcitabina, se estudió el efecto de la inhibición del gen ATR, cinasa involucrada en respuesta al daño al DNA, como rompimiento de doble cadena, reparación de las horquillas de replicación dañadas y prevención de mitosis prematura, por lo tanto la interrupción de la vía causa inestabilidad genómica, además se ha reportado actividad en la mayoría de las quimioterapias contra el cáncer. La inhibición se realizó mediante el uso de un short hairpin RNA, en el cual hay degradación del RNA mensajero del gen blanco. Lo anterior se realizó en dos líneas celulares de cáncer de páncreas: CFPAC1 y HPAF-II.

Se encontró que la inhibición del gen en éstas células en cultivo en monocapa, la viabilidad de las células reduce, esto se vio en la disminución del IC_{50} (concentración inhibitoria 50, que se define como la concentración de fármaco requerida para inhibir el crecimiento celular en un 50%). Para eso se expuso a las células a diferentes concentraciones de gemcitabina y se midió la viabilidad mediante el ensayo de MTT, y se obtuvo el IC_{50} con un cambio estadísticamente significativo.

Posteriormente, en el modelo de Esferoides Tumorales Multicelulares (MTS), que permite, a diferencia del cultivo en monocapa, tener una heterogeneidad celular, al estar cada célula expuesta a distintas condiciones de oxígeno, de nutrientes, etc y permite recrear interacciones celulares tridimensionales. Se trataron los esferoides con la IC_{50} determinada en las células en monocapa, y se observó un menor número de esferoides en los que se inhibió ATR respecto al control y conforme los días de medición disminuyeron su diámetro llegando a ser al último día, más pequeños que en la primera medición. Los resultados anteriores, apuntan a que los bajos niveles de ATR, podría tener un papel importante en la respuesta de estas líneas celulares de cáncer de páncreas al tratamiento con gemcitabina.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la proliferación desregulada de cualquier tipo celular, por ello existen más de cien tipos de cáncer. Los tumores se desarrollan a partir de una célula que proliferó de manera anormal, esto es conocido como clonalidad tumoral (Cooper y Hausman, 2004). Se han propuesto características distintivas que comparten las células cancerosas como: el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de supresores de crecimiento, la evasión de la destrucción inmune, la inmortalidad replicativa, la invasión y metástasis, la estimulación de la angiogénesis y evasión de la muerte celular (Hanahan, 2011). Ésto no implica que la célula progenitora haya adquirido todas las características desde el inicio, sino que es un proceso con múltiples etapas en el que las células adquieren la malignidad gradualmente a través de una serie progresiva de alteraciones, en las que hay mutaciones y selección de células con mayor capacidad de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Cooper y Hausman, 2004)

Desarrollo tumoral

Se conoce como *iniciación*, a la fase tumoral en donde hay proliferación anormal de una sola célula resultado de una ó varias alteraciones genéticas. Como se muestra en la figura 1, el crecimiento de clonas tumorales deriva en progresión tumoral, que es una fase en la que ocurren mutaciones adicionales en las células cancerosas y algunas de estas confieren ventajas selectivas que propiciarán

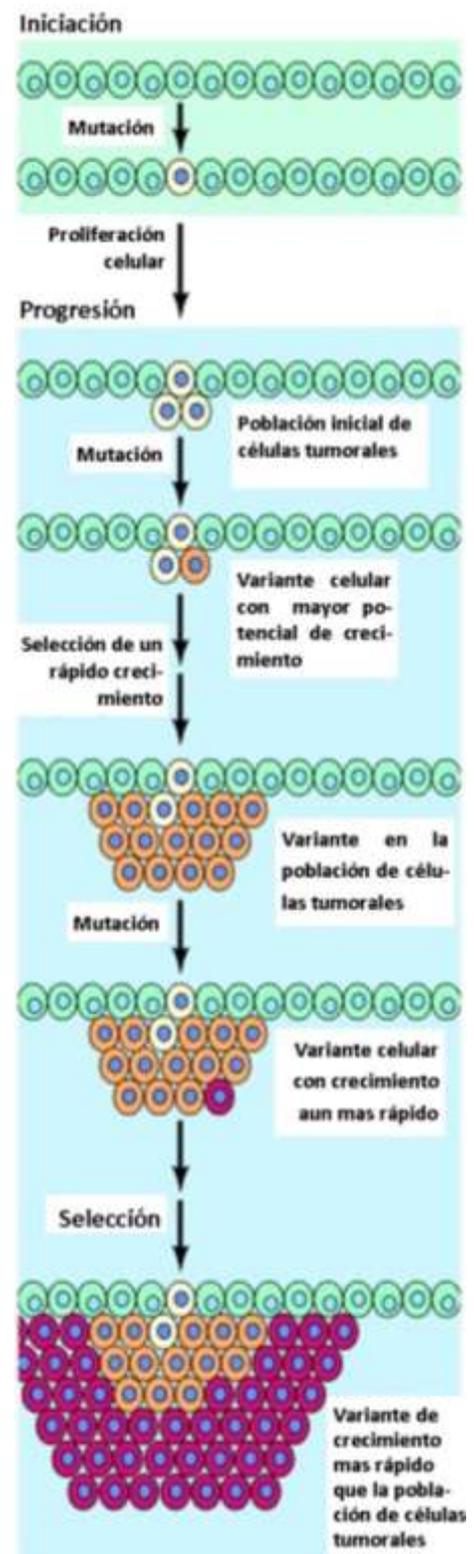


Figura 1. Etapas del desarrollo tumoral. Tomado y modificado de (Cooper y Hausman, 2004).

una dominancia en la población tumoral, a lo que se conoce como selección clonal. (Cooper y Hausman, 2004).

Cáncer de páncreas

En humanos adultos el páncreas es una glándula que mide alrededor de 15 cm de largo y se ubica en el abdomen. Para su estudio se divide en cuatro partes, el extremo ancho se llama cabeza, las secciones medias son el cuello y el cuerpo, y el extremo delgado se llama cola.

El cáncer de páncreas se desarrolla cuando las células pancreáticas (de la cabeza, cuerpo o cola del páncreas) crecen fuera de control formando tumores.

La elevada tasa de mortalidad de este cáncer se ha asociado a que es una enfermedad silenciosa y a que no se cuenta con biomarcadores tempranos, por lo tanto el diagnóstico ocurre en etapas tardías, aumentando el número de pacientes con tumores irresecables (Ansari et al., 2015), solo entre el 10 o 20% se diagnostica en las primeras etapas. Tiene una tasa de supervivencia menor a 5 meses después del diagnóstico (de Sousa Cavalcante y Monteiro, 2014) y sólo el 8% de los pacientes sobrevive 5 años después del diagnóstico (Saad et al., 2018). La baja tasa de supervivencia se debe a varios factores, entre ellos podemos mencionar el estado de salud en el que se encuentra el paciente cuando es diagnosticado y la ausencia de síntomas de algunos pacientes que se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad y lo ignoran (Kamisawa, 2016).

Epidemiología

A nivel mundial acuerdo con las estadísticas de GLOBOCAN (2018), el cáncer de páncreas es la séptima causa de muerte tanto en hombres como en mujeres.

En ese año se reportó casi el mismo número de muertes (n= 432,000) como nuevos casos (n= 459,000) y se prevé que este cáncer superará al cáncer de mama (que actualmente es la principal causa de muerte en más de 100 países), posicionándose como la tercera causa de muerte en el futuro, (Bray et al., 2018).

Las poblaciones con mayor incidencia se reportaron en Norteamérica y Europa, mientras que en África central se reportó la incidencia más baja (Ilic M, 2016). Hay tendencia a mayor tasa de incidencia en países desarrollados que en países en desarrollo (Wong et al., 2017)

En relación al género, los resultados son variables dependiendo la zona geográfica, por ejemplo: en Alemania la incidencia en hombres es más alta mientras que en Pakistán se reportó una incidencia más baja; en mujeres la mayor incidencia se reportó en América del Norte mientras que la menor se encontró en África Central. Con respecto a la edad, la incidencia en ambos géneros aumenta conforme la edad, ya que aproximadamente el 90% de los casos se diagnostica después de los 55 años (Ilic M, 2016).

En cuanto a México, el cáncer ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte, siendo las enfermedades cardiovasculares y complicaciones con la diabetes mellitus las que ocupan los primeros lugares (González et al., 2017).

En los años 2000 a 2014 la tasa de muerte por cáncer de páncreas en México fue de 4.35 y 4.29 por cada 100,000 habitantes, para hombres y mujeres, respectivamente (González et al., 2017). Este cáncer en el país ocupa el sexto lugar entre las tasas de muerte en hombres y el séptimo en mujeres (Rizo, 2015)

Como se observa en la tabla 1, en el 2018 el cáncer pancreático ocupa el 13º lugar en muertes por cáncer en México, sin embargo es el que más muertes tiene respecto al número de nuevos casos.

Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site								
Cancer	New cases				Deaths			
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk
Breast	27 283	1	15.90	6.02	6 884	2	8.95	1.96
Prostate	25 049	2	14.60	11.59	6 915	1	8.99	5.26
Thyroid	12 122	3	7.06	1.07	881	20	1.15	0.20
Colon	10 457	4	6.09	1.91	5 700	6	7.41	1.23
Cervix uteri	7 869	5	4.59	1.75	4 121	9	5.36	1.19
Lung	7 811	6	4.55	1.80	6 733	4	8.76	1.62
Stomach	7 546	7	4.40	1.50	6 034	5	7.85	1.32
Corpus uteri	7 266	8	4.23	1.68	1 128	18	1.47	0.40
Liver	7 265	9	4.23	1.64	6 868	3	8.93	1.63
Leukaemia	6 406	10	3.73	0.69	4 470	8	5.81	0.60
Non-Hodgkin lymphoma	5 174	11	3.02	0.75	2 741	11	3.57	0.51
Pancreas	4 849	12	2.83	1.06	4 475	7	5.82	1.01
Ovary	4 759	13	2.77	1.06	2 765	10	3.60	0.80

Tabla 1. Principales tipos de cáncer en México (ambos sexos, todas las edades). Aunque el cáncer de páncreas no se posiciona entre los principales 10, es el cáncer con mayor número de muertes respecto al número de nuevos casos. Tabla tomada de Globocan 2018.

Tipos de cáncer de páncreas

El páncreas presenta en su interior distintos tipos celulares, pero fundamentalmente se pueden dividir entre las células responsables de la secreción de enzimas digestivas y las células encargadas de producir distintas enzimas, entre ellas la insulina y el glucagón, que regulan los niveles de azúcar en la sangre. Cuando se forma un tumor a partir del primer grupo de células es tumor de tipo exocrino, aproximadamente el 85% de los casos son de este tipo, y cuando se forma un tumor a partir del segundo tipo de células, hablamos de un tumor neuroendocrino de páncreas (National Cancer Institut, 2013).

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC por sus siglas en inglés), es un cáncer de tipo exocrino, se desarrolla en células que recubren los conductos pancreáticos, puede desarrollarse en cualquier parte del páncreas, pero se ha visto una mayor frecuencia en la cabeza del páncreas (Saad et al., 2018).

Se ha propuesto un modelo de progresión y se han identificado cambios histológicos paralelos con alteraciones genéticas, lo que en última instancia deriva en adenocarcinoma ductal pancreático invasivo (Ilic, M, 2016). La clasificación se basa en el grado de neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) la cual va en grado creciente de atipia arquitectural y citológica, siendo el 1A el grado más bajo, 1B, 2 y el 3 el más alto. Cada etapa tiene irregularidades genéticas características, afectando a genes y vías específicas. De manera general hay pérdida de la polaridad, aglomeración nuclear, núcleos agrandados, pseudoestratificación e hiperchromatismo (Zavoral et al., 2011).

Por otro lado el acortamiento de los telómeros se ha detectado en todos los grados, por lo que se sugiere que es una de las primeras alteraciones. Se ha planteado que las mutaciones en el gen KRAS son unas de las alteraciones tempranas, mientras que la inactivación de TP53 y SMAD4 parecen ser eventos tardíos.

Factores de riesgo

No existe una causa directamente asociada con el desarrollo de cáncer de páncreas, sin embargo como ocurre con otros tipos de cáncer se han asociado algunos factores de riesgo cuyo nivel de exposición podría influir con el desarrollo de la enfermedad, entre ellos se encuentran: el tabaquismo, la alimentación inadecuada y/o el consumo de alcohol, así como factores genéticos, diabetes mellitus, obesidad e inactividad física (Ilic, M, 2016).

Una de las hipótesis para el desarrollo de cáncer de páncreas señala la relación entre la inflamación en los islotes de Langerhans (parches de tejido endocrino dentro del páncreas), la resistencia a la insulina, promoción del crecimiento celular y la diabetes (Zavoral et al., 2011).

❖ Tabaquismo y alcoholismo

Fumar es un factor de riesgo importante, casi una cuarta parte de las muertes por cáncer de páncreas están relacionadas con su consumo. Este riesgo depende de la duración, frecuencia, edad en la que la persona comenzó a fumar, entre otras. La edad media en el diagnóstico de personas fumadoras es de 56 años, mientras que en personas no fumadoras es de 71 años, (Pandol, S. J., 2012).

De los aproximadamente 250 químicos dañinos que contiene el humo del cigarro, al menos 60 son carcinógenos, entre estos se encuentran el arsénico, benceno, familias de nitrosaminas entre otros, ó metabolitos de compuestos no carcinógenos, como los derivados de la nicotina. El efecto carcinogénico del tabaco en el tejido pancreático es causado por las N-nitrosaminas o por su secreción a la bilis y su posterior reflujo en el conducto pancreático (Pandol, S. J., 2012).

En cuanto al consumo de alcohol, se ha visto un ligero aumento de riesgo en las personas que tienen un consumo de alcohol mayor o igual a 30 gramos (equivalente a 300 ml de vino con 12º) por día con un índice de masa corporal de $\leq 25 \text{ kg/m}^2$. Sin embargo, el abuso en el consumo de alcohol podría ser un inductor de pancreatitis crónica, siendo ésta un factor de riesgo real (Zavoral et al., 2011).

❖ Dieta y obesidad

La obesidad es un factor reconocido en cáncer de páncreas, afectando principalmente al género masculino. Existen estudios en donde se reporta que hombres con un índice de Masa Corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ presentan un riesgo relativamente mayor a desarrollar cáncer de páncreas que mujeres con el mismo IMC (Zavoral et al., 2011).

Los mecanismos que se han propuesto para explicar la relación entre la obesidad y el cáncer, es que las hormonas y la inflamación asociada con el tejido adiposo promueven el desarrollo tumoral. También el aumento a la exposición de carcinógenos debido a un mayor consumo de alimentos, y finalmente a la disminución de la actividad física (Bracci, 2012).

Uno de los factores asociados a la obesidad es la diabetes mellitus, ya que la resistencia a la insulina, la baja tolerancia a la glucosa y la hiperinsulinemia se han asociado con el exceso de adiposidad. Aunque los mecanismos aún no son claros se ha establecido a la obesidad como causa y consecuencia de este tipo de cáncer, en específico se ha relacionado al adenocarcinoma ductal pancreático y a la diabetes de tipo 2 con una doble causalidad, siendo la diabetes un factor de riesgo para el PDAC y a la inversa (Andersen et al., 2017).

❖ Riesgos laborales

Se sabe que la exposición a algunos metales pesados, como el cadmio, que se acumula en el tejido pancreático, está involucrado en el proceso neoplásico. Se sospecha de la actividad del cromo en el cáncer pancreático, además de la influencia de las aminas aromáticas y heterocíclicas que se encuentran en algunos solventes (Zavoral et al., 2011). Los trabajadores que se pueden ver afectados por el cromo son productores de acero y soldadores, técnicos dentales. En el caso del cadmio en trabajadores de la industria de metales no ferrosos, además por la inhalación de humo de tabaco.

❖ Edad

La edad es un factor muy importante en el desarrollo de cáncer de páncreas, ya que el 80% de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma tienen entre 70 a 80 años, menos del 10 % es diagnosticado antes de los 50 años y es muy raro el diagnóstico de este cáncer antes de los treinta años (Pandol, S., et al, 2012)

❖ Pancreatitis crónica

La pancreatitis es una enfermedad caracterizada por inflamación del tejido y pérdida de sus funciones, hay sustitución celular por tejido fibroso, siendo una destrucción progresiva e irreversible. Esta inflamación puede ser aguda o progresiva (crónica). La pancreatitis aguda no es considerada un factor de riesgo en términos de diagnóstico del cáncer, sin embargo, la pancreatitis crónica sí lo es, ya que se ha reportado un riesgo 16 veces más alto en el desarrollo de cáncer de páncreas en individuos que tienen pancreatitis crónica con respecto a individuos que no la padecen (Zavoral et al., 2011). La inflamación crónica es otro factor asociado al desarrollo del cáncer de páncreas, debido a la presencia de células del sistema

inmune. Las cuales liberan factores de crecimiento, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF)- α y β . Los cuales pueden inducir la proliferación de las células y la angiogénesis. Por otro lado las especies reactivas del oxígeno pueden causar daño en el DNA que pueden derivar en mutaciones en K-ras, p16 y p53 (Dhar et al., 2015).

❖ Susceptibilidad genética

Se ha reportado la importancia de mutaciones en ciertos genes en el desarrollo del cáncer de páncreas, entre los que se encuentran BRCA1 y BRCA2. Cuando estos genes presentan alteraciones, el riesgo relativo aumenta 2.26 veces y de 3.5-8, respectivamente, (Zavoral et al., 2011). Existen otras enfermedades hereditarias que tienen un rol importante en el desarrollo de éste cáncer, como la fibrosis quística, una enfermedad autosómica recesiva, cuya complicación deriva de la presencia de una obstrucción del conducto pancreático, causando inflamación, lo que puede derivar en pancreatitis crónica y tumores pancreáticos. El Síndrome Peutz-Jeghers, es una enfermedad autosómica dominante, causada en casi el 50% de los pacientes, por mutaciones germinales en el gen STK11 / LKB1. Se ha reportado que los pacientes con este síndrome a medida que envejecen pueden padecer cáncer de mama, pulmón y páncreas entre otros. El cáncer de Lynch es una forma hereditaria de cáncer de colon caracterizado por mutaciones en el gen MMR, también se ha asociado con el cáncer de páncreas con un riesgo de 8.6 veces más que la población general (Rustgi, 2014).

Cuando se presenta cáncer de páncreas en dos o más parientes de primer grado, se denomina cáncer pancreático familiar. Este representa del 3 al 10% del total de casos de cáncer de páncreas y se ha calculado un riesgo de 4.6 a 32 veces mayor, dependiendo del número de familiares afectados. Asimismo, se ha asociado al cáncer de páncreas con otras enfermedades hereditarias, como los síndromes de Li-Fraumeni, ataxia telangiectasia, y de Von Hippel-Lindau (Zavoral et al., 2011).

Biología molecular del cáncer de páncreas

Las alteraciones en los genes tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer, pues pueden alterar procesos importantes en la célula, como la división celular, la apoptosis y la migración, entre otros.

Hay dos tipos de genes que se desregulan en el cáncer, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores.

Los proto-oncogenes son genes que codifican a proteínas que actúan como reguladores positivos, como factores de crecimiento, transductores de señales, factores de transcripción e inhibidores de apoptosis entre otros. Cuando un proto-oncogen presenta mutaciones se le denomina oncogen (Abramson et al., 2007). Las mutaciones más comunes en los proto-oncogenes son las mutaciones puntuales, las deleciones, la amplificación génica y el reordenamiento génico. Estas mutaciones son de carácter dominante, es decir, que basta con que la mutación esté presente en uno de los dos alelos para que el gen se vea afectado. En la carcinogénesis pancreática los proto-oncogenes principales son KRAS, CTNNB1 (β -catenina), PIK3CA o AKT1 (Zavoral et al., 2011) que se explican en la tabla 2.

Oncogen	Localización	Función	Frecuencia de mutación %
<i>KRAS</i>	Cromosoma 12	Codifica para una proteína de la familia Ras de proteínas de unión a GTP, participa en las vías de crecimiento celular, diferenciación y supervivencia. Las principales mutaciones puntuales se encuentran en el codón 12 del gen, afectando la actividad GTPasa de la proteína (Furukawa T.).	58
<i>AKT1</i>	Cromosoma 14	Codifica para una proteína de membrana, importante en la supervivencia celular superando el arresto del ciclo, bloqueando apoptosis y promoviendo angiogénesis (Zavoral et al., 2011).	5
Supresor de tumor			
<i>CDKN2A</i>	Cromosoma 9	Codifica una proteína que bloquea la entrada a la fase S del ciclo celular, al inhibir a la cinasa dependiente de ciclina (CDK), ocasionando una desregulación en el ciclo celular. Entre los mecanismos de inactivación de este gen, se encuentran: delección homocigota, mutación intragenica más pérdida de heterocigosidad e hipermetilación del promotor. Se encuentra inactivado en aproximadamente el 95% de carcinomas pancreáticos (Sakorafas et al., 2000).	29
<i>TP53</i>	Cromosoma 17	Codifica para un factor transcripcional, regulando la expresión de una gama de genes, encargados de diversos procesos como la progresión del ciclo celular, apoptosis, reparación del DNA. El mecanismo de inactivación del gen es por mutaciones intragénicas y una las consecuencias de la inactivación del producto de p53 es la pérdida del punto de control del ciclo celular (Hanse et al., 2003,).	57
<i>SMAD4/DPC4</i>	Cromosoma 18	Es un gen inactivado en el cáncer pancreático en aproximadamente en el 55% de los casos de este cáncer. Codifica para una proteína importante en la respuesta	22

		transcripcional a señales de TGF- β . Su inactivación (que puede ser por delección homocigota o por mutación más pérdida de heterocigosidad), ocasiona una progresión desregulada del ciclo celular (Hahn et al., 1996).	
--	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Tabla 2. Descripción de los principales oncogenes y supresores de tumor en el adenocarcinoma ductal pancreático.

Por otro lado, los genes supresores de tumores, son aquellos que codifican para proteínas que inhiben procesos como la proliferación celular (Abramson et al., 2007), pueden ser también inhibidores de señalización, activadores de apoptosis y miembros de los sistemas de reparación del DNA. La mutación y o delección de los supresores de tumores elimina estas funciones inhibitorias (Fried et al., 1988).

El modelo que se propone para la inactivación de estos genes, es que un alelo está inicialmente mutado y el otro sufre alguna mutación posteriormente, aunque también puede inactivarse por hipermetilación. En el cáncer pancreático los supresores de tumores que se encuentran alterados más frecuentemente son P53, APC, SMAD4 y P16, que se describen en la tabla 2.

La consecuencia de estos tipos de alteraciones genéticas, es la adquisición de un fenotipo maligno, que conlleva un aumento en la proliferación, evasión de la apoptosis, capacidad de invasión y metástasis.

Estas alteraciones pueden afectar vías o cascadas de señalización vitales para la célula, como la vía Ras/Raf/MAPK, PTEN/PI3K/AKT, JAK/STAT, TGF- β /SMAD y señalización por Wnt y CDKN2A entre otras (Abramson et al., 2007).

Biomarcadores del cáncer de páncreas

Los hallazgos en la biología molecular del cáncer han permitido progreso en el diagnóstico, en la identificación de la fase de desarrollo del cáncer, el tratamiento de tumores localizados. También la identificación del papel de algunos síndromes hereditarios, como los mencionados anteriormente en la susceptibilidad al cáncer de páncreas.

Los biomarcadores asociados al cáncer de páncreas, no solo pueden ser genéticos, sino también epigenéticos, como se enlistan en la tabla 4 y otros como BNC1 y ADAMTS1, genes que se han encontrado metilados con alta frecuencia en PDAC

(Yi et al., 2013). Por otro lado y la expresión de microRNAs (pequeñas moléculas de RNA no codificante, de aproximadamente 22 nucleótidos, que participan en la traducción y estabilidad de los RNAs mensajeros), se han encontrado significativamente desregulados en pacientes con PDAC, respecto a pacientes sanos, estos microRNAs se pueden obtener de sangre (Ansari et al., 2015) como miR-155, miR-21, miR-222 (Khan, 2015).

Las investigaciones se han enfocado en la identificación de biomarcadores de diagnóstico no invasivos.

Finalmente, en el campo de la proteómica, se han usado anticuerpos y espectrometría de masas para identificar posibles biomarcadores de cáncer de páncreas (Ansari et al., 2015).

Biomarcador	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Antígeno carcinoembrionario	45	75
Molécula de adhesión celular antígeno carcinoembrionario. 1 (CEACAM1)	85	98
Antígeno carbohidrato 19-9	80	73
Span-1	81-94	75
DUPAN-2	48-80	75-85
Citocina inhibitoria de macrófagos 1	90	62
Alpha4GnT	76	83
Monooxigenasa peptidil-glicina alfa-amidante	77	95
Metilación de DNA en el jugo pancreático (en el gen CD1D)	82	100
K-ras fecal	77	81

Tabla 4. Principales biomarcadores en el diagnóstico de cáncer de páncreas. Tomada de (Zavoral et al., 2011).

Tratamientos para el cáncer de Páncreas

El cáncer de páncreas es difícil de detectar pues no causa síntomas de inmediato. Cuando los síntomas aparecen, suelen ser vagos o imperceptibles; estos incluyen

una coloración amarillenta de la piel y los ojos, dolor en el abdomen y la espalda, pérdida de peso y fatiga. Además, como el páncreas está oculto detrás de otros órganos, los profesionales de la salud no pueden ver ni palpar los tumores en los exámenes de rutina. Dado que frecuentemente se detecta tarde y se disemina rápidamente, el cáncer de páncreas puede ser difícil de tratar. Los posibles tratamientos incluyen cirugía, radiación y quimioterapia. El mayor impacto del cáncer de páncreas lo constituye el hecho de que fallecen casi el mismo número de casos que se diagnostican (Khan, 2015).

Cirugía

Uno de los principales tratamientos es la resección quirúrgica, clasificándose a los pacientes en tres etapas: resecable, localmente avanzada y enfermedad metastásica. Para asignar este tipo de tratamiento se deben considerar factores como el tamaño del tumor, la afectación vascular, la edad, la comorbilidad (presencia de una o más enfermedades además de la enfermedad o trastorno primario, y el efecto de éstos padecimientos adicionales). Sumado a esto, la mayoría de los pacientes se diagnostican cuando el cáncer se encuentra en una etapa avanzada o metastásica, por lo cual solo el 15% de los pacientes son candidatos a la resección quirúrgica y después de la cirugía la recurrencia local y sistémica es muy común, siendo la mediana de supervivencia post intervención de 20-23 meses. Los pacientes que no son candidatos a cirugía son tratados con radioterapia o quimioterapia, siendo la gemcitabina el fármaco de primera línea para PDAC avanzada (Ansari et al., 2015).

Quimioterapia con gemcitabina

La gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine; dFdC), análogo de nucleósido (análogo de desoxicitidina), es uno de los principales agentes quimioterapéuticos anticancerígenos para el cáncer pancreático, tanto localmente avanzado, como metastásico, y también es usado en otros tumores sólidos, como en mama, ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas (de Sousa Cavalcante y Monteiro, 2014). Tiene dos mecanismos de acción, el más importante es la inhibición de la síntesis de DNA, donde la gemcitabina trifosfato (dFdCTP) se incorpora al DNA seguido de un desoxirribonucleotido impidiendo la elongación de la cadena. Esta posición no terminal de la gemcitabina ocasiona que no pueda ser removida por la maquinaria

de reparación, entonces se inhibe la síntesis de DNA (fase S), se bloquea la progresión del ciclo celular en el límite G1/S (Jia, 2015,) e induce apoptosis mediante la activación de p38 que desencadena apoptosis por estrés en las células cancerígenas.

A detalle, el proceso comienza con el transporte de la gemcitabina al interior de la célula, ya sea por mecanismos dependientes de sodio (hCNTs, transportadores nucleosídicos concentradores) o por mecanismos independientes de sodio (hENT, transportadores nucleósidos equilibrantes). Como se muestra en la figura 2, una vez en el interior de la célula, el fármaco es una prodroga que debe ser activada mediante fosforilaciones en el citoplasma, pasando a gemcitabina monofosfato (dFdCMP) por la desoxitidina quinasa (dCK), se considera el paso limitante para la producción de dFdCDP y dFdCTP (Jia, 2015), posteriormente es fosforilada a gemcitabina difosfato (dFdCDP) por la pirimidina nucleósido monofosfato quinasa (UMP-CMP kinase) y finalmente formando la gemcitabina trifosfato (dFdCTP) por acción de la nucleósido difosfato quinasa (NDPK), siendo ésta la forma activa del fármaco (de Sousa Cavalcante y Monteiro, 2014).

El dFdCTP se incorpora a la cadena de DNA en replicación seguido de un desoxinucleotido, presentándose una interrupción en la elongación de la cadena, conocido como “terminación enmascarada de la cadena”, esta posición no terminal de la gemcitabina impide que la DNA polimerasa continúe con la síntesis. El ciclo celular se detiene para reparar el daño producido por la gemcitabina mediante enzimas de reparación (de Sousa Cavalcante y Monteiro, 2014). Si el daño no es reparado la célula entrará en apoptosis.

Como se mencionó anteriormente, otro de los mecanismos de acción de la gemcitabina es su auto potenciación, en su forma difosfatada, inhibe a la ribonucleótido reductasa (RR) compuesta por las subunidades RRM1 y RRM2, la cual cataliza reacciones para la formación de desoxicitidina difosfato (dCDP), esto causa una disminución en desoxicitidina trifosfato dCTP, y se ve favorecida la incorporación de la forma activa de la gemcitabina (dFdCTP) ocasionando daño en el DNA (Jia, 2015).

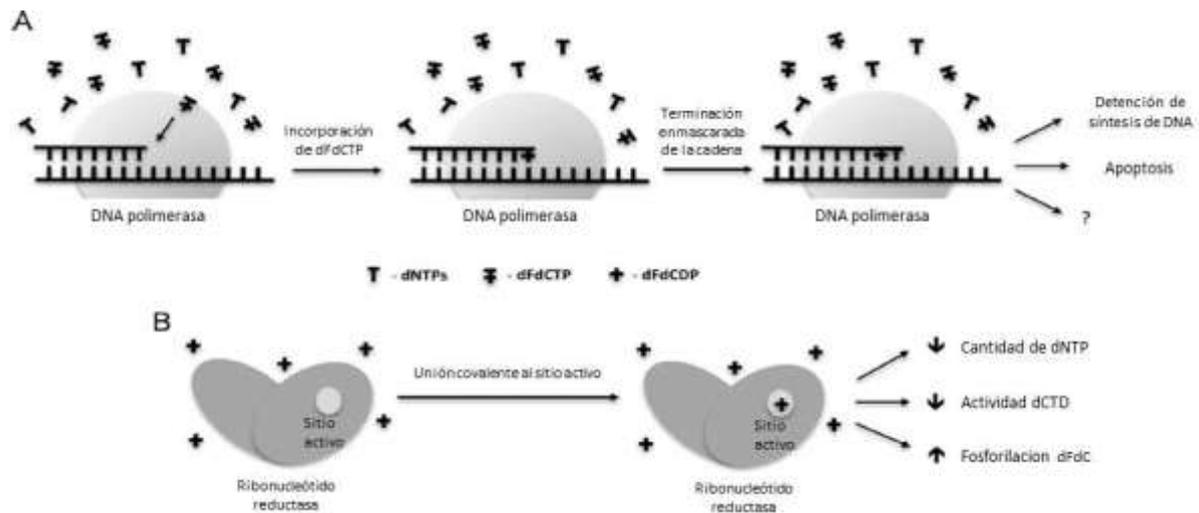


Figura 2. Representación de los mecanismos de acción de la gemcitabina. **A)** terminación enmascarada de la cadena, la gemcitabina trifosfato (dFdCTP) es incorporada a la cadena por la DNA polimerasa en lugar del dNTP que se debía incorporar. **B)** auto potenciación de la gemcitabina, la forma difosfato de la gemcitabina (dFdCDP) inactiva a la ribonucleótido reductasa, enzima importante en la generación de dNTPs y favorece la incorporación de la forma activa de la gemcitabina (dFdCTP).

Tomado y modificado de, de Sousa Cavalcante y Monteiro, 2014.

Resistencia a la quimioterapia

Existen dos tipos de resistencia a la quimioterapia: la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida (Jia, 2015). La resistencia intrínseca es la resistencia que ya era preexistente en el paciente. La resistencia adquirida es la que se desarrolla al tratar al tumor, en donde en un inicio hay disminución del tumor y al cabo de un tiempo vuelve a crecer a pesar de mantener el tratamiento (Lippert et al., 2008).

La hipótesis principal es la existencia de distintas poblaciones celulares en el tumor, unas más sensibles y otras más resistentes, cuyo equilibrio puede modificarse con el tratamiento y la duración del mismo.

En el caso específico de la gemcitabina, actualmente se sabe que existen factores genéticos y epigenéticos asociados a la resistencia a fármacos y entre ellos se encuentran genes asociados al transporte, bombas de membrana y a su metabolismo (Jia, 2015). Por ejemplo hENT-1 (Transportador equilibrado de nucleósidos tipo 1), es uno de los transportadores implicados en la absorción intracelular de la gemcitabina, y se ha reportado una correlación entre la baja expresión de hENT-1 y una mala respuesta al tratamiento (Ansari et al., 2015). Se ha reportado que la sobreexpresión de RRM1 y RRM2 está asociada a la resistencia a la gemcitabina. La expresión aberrante de genes asociados a la supervivencia

celular y apoptosis, por ejemplo S100A4, fosfatidil inositol 3-quinasa/Akt (Kim, 2008), o por regulación transcripcional, como el caso de Hu antígeno R (HuR), una proteína de unión a RNA que regula a dCK, y se asocia con la eficacia a la gemcitabina, ya que se ha reportado que a niveles altos de HuR hay una mayor supervivencia en los pacientes medicados con gemcitabina (Constantino, et.,al, 2009).

Por otro lado, la resistencia a la gemcitabina puede deberse a su inactivación, esta es llevada a cabo mediante su desaminación por la citidina desaminasa (CDA) y cuando se encuentra en forma monofosfato la desoxicitidilato deaminasa (dCTD) la puede inactivar, también puede desfosforilarse por acción de la 5'-nucleotidasa (5'-NT) cuando es gemcitabina monofosfato (Jia, 2015).

Cinasas en el cáncer de páncreas

Las proteínas cinasas se encargan del proceso reversible de fosforilación de proteínas y lípidos, se han visto desreguladas en múltiples enfermedades, como el cáncer (Giroux et al., 2006). Hay aproximadamente 518 cinasas en el genoma humano y aún no se ha dilucidado el papel de todas estas proteínas. Las cinasas funcionan como reguladoras clave en varios procesos como el metabolismo, la transcripción, la progresión del ciclo celular, la reorganización del citoesqueleto, el movimiento celular, la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y en la respuesta al daño del DNA como ATR (Gross et al., 2015).

La fosforilación anormal de proteínas puede desarrollar trastornos y enfermedades como artritis reumatoide, inmunodeficiencias, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, trastornos endocrinos y cáncer (Giamas et al., 2007).

Estas proteínas tienen un papel importante en la célula tumoral al estar involucradas en la proliferación, la supervivencia, motilidad, metabolismo, angiogénesis, y evasión de la respuesta inmune (Gross et al., 2015).

Por lo anterior se han desarrollado herramientas farmacológicas para inhibir la fosforilación de ciertas proteínas. La FDA ha aprobado medicamentos inhibidores de cinasas, de los cuales 31 son terapia para el cáncer (Bhullar et al., 2018).

Se ha reportado que alrededor del 10 % de las cinasas son importantes en la supervivencia celular en el cáncer pancreático. Se han estudiado los inhibidores de

tres grupos de cinasas en el tratamiento del cáncer de páncreas, EGFR, VEGFR y PDGFR (Giroux et al., 2006).

Actualmente en el mercado hay inhibidores de cinasa como el Imanitib (Gleevec) utilizado para inhibir BCR-ABL1 en la leucemia mieloide crónica (Gross et al., 2015), el Erlonitib (Tarceva) ha mostrado inhibición significativa del crecimiento en 5 líneas celulares de cáncer de páncreas (Durkin et al., 2003).

Papel de ATR en el cáncer

La proteína “relacionada con ataxia-telangiectasia y RAD3” (ATR) es una enzima miembro de la familia PIKK (cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol-3-cinasa). Los miembros de esta familia presentan similitudes en sus dominios, principalmente en el dominio C-terminal y en los dominios flanqueantes FAT y FACT; además de similitud en su secuencia. Una de las funciones de los dominios FAT y FACT es la regulación de la actividad de cinasa (Weber y Ryan, 2015).

ATR es una de las cinasas más importantes en la respuesta al daño del DNA (DDR), como en los rompimientos de doble cadena (DSB), es activada por este tipo de daño o por ssDNA debido al estrés replicativo (RS) causado por daño endógeno no reparado o inducido por quimioterapia o radiación ionizante (Curtin y Pollard, 2018), así como en cada fase S para regular los sitios de origen de replicación, reparar las horquillas de replicación dañadas y prevenir una mitosis prematura. La respuesta al daño es una vía de transducción de señales en la que se coordina la transición del ciclo celular, la replicación y reparación del DNA, y la apoptosis (Karlene et al., 2008).

Se ha reportado que mutaciones bi alélicas en línea germinal en ATR que conllevan su inactivación, causan muerte temprana en embrión de ratón (de Klein et al., 2000). Sin ATR colapsan las horquillas de replicación ocasionando la formación de DSB letales generando más niveles de ssDNA, agotando la disponibilidad de RPA terminando en una catástrofe de la replicación (Toledo et al., 2013).

En la región N-terminal, ATR tiene un sitio de unión a una proteína de interacción (ATRIP), que regula a ATR, ese complejo ATR-ATRIP es esencial para la activación de ATR. En las células humanas ATR se encuentra en el complejo estable ATR-ATRIP.

ATR fosforila a varios sustratos, como p53, Brca1, Chk1 y Rad17. En general la fosforilación de sus sustratos inhibe la replicación del DNA y la mitosis, promoviendo la reparación del DNA, la recombinación y la apoptosis (Zou y Elledge, 2003).

La vía ATR-Chk1 protege al genoma contra el daño al DNA, ya que el resultado de esta cascada es bloquear la progresión mitótica mediada por CDK1 evitando que la célula entre a mitosis con cromosomas dañados provocando alteraciones genéticas, además brinda protección a las horquillas de replicación estresadas y reparación de DNA (Larry et al., 2015), (Curtin y Pollard, 2018).

El ssDNA formado en los sitios RS es altamente inestable y es blanco de exonucleasas, para evitar esto la proteína de replicación A (RPA) se une al ssDNA protegiéndolo de las exonucleasas y a la vez recluta proteínas que permiten la estabilización de la horquilla de replicación y de reparación del DNA dañado, como ATRIP que a su vez recluta a ATR (Zou y Elledge, 2003 ; Itakura et al. 2004 ; Dart et al., 2004)

Como se observa en la figura 3, la interrupción en la vía de ATR causa inestabilidad genómica (una de las características distintivas de las células cancerosas). Por otro lado ATR se activa en la mayoría de las quimioterapias contra el cáncer (Karlene et al., 2008). La de inestabilidad del genoma es frecuentemente observada en PDAC posiblemente se deba a defectos en los genes de reparación (Wallez et al., 2018).

Además de responder al daño del DNA, se ha reportado que ATR media la acumulación de RRM2, evitando una catástrofe en la replicación, y el ya mencionado papel de RMM2 en la resistencia a gemcitabina, apuntan a que la inhibición de esta cinasa sea clave en el tratamiento con gemcitabina (Buisson et al., 2015).

El primer inhibidor descrito de ATR es la cafeína, y se han descrito otros agentes inhibidores de la cinasa, que han mejorado el tratamiento con quimioterapia en líneas celulares de cáncer de mama y ovario, en conjunto con la inhibición del gen CD2K. (Peasland et al., 2011). De manera similar, con VE-821 un inhibidor de ATR se ha reportado una mejor respuesta al tratamiento con cisplatino y gemcitabina en líneas celulares de cáncer de ovario. (Huntoon et al., 2013).

La inestabilidad genómica de las células cancerosas comúnmente se debe a errores en la replicación de DNA y en la maquinaria de reparación, además son comunes

los defectos en la DDR en éstas células lo que ocasiona baja capacidad de reparación en comparación con células normales, así que varios de los medicamentos contra el cáncer actúan induciendo daños letales en el DNA, como la gemcitabina (Gross et al., 2015).

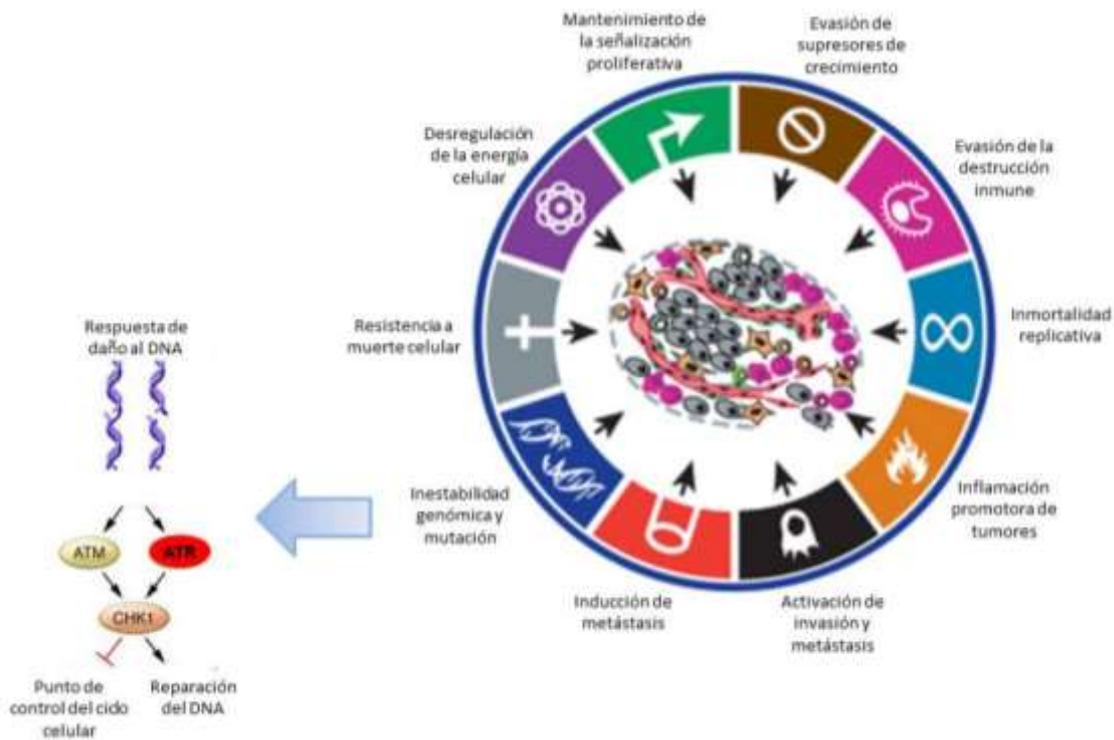


Figura 3. Importancia de ATR en la estabilidad genómica. La interrupción en la vía de ATR causa inestabilidad genómica, una de las características distintivas del cáncer. Modificado de (Hanahan et al., 2011) y (Gross et al., 2015).

Técnicas novedosas utilizadas

RNA de interferencia

Se han desarrollado otros agentes terapéuticos dirigidos a marcadores moleculares específicos en este cáncer, como RNAs de interferencia cortos (siRNAs), oligonucleótidos antisentido, restauración génica, inhibidores de moléculas pequeñas, inhibidores angiogénicos y de metaloproteinasas de matriz, inmunoterapia, nanopartículas, nanotubos de carbono y virus oncolíticos, entre otros (Yu et al., 2010).

La interferencia de RNA es una nueva herramienta donde se utilizan moléculas de RNA para silenciar la expresión génica. El RNA de interferencia corto (siRNA) y el RNA de horquilla corta (shRNA), han demostrado ser una buena técnica para el tratamiento de cáncer de páncreas, usándose como blanco genes implicados en el

crecimiento tumoral, metástasis, angiogénesis, supervivencia, antiapoptosis y resistencia a la quimioterapia (Yu et al., 2010).

Los shRNA son dos secuencias de RNA complementarias de 19-22 pb unidas por un bucle corto de 4-11 nt, similar a la horquilla que se encuentra en un miRNA natural. Después de transfectarse como vector plasmídico o introducirse por vectores virales, se integran al DNA, y se transcriben, posteriormente se une al RNA blanco y se incorpora al complejo RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA endógeno), por sus siglas en inglés, para la degradación de la secuencia diana. Una de las ventajas del silenciamiento con shRNA es que se pueden generar líneas celulares estables con el gen silenciado sin la necesidad de múltiples transfecciones.

Sin embargo, su generación requiere mucho tiempo, desde la preparación de la construcción hasta la selección de células resistentes a un fármaco o por marcadores fluorescentes (Moore et al., 2010). Por lo anterior se utilizó ésta técnica de inhibición esperando reducir los niveles de ATR y estudiar su efecto en dos líneas celulares de cáncer de páncreas.

Esferoides Tumorales Multicelulares (MTS)

Los cultivos en monocapa son uno de los principales modelos en cultivo celular, ya que son homogéneos en el reparto de nutrientes, oxígeno, entre otras ventajas, pero las interacciones tridimensionales no pueden ser recreadas (Nah et al., 2016).

En el estudio de cáncer se tiene que tener en cuenta que la heterogeneidad asociada al tumor se pierde con el cultivo en monocapa. Por lo cual se ha implementado el cultivo celular tridimensional, en la que se imita a los tumores in vivo con la expresión de antígenos, pH, gradientes de oxígeno dentro de su microentorno, la distribución de células en proliferación/quiescentes en el esferoide (Ho et al., 2012).

Hay dos tipos de esferoides tumorales, los clonogénicos y los agregados, los primeros provienen de una o varias células. Se han descrito varias técnicas para su generación, utilizamos la técnica *liquid overlay* (Carlsson et al, 1984) que consta de dos fases, en la primera se cultivan en cajas con una superficie antiadherente (esta

superficie antiadherente generalmente es agarosa) y estática que permite la formación de un agregado primario. En la segunda fase los esferoides se someten a una agitación orbital suave que favorece su formación (Nah et al., 2016).

Se distinguen tres capas de poblaciones celulares en los MTS: un centro apoptótico-necrótico que aparece en los esferoides de más de 500 μm de diámetro, una capa intermedia de células quiescentes que tienen tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación (Kunz, 1999).

Debido a las mencionadas ventajas del modelo, se formaron esferoides para evaluar el efecto de niveles bajos de ATR al ser tratados con gemcitabina.

ANTECEDENTES

Se ha reportado la importancia de ciertas cinasas en la tumorigénesis y supervivencia de las células cancerosas después de la terapia, lo que las hace potenciales blancos para el tratamiento del cáncer (Weber y Ryan, 2015).

Dados los antecedentes del posible papel de ATR sobre la resistencia y los resultados preliminares del 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 de la familia de las proteínas cinasas (Protein Kinase Library Dharmacon cat. RH56078). Los resultados permitieron identificar algunas cinasas que podrían estar involucradas en la resistencia intrínseca a fármacos antineoplásicos. Una de esas cinasas que presentó cambios en su expresión fue ATR, la cual presentaba sobreexpresión en líneas celulares tratadas con gemcitabina (resultados no publicados, sometidos a protección intelectual).

El presente trabajo está enfocado en la creación de dos líneas celulares de cáncer pancreático con niveles reducidos de la cinasa ATR y la evaluación del efecto de ésta al exponer a las células a gemcitabina.

JUSTIFICACIÓN

Debido al bajo porcentaje de supervivencia en los pacientes con cáncer pancreático, la resistencia al tratamiento con gemcitabina, a la incidencia de algunos factores de riesgo de éste cáncer en México como la obesidad, así como en el papel que tiene el gen ATR en la célula, es importante determinar si la inhibición del gen puede ser útil en el tratamiento con gemcitabina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si niveles reducidos de la cinasa ATR podrían afectar a la supervivencia de células de cáncer de páncreas después de quimioterapia con gemcitabina.

Objetivos particulares

- 1 Construcción del plásmido con el shRNA para silenciar el gen ATR.
- 2 Obtención de líneas estables con sh-ATR, y evaluar el silenciamiento del gen a nivel de mRNA.
- 3 Determinar el efecto de la inhibición del gen ATR con cambios en la IC_{50} respecto al control sh-Luc.
- 4 Analizar el efecto de la inhibición del gen ATR en un modelo de esferoides tumorales multicelulares.

HIPÓTESIS

Los niveles reducidos de la cinasa ATR en líneas celulares de cáncer de páncreas aumenta la sensibilidad al fármaco gemcitabina.

MÉTODOS

Cultivo celular

Utilizamos dos líneas celulares de cáncer de páncreas, CFPAC-1(ATCC® CRL-1918™) y HPAF-II (ATCC® CRL-1997™), las cuales se cultivaron en medio Corning® 1L Iscove's modificación de DMEM y en Corning™ Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), respectivamente. Ambas con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Cuando el cultivo llegaba a una confluencia del 80%, se trataron con tripsina y lavaron con PBS, para ser expandidas o criopreservadas, en SFB con DMSO al 5%.

La línea CFPAC-1 proviene de un adenocarcinoma en la cabeza del páncreas con metástasis hepáticas múltiples de un hombre de 26 años con fibrosis quística. Mientras que HPAF-II se obtuvo de las ascitis de un hombre de 44 años con adenocarcinoma de páncreas y metástasis en hígado, diafragma y ganglios linfáticos (Deer et al., 2010).

Esferoides Tumoraes Multicelulares (MTS)

Los esferoides se prepararon con la línea CFPAC-1. Se utilizó el método de MTS clonogénicos, en el cual a un volumen estéril de agarosa al 2% en PBS. Se añadió el mismo volumen de DMEM sin SFB, para obtener una concentración final de agarosa al 1% el cual se vertió en una caja p60 para formar una película antiadherente en la cual se sembraron 500,000 células en medio Leibovitz's con 10% de SFB y se incubaron de 3 a 4 días hasta que se formara el núcleo primario. Posteriormente se pasaron a una caja antiadherente y se colocaron en una incubadora con agitación orbital a 60 rpm, a una temperatura de 37 °C . También se generaron MTS agregados, en los que se sembraron 1,000,000 células en una caja antiadherente en medio Leibovitz's L-15 Medium (ATCC® 30-2008™) con 10% de SFB.

Para la medición de los esferoides se tomaron muestras del cultivo en suspensión, se observaron al microscopio y se fotografiaron para su posterior medición, la cual se realizó con el programa Image J. Se hizo cambio de medio con gemcitabina cada tercer día y se hicieron mediciones a los días 3, 6, 9, 12 y 15.

Construcción del shRNA en el vector pSIREN-RetroQ

A) Alineamiento de oligonucleótidos shRNA

- Se resuspendió los oligonucleótidos en buffer TE a una concentración final de 100 uM.
- Se mezcló los oligos Top y Bottom 1:1, se usaron 2 ul de cada uno.
- Se calentó la mezcla a 95°C por 3 segundos, después a 72°C por 2 minutos, a 37°C por 2 minutos y finalmente a 25°C por 2 minutos.
- Se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

B) Linearización del vector

Se realizó la linearización del vector RNAi Ready pSIREN-RetroQ (Clontech, No. Cat. 631526), mediante el corte con dos enzimas de restricción BamHI y EcoRI (New England BioLabs No. Cat R0136 y R0101 respectivamente) como se muestra en el mapa de la construcción (figura 4). La concentración del plásmido pSIREN-RetroQ fue de 150 ng/ul, así que se utilizaron 35.5 ul, 1 ul de cada enzima, 5 ul de Buffer NEB 3.1 y 8.5 ul de agua destilada, obteniendo un volumen total de 50 ul, se incubó por 3 horas a 37 °C y a temperatura ambiente toda la noche.

Para comprobar los cortes realizados con las enzimas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 100 Voltios por 50 minutos y se usaron 3 ul de una dilución 1:10 de plásmido no digerido, 6 ul del plásmido digerido y el marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder de New England BioLabs.

Se realizó la extracción de DNA en gel de agarosa con el kit QIAquick® de la digestión enzimática siguiendo el protocolo del proveedor.

C) Ligación de los oligonucleótidos alineados. Se realizó con RNAi-Ready pSIREN

- Se diluyó los oligonucleótidos alineados a 0.5 uM con buffer de TE
- Para una reacción se usaron los siguientes reactivos:

2 ul de plásmido linearizado,
1 ul de oligonucleótido diluido
4 ul de 5x rapid ligation buffer
1 ul de T4 DNA ligasa
12 ul de agua libre de nucleasas

- Se incubó 1 hora a 22°C en baño seco y se guardó a 4 °C

Se ligó la siguiente secuencia:

ATR cadena sentido

5'-

GATCCGCCGGATACTTACAGATGTA AATTCAAGAGATTTACATCTGTAAGTATCC
GGTTTTTTACGCGTG (70pb)

ATR cadena antisentido

3'-

GCGGCCTATGAATGTCTACATTTAAGTTCTCTAAATGTAGACATTCATAGGCCAA
AAAATGCGCACTTAA (70pb)

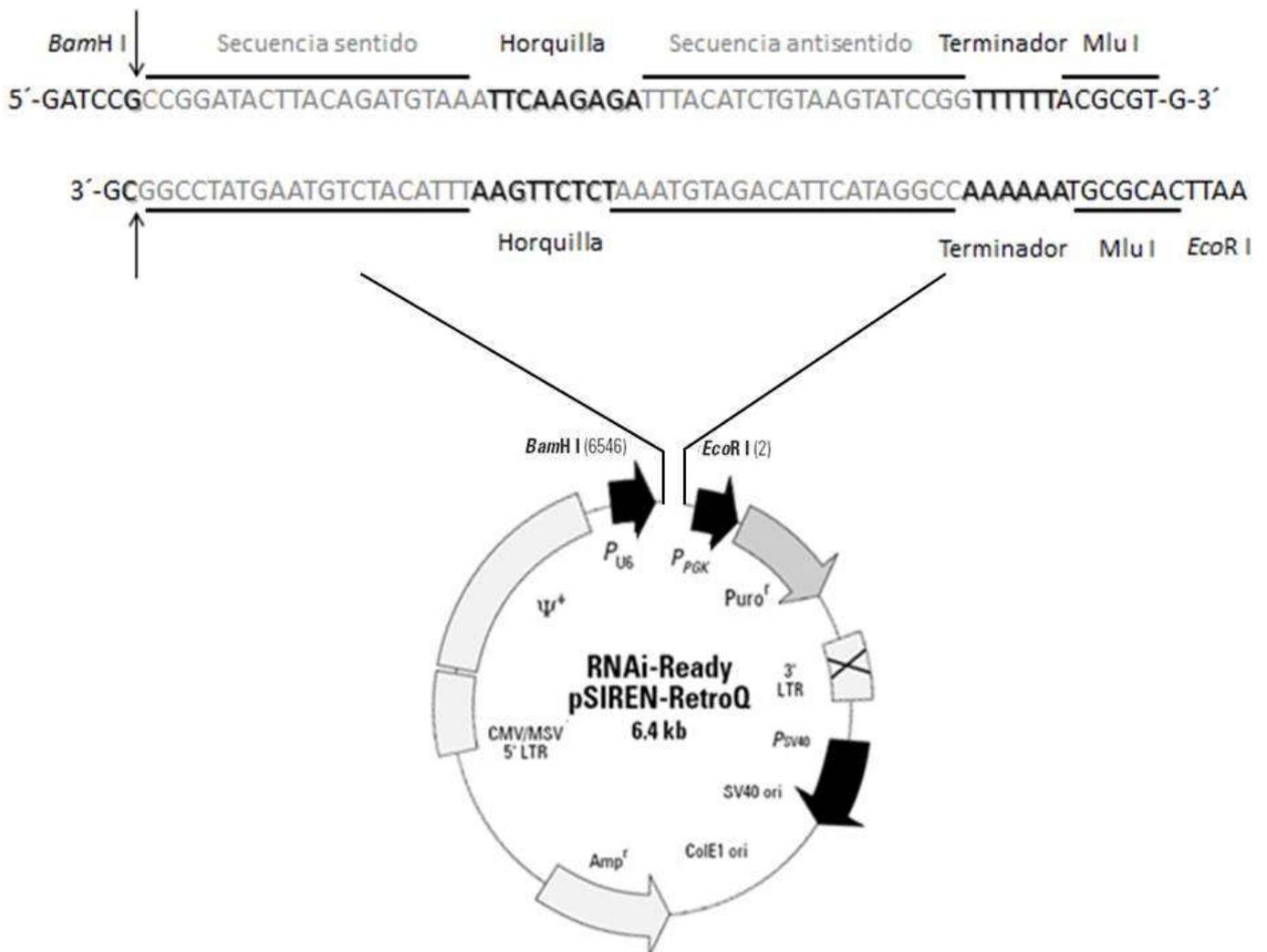


Figura 4. Mapa de la construcción de shRNA-ATR en el plásmido pSIREN-RetroQ. Se señala con una flecha la purina requerida para el inicio de la transcripción por la RNA pol III, la secuencia de la horquilla es una de las secuencias usadas para generar shRNA. Para la terminación se utiliza una cola poli T, seguido de un sitio de restricción único, el cual permite la confirmación de que las reacciones de ligación y clonación fueron exitosas al encontrarse el inserto, en este caso se usó la enzima *Mlu*I.

Transformación bacteriana

Bacterias de *E. coli* DH5 alfa se transformaron con el plásmido, que contiene un cassette de resistencia a ampicilina, lo que nos permitió seleccionar las bacterias transformadas. Se realizó lo siguiente con 4 colonias:

- Se sembraron bacterias *E. coli* DH5 alfa y se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C, posteriormente, utilizando un asa bacteriológica se transfirió una porción de 4 x 4 mm en 1.5 ml de medio C (atemperado a 37 °C), se resuspendió e incubó durante 2 horas en agitación (200 rpm) a 37 °C.
- Se obtuvo el pellet por centrifugación, 1 minuto a 1000 rpm el cual se resuspendió en 120 ul de solución T y se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se agregaron 5 ul de la mezcla de ligación y se mantuvo en hielo por 2 minutos.
- Se sembraron 50 ul en una caja petri con medio LB y se dejó incubar toda la noche a 37 °C

Purificación del plásmido

Se realizó un MiniPrep (aislamiento de DNA plasmídico bacteriano por lisis alcalina) de las cuatro colonias, con QIAprep® Spin Miniprep Kit, (No. de Cat. 27106, siguiendo el protocolo. Posteriormente para obtener mayor cantidad de plásmido se realizó un MidiPrep, HiSpeed® Plasmid Midi Kit (número de catálogo 12643), siguiendo el protocolo del proveedor. Se verificó la inserción del shRNA en el plásmido mediante secuenciación Sanger, la cual se realizó en la Unidad de Alta Tecnología del INMEGEN, se enviaron 20 uL a una concentración de 200 ng/uL y 30 uL de U6 primer Forward.

Digestión con Mlu I

Se realizó la digestión del vector con Mlu I (New England BioLabs™, No. Cat. R0198S), para verificar la inserción del plásmido. Para la reacción se utilizaron

- 5uL de plásmido
- 2uL de NEBuffer
- 0.5uL de enzima Mlu I
- 12.5ul de agua, teniendo 20uL totales. Se incubó por tres horas a 37°C y toda la noche a temperatura ambiente.

Se corrió un gel de agarosa al 1% a 100 Voltios por 70 minutos.

Transfección celular y establecimiento de líneas estables

En cajas de 6 pozos se sembraron 300 000 células, las cuales se dejaron adherir durante 24 h en la incubadora a 37°C, con 5% de oxígeno. Se transfectaron con Xfect™, siguiendo el protocolo de clontech (PT5003-2). Se transfectó también un control con el gen de luciferasa (LUC) para cada línea celular. Se utilizó 5 ug de cada plásmido, 27 uL de ATR con concentración de 183 ng/uL y LUC 19 uL con concentración de 260 ng/uL.

Curva de dosis letal de puromicina

Con el fin de hacer una selección positiva de las células transfectadas, se determinó la dosis letal de puromicina, para esto, de cada línea celular se sembraron 5000 células en cajas de 96 pozos, se dejaron adherir toda la noche y se les administro las siguientes concentraciones de fármaco: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7.5 y 10 ug/ml. Se expusieron por 48 horas y finalmente se midió la viabilidad por MTT.

Se procedió con la generación de las líneas estables, se utilizó 0.5 ug/mL y 1ug/ml para CFPC-1 y HPAF-II respectivamente. Para seleccionar: una vez transfectadas se incubaron con la respectiva concentración de puromicina junto con una caja control (sin shRNA), se cambió el medio con fármaco cada tercer día y se mantuvo hasta que las células del control murieron.

Ensayo de viabilidad con MTT

El MTT (Es una técnica usada para observar supervivencia y proliferación celular, al ser un ensayo colorimétrico cuantitativo en el que se mide la respiración celular, en específico, la reducción del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la enzima deshidrogenasa mitocondrial formando un producto del formazán. La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas. (Chapdelaine, 2001).

Se sembraron 5000 células estables por pozo, en una placa de 96 pozos, las cuales se incubaron a 37°C con 5% de CO2 durante 24 h para permitir su adherencia. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de gemcitabina (Gemcitabine hydrochloride, SIGMA G6423) 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 uM, para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), (que se define como la concentración de fármaco requerida para inhibir el crecimiento celular en un 50%) Los experimentos se realizaron por triplicado técnico y biológico.

Se utilizó el método propuesto por F. Denizot y R. Lang (Chapdelaine, 2001)

- Se removió el medio de las células y adicionó 10 uL de MTT a 5 mg/mL más 90 uL de medio sin SFB y sin rojo fenol
- Se incubó por 3 horas a 37°C en 5% de oxígeno.
- Se removió el MTT y para solubilizar el formazán se utilizaron 50 uL de isopropanol
- Se midió la absorbancia a 560-690 nm.

En el espectrofotómetro para Microplacas Epoch™, se midió la absorbancia de la placa a la longitud señalada se obtuvo la diferencia, para así eliminar el ruido de fondo y se hicieron los respectivos cálculos para la obtención de la IC₅₀.

Posteriormente, se repitió la prueba con las células estables de ambas líneas celulares, en el caso de CFPAC-1, se sometieron al fármaco solo por 48 horas ya que mostraron mayor sensibilidad. Y en ambos casos solo se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.001, 0.01, 0.1 y 1, ya que la prueba con las células parentales permitió acotar las concentraciones de gemcitabina.

Extracción de RNA total

Se realizó la extracción de RNA de cajas T75 con 70-80% de confluencia celular.

Se utilizó el reactivo TRIzol™ Invitrogen™ (No. Cat. 15596026).

- Se sumergió por 5 minutos un raspador estéril en agua DEPC.
- Se raspó la caja en 1mL de medio, se colectó en un microtubo y se centrifugó a 1000 rpm 5 minutos.
- Posteriormente se retiró el medio, el pellet se resuspendió en un volumen de TRIzol™
- Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adiciono cloroformo (200 uL por cada 1000 ul de TRIzol™), agitar e incubar 10 minutos en hielo.
- Se centrifugó a 8000 rpm a 4°C por 10 minutos y colectar el otro tubo a primera de las tres fases formadas (fase acuosa) y se añadió isopropanol (la mitad de la cantidad de TRIzol™ utilizada).
- Se almacenó a -20°C toda la noche, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm 15 minutos a 4°C y se eliminó el isopropanol.
- Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 70% en agua DEPC, se centrifugó 5 minutos a 10,000 a 4°C, se retiró el etanol y se dejó secar el pellet.

-Se resuspendió el pellet en agua DEPC y finalmente se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis.

Para comprobar la integridad y calidad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100 Voltios por 60 minutos, se utilizaron 100 ng/uL de RNA.

Obtención de cDNA y qRT-PCR

Para la obtención de cDNA, se trataron las muestras de RNA con DNasa, (RQ1 RNase-Free DNase, No. Cat. M6101), siguiendo el protocolo. Posteriormente se realizó la reacción de RT-PCR, utilizando 1000 ng de RNA tratado con DNasa, se usó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, (No. Cat. 4368814), siguiendo el protocolo. En el termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Se realizó qRT-PCR, usando 100 ng de cDNA con el kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, No. Cat. 4309155) siguiendo el protocolo, usando las condiciones sugeridas del termociclador para T_m mayores o iguales a 60°C. Se realizaron los experimentos en el 7900HT Fast Real Time PCR-System (Applied Biosystems™)

Se utilizaron los siguientes primers para el gen ATR

	Secuencia 5´-3´	T_m	Longitud	Inicio	Producto
Forward	TTCCAAAGCGCCACTGAATG	60	20	7838	81 pb
Reverse	AGTCGCTGCTCAATGTCAAG	59.1	20	7918	

Se utilizó el PPIA (Peptidil Propil Isomerasa A) como gen constitutivo de referencia. Para calcular los niveles relativos de expresión génica se usó el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba T de Student de datos no pareados, donde se comparó la IC_{50} de Luc vs ATR, para determinar si el cambio fue estadísticamente significativo. La prueba se realizó en el programa GraphPad Prism 7.

RESULTADOS

Construcción del vector

Para la construcción del vector, primero se alinearon los oligonucleótidos, posteriormente se linearizó el vector, se cortó con las enzimas *Bam*H I y *Eco*R I. El plásmido no digerido pesa 6.4 kb, como se observa en la figura 5, en el carril del plásmido digerido se observan las dos bandas esperadas, con pesos de aproximadamente 5.5 y 1.2 kb.

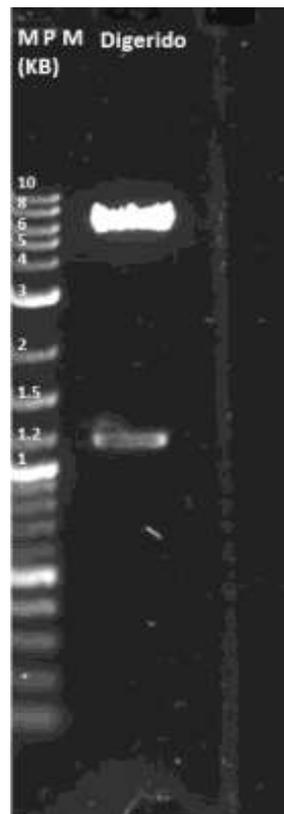


Figura 5. Digestión del plásmido. El primer carril pertenece al marcador de peso molecular, en el segundo el plásmido digerido.

Linearizado el vector, se procedió a hacer la ligación con los oligonucleótidos, como se muestra en la figura 4. Para obtener la cantidad de plásmido que se requiere para la transfección en las líneas celulares, se transformaron colonias de bacterias *E. coli* DH5 alfa, seguido de la purificación del plásmido mediante Miniprep de 4 colonias seleccionadas. Para comprobar la inserción del shRNA en el plasmido, se realizó una digestión con *Mlu* I, y como se observa en la figura 6, la colonia 1 muestra el bandeo esperado de la digestión con la enzima, así que con ésta se trabajó los sucesivos experimentos.

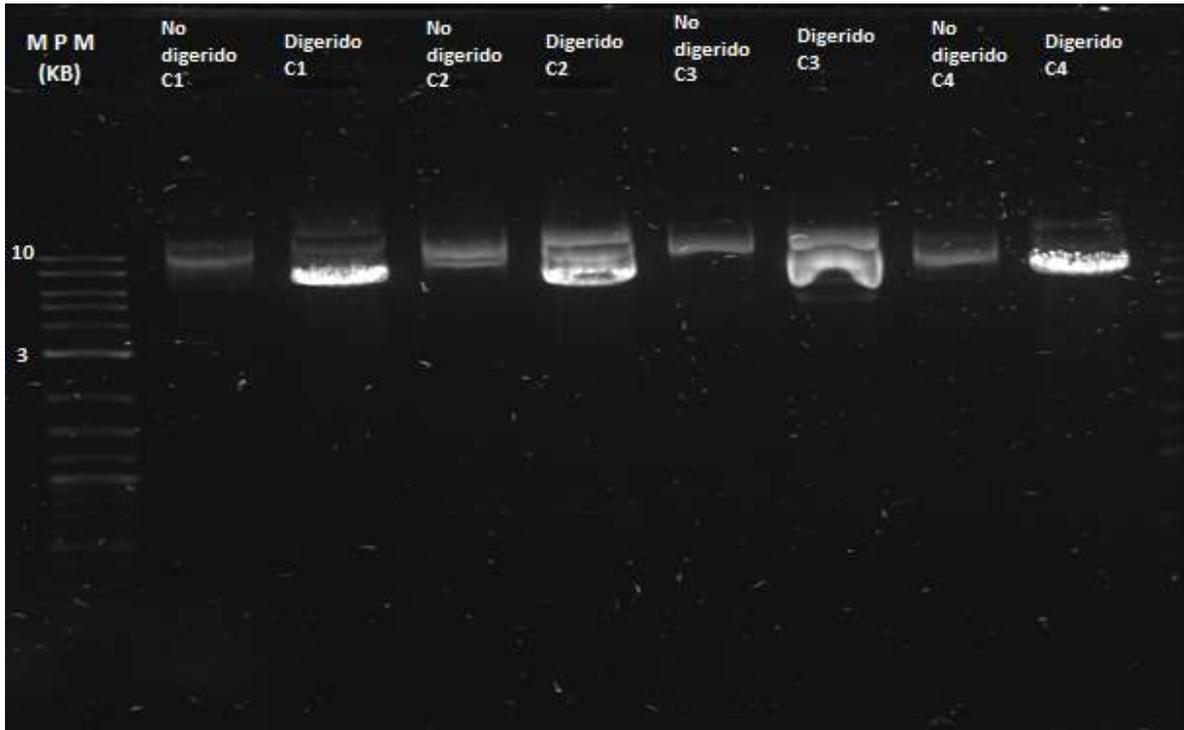


Figura 6. Digestión con Mlu I de las cuatro colonias seleccionadas.

Se realizó un midiprep con la colonia mencionada, obteniéndose 183 ng/uL en 500 uL. Para confirmar la construcción, se mandó a secuenciar mediante secuenciación por capilar.

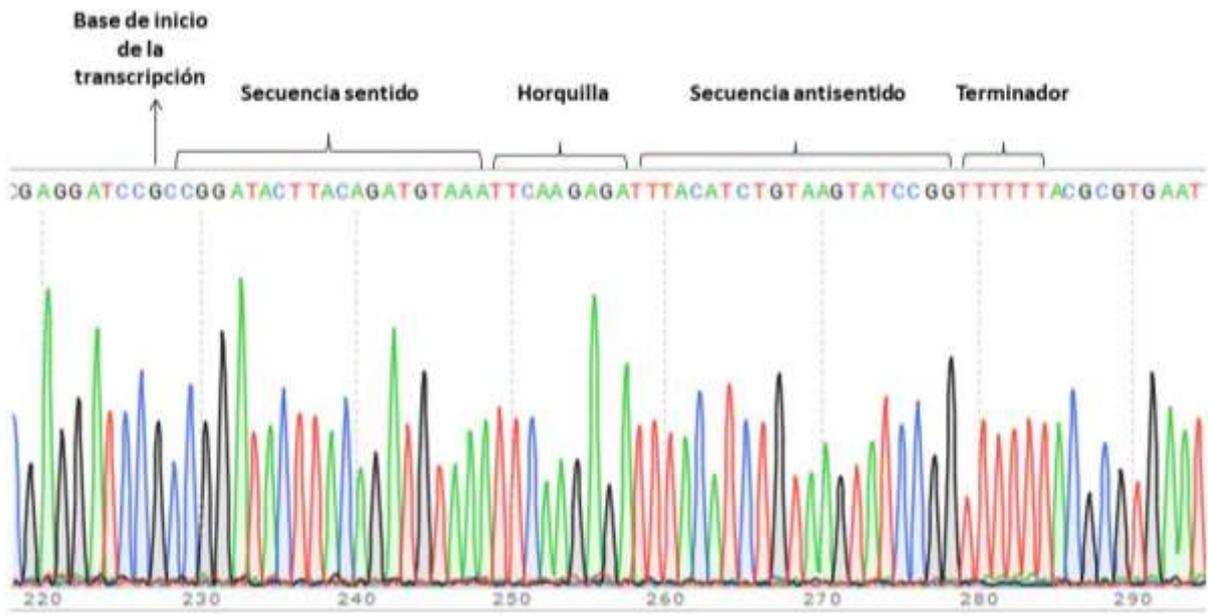


Figura 7. Cromatograma de secuenciación.

La construcción del vector fue exitosa, pues en el cromatograma (figura 7) se encontraron las secuencias del sh-ATR que se buscaban. La secuenciación fue de calidad, al mostrar picos únicos, separados entre sí y con poco ruido de fondo.

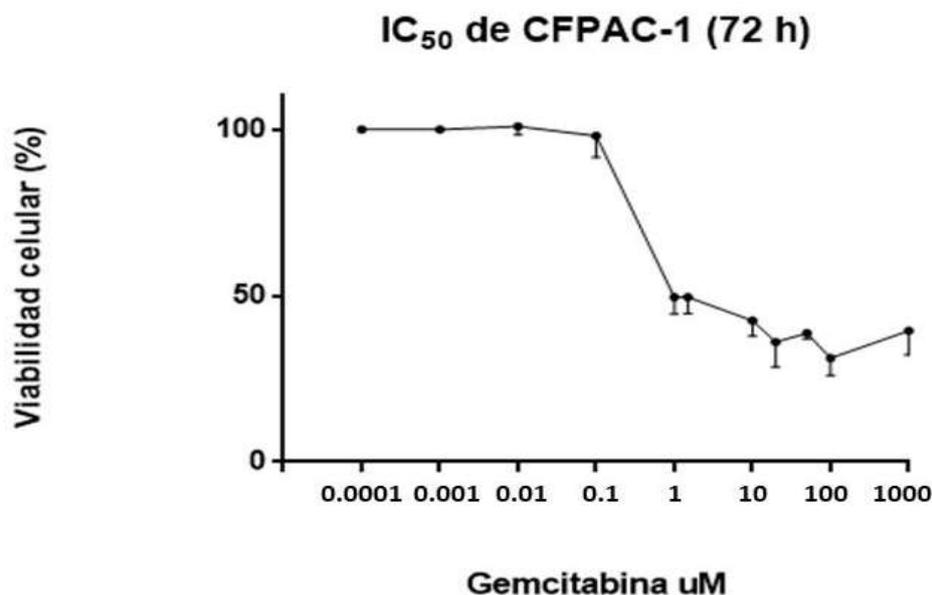
Ensayo de inhibición del crecimiento (Obtención del IC₅₀ de gemcitabina en células en monocapa)

Con el fin de obtener un rango de concentración de gemcitabina a utilizar, se calculó la IC₅₀ (dosis a la cual muere el 50% de la población) en las líneas celulares CFPAC-1 y HPA-II provenientes de adenocarcinomas pancreáticos, para eso, se estandarizó la prueba de MTT que permite obtener el porcentaje de células vivas con cada concentración, y después hacer los cálculos correspondientes.

Las células se trataron con gemcitabina a diferentes tiempos, y a distintas concentraciones (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 uM).

Como se muestra en la figura 8 para CFPAC-1 se obtuvo una IC₅₀ de 0.962 uM a las 72 horas, mientras que para HPAF-II de 0.0660 uM a las 96 horas con tratamiento. El fármaco se mantuvo en el medio de cultivo hasta 96 horas para HPAF-II debido a que ni a las 48 ni 72 horas se observó muerte en al menos el 50% de las células, como se observa en la figura 1 de Anexos.

A)



B)

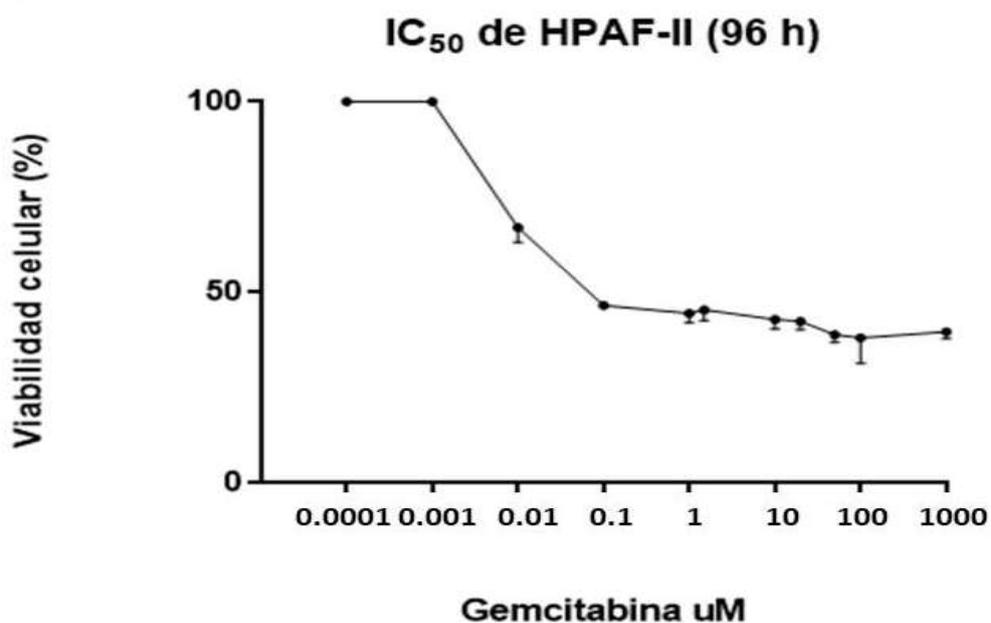


Figura 8. Gráfica de viabilidad de las líneas celulares tratadas con diferentes concentraciones de gemcitabina. **A)** En la línea celular CFPAC-1 no se observa muerte en las concentraciones de 0.001 uM y 0.1 uM a las 24, 48 ni 72 horas, sin embargo se ve un cambio significativo en la concentración de 1 uM a las 72 horas. **B)** En el caso de HPAF-II no hay muerte menor al 60% con la concentración de 10 uM a las 72 horas, sin embargo a las 96 horas se observa un cambio drástico a la concentración de 0.1uM.

Inhibición del gen ATR

A continuación se transfectaron las líneas celulares con el plásmido que contiene el shRNA-ATR y se expusieron al agente de selección. En este caso empleamos

puromicina, ya que el vector contiene un casete de resistencia a este fármaco. La concentración utilizada fué de 0.5 ug/mL para CFPAC-1 y 1 ug/mL para HPAF-II, (Figura 2 de Anexos).

Por otro lado, se midió el porcentaje de inhibición del gen, para lo cual se crecieron células en cajas T75 y a una confluencia del 70% se extrajo RNA con trizol, para sintetizar cDNA y medir la expresión del gen mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), PPIA se utilizó como gen referencia para los respectivos cálculos.

En la figura 9 se aprecia que en la línea CFPAC-1 hubo mayor inhibición del gen, lo cual puede influenciar en la disminución observada de la IC₅₀ entre las líneas celulares.

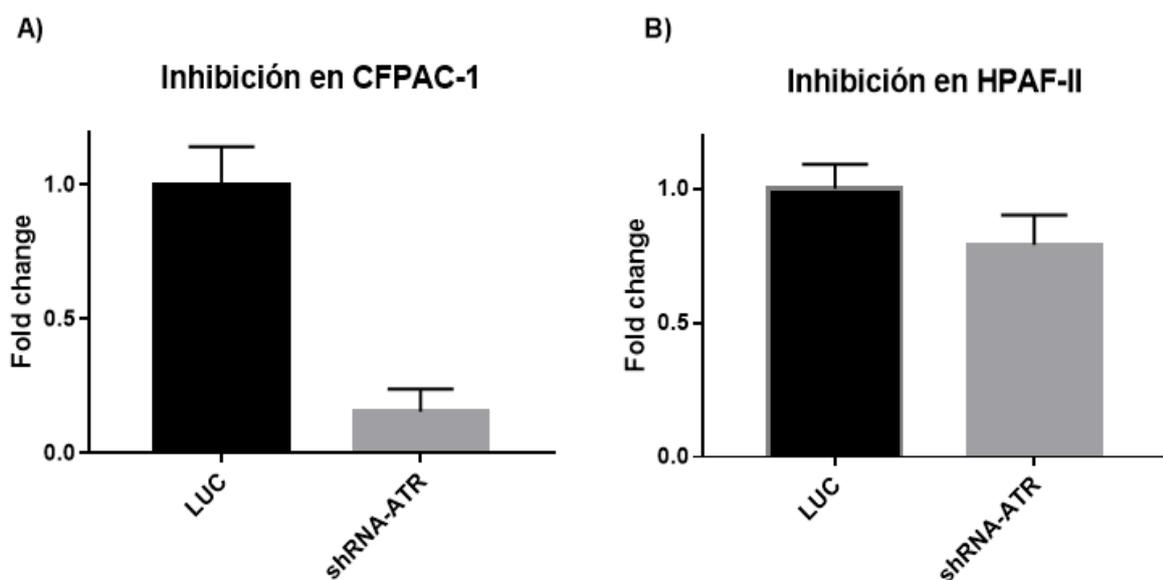


Figura 9. Inhibición del gen ATR en las líneas celulares CFPAC-1 y HPAF-II. En la figura A se obtuvo una inhibición del 85% para CFPAC-1 y 30% para HPAF-II.

Como control, se transfectaron células con el mismo plásmido conteniendo una secuencia de luciferasa (Luc), lo que permite discriminar cambios ocasionados por la transfección/selección.

Por otro lado, una vez determinado el rango de concentraciones de gemcitabina a utilizar en cada línea celular, las células estables con el shRNA-ATR, se sembraron bajo las mismas condiciones. Se trataron con el fármaco para determinar si la

inhibición de ATR ocasiona un cambio en la IC_{50} . Se realizaron ensayos por triplicado biológico y técnico.

Como se observa en la figura 10, hubo disminución en la IC_{50} de las células con shRNA, en CFPAC-1 bajó a 0.451 μ M y 0.0339 μ M en Luc y ATR respectivamente. Mientras que en HPAF-II bajó a 0.0819 μ M para Luc y 0.0265 μ M para ATR.

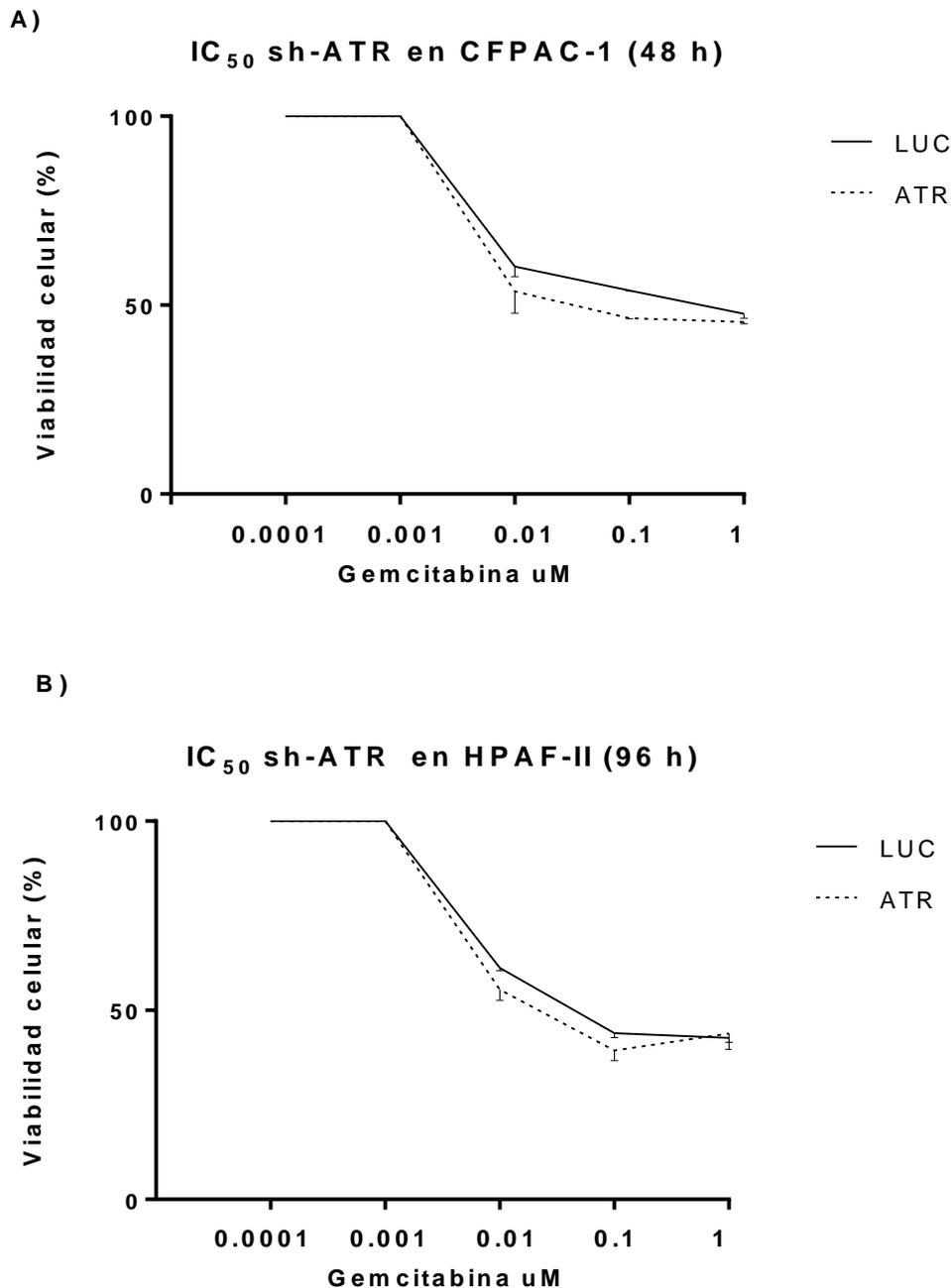


Figura 10. Determinación de la IC_{50} en las células estables con sh-ATR. A) Se midió la viabilidad celular con un ensayo de MTT, posterior a un tratamiento de 48 horas con gemcitabina. B) Se midió la viabilidad celular con en ensayo MTT después de tratar a las células por 96 horas. Ambos experimentos se realizaron por triplicado biológico y técnico. La IC_{50} fue calculada a partir del gráfico.

Se realizó una prueba T de Student no pareada para determinar si las diferencias entre las IC_{50} son estadísticamente significativas.

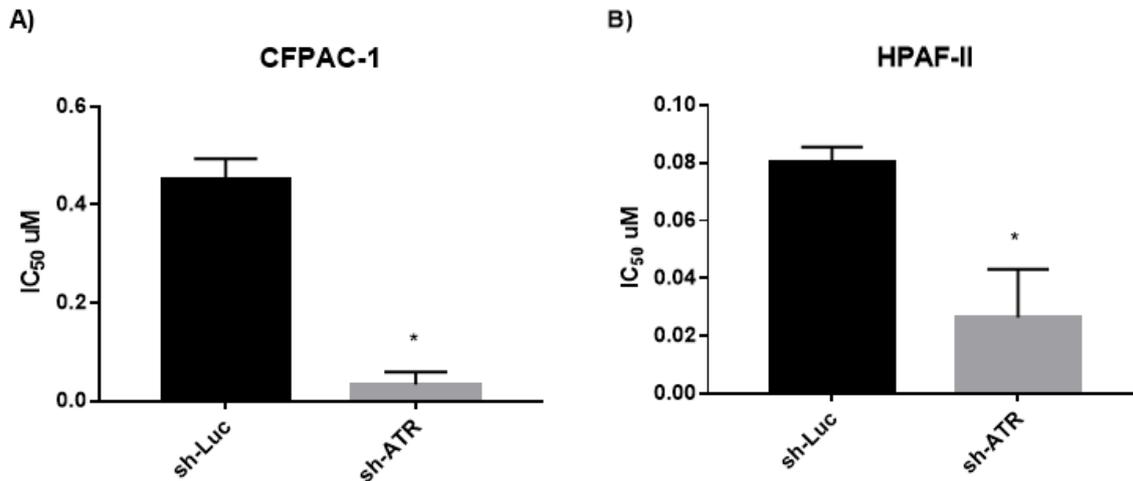


Figura 11. Prueba T de Student no pareada, en ambas líneas se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa, En la figura A se observa una disminución en la IC_{50} de más del 70% en las células con sh-ATR, mientras que en la figura B, la disminución no es tan marcada, pero disminuye más del 50% del control.

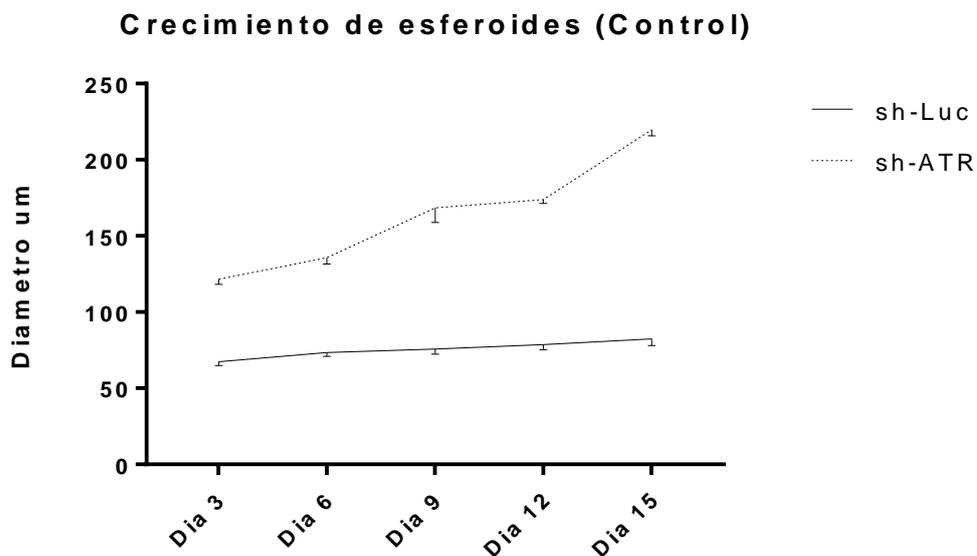
Finalmente se utilizó un modelo que permite recrear heterogeneidad celular, generándose esferoides tumorales multicelulares (MTS) agregados, los cuales se también se sometieron al tratamiento con gemcitabina como se describe en la metodología.

Al no conseguir la generación de esferoides de la línea CFPAC-1 con ninguno de los métodos descritos anteriormente, los experimentos se continuaron solo con esferoides agregados de la línea HPAF-II.

Se formaron dos grupos, el control, compuesto por esferoides sh-Luc y sh-ATR y el grupo tratado con gemcitabina. Se utilizó la IC_{50} de la línea celular estable.

En la figura 12 se observa el crecimiento de los esferoides, en ambos casos los esferoides formados con sh-ATR son al menos 40% más grandes que los formados en sh-Luc, sin embargo, fueron menores en número.

A)



B)

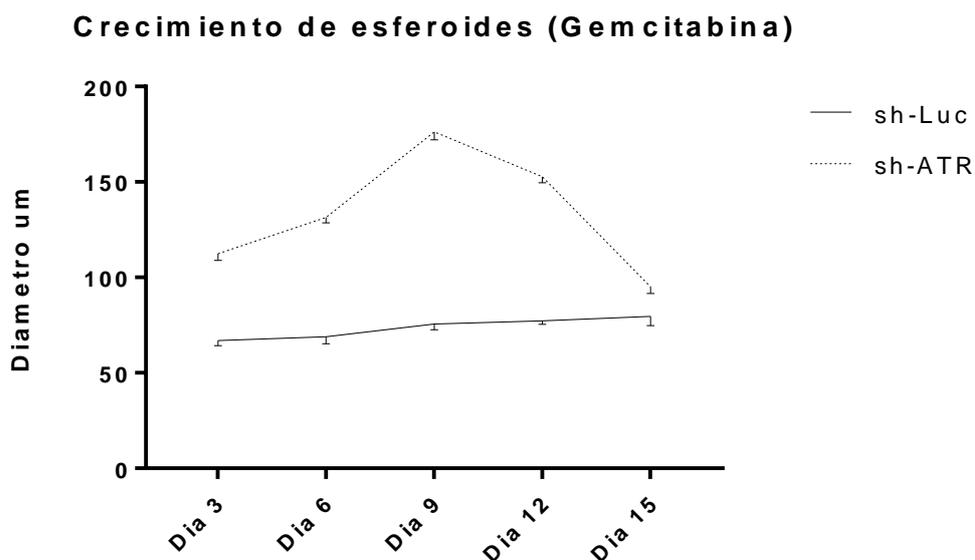


Figura 12. Curva de crecimiento de esferoides de la línea HPAF-II. Medidas de los esferoides (um). A) Crecimiento de los esferoides sin exposición a gemcitabina; B) Crecimiento de los esferoides expuestos al fármaco. Las medidas se obtuvieron con el programa Image J.

En la figura B) se nota disminución en el diámetro con sh-ATR a partir del día 9, llegando a medir el día 15 el 50% del diámetro de los esferoides que no estuvieron expuestos a gemcitabina, incluso fueron menores las mediciones en el día 15 con sh-ATR-Gem, en comparación con el día 3 sin exposición al fármaco, fenómenos

que no ocurren en sh-Luc, lo cual apunta a que los niveles bajos del gen ATR en el tratamiento con gemcitabina podría tener un papel importante.

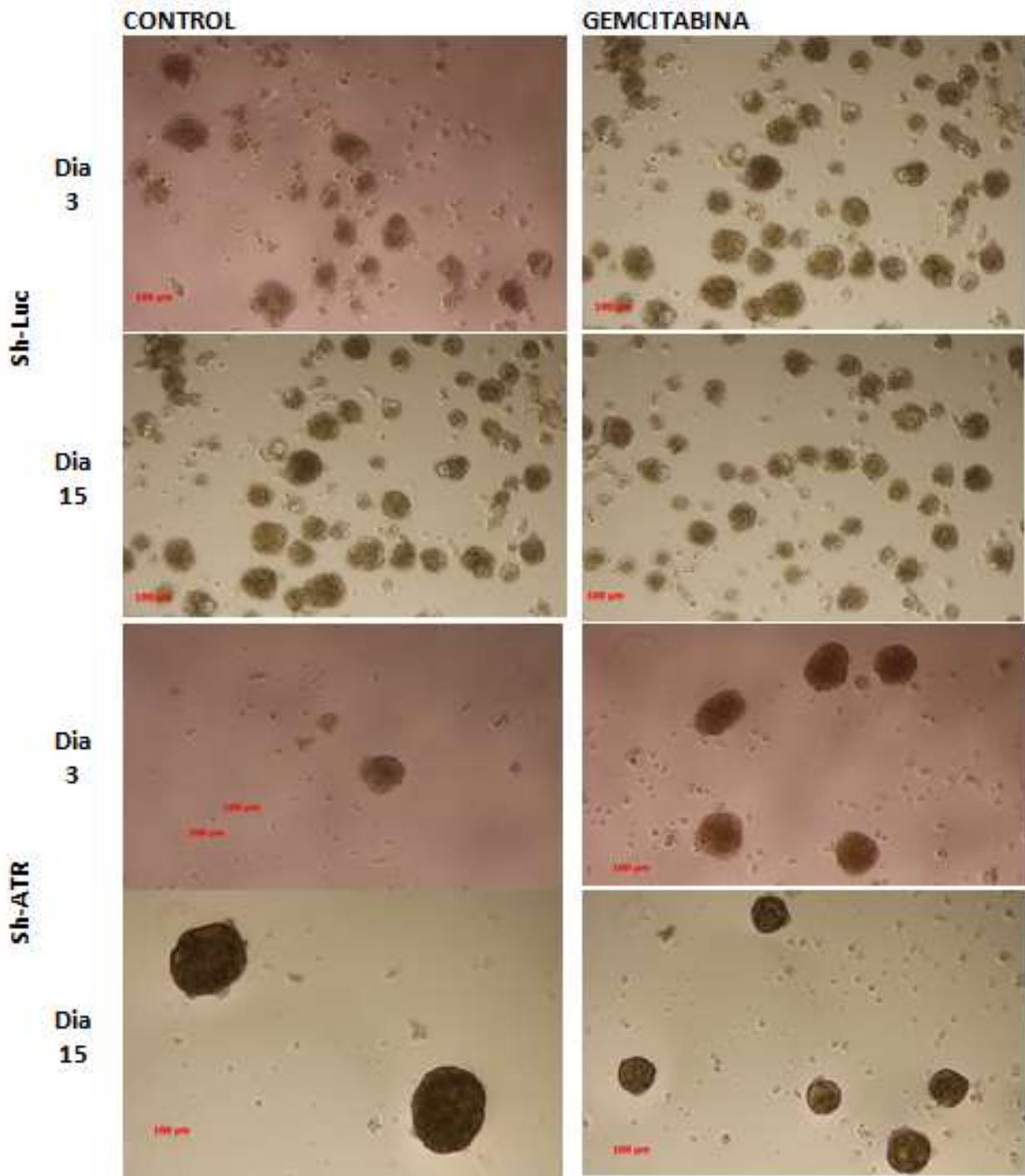


Figura 10. Fotografías de los esferoides a diferentes días. Se puede ver el crecimiento y posterior reducción en los esferoides, con una reducción más marcada en los esferoides sh-ATR.

En la figura 10 se pueden observar los fenómenos descritos anteriormente, el mayor número de esferoides formados con sh-Luc, tanto en el grupo no tratado como en el tratado forman esferoides más pequeños respecto a los formados con sh-ATR y éstos como son visiblemente más grandes a los últimos días en el grupo no tratado con gemcitabina.

DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas se posiciona como la séptima causa de muerte entre hombres y mujeres a nivel mundial, tiene la más alta mortalidad, pues para el 2018 se reportó el número de muertes ($n= 432,000$) como nuevos casos ($n= 459,000$), (Bray et al., 2018). La alta mortalidad del cáncer se debe a que es una enfermedad silenciosa y no se cuenta con marcadores para su detección temprana, así que cuando se diagnostica el cáncer ya se encuentra en una etapa avanzada o metastásica, siendo ya imposible su resección quirúrgica. En este caso, el tratamiento de primera línea es la quimioterapia con gemcitabina, que no es del todo exitosa, ya que los pacientes pueden presentar resistencia al fármaco desde el inicio del tratamiento o adquirirla durante el tratamiento.

En este proyecto nos enfocamos en el papel de la inhibición de ATR, una cinasa de respuesta al daño del DNA, como rompimientos de doble cadena, regula los sitios de origen de replicación, repara las horquillas de replicación dañadas y previene una mitosis prematura. Estos mecanismos son de especial interés en el cáncer, por ejemplo, la respuesta al daño es una vía de transducción de señales en la que se coordina la transición del ciclo celular, la replicación y reparación del DNA, y la apoptosis, (Karlene et al., 2008), podría ser un punto clave para mejorar el tratamiento con gemcitabina, además de esto, ATR también modula la expresión de RR, así que respaldados en lo anterior se probó el papel de la inhibición de ATR mediante el uso de un sh-RNA en las líneas celulares CFPAC-1 y HPAF-II.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la IC_{50} en los experimentos de cultivo en monocapa de las células sh-ATR, en comparación con el control (sh-Luc), lo que quiere decir, que los niveles bajos de esta cinasa podrían beneficiar al mecanismo de acción de la gemcitabina en estos cultivos celulares de cáncer de páncreas. Entre las líneas celulares trabajadas, la más sensible fue CFPAC-1 que mostro tener una IC_{50} más baja y a menos tiempo que HPAF-II, lo cual puede deberse a la resistencia propia de cada línea celular lo cual puede ser resultado de distintas mutaciones y alteraciones epigenéticas de cada línea. Si bien ambas, poseen las mutaciones características del cáncer pancreático como alteraciones en K-ras, p53, p16 y DPC4, pueden presentar algunas adicionales, ó diferencias en el lugar y tipo de mutación, (Abramson et al., 2007), o por el nivel de inhibición de ATR, ya que como se observa en la figura 9, se obtuvo mayor

inhibición en CFPAC-1 al menos en RNA mensajero. Como parte de las perspectivas, se pretende cuantificar a nivel de proteína con Western blot.

Posterior a estos resultados, se quiso comprobar la reproducibilidad de este fenómeno en un modelo de esferoides tumorales multicelulares agregados. Los esferoides nos permiten recrear un entorno celular más parecido al de tumor, ya que las diferentes capas celulares del esferoide no reciben de manera homogénea los nutrientes, oxígeno y en este caso el fármaco (Nah et al., 2016).

Se intentó el establecimiento del modelo en las dos líneas celulares, sin embargo en CFPAC-1, aún tratando las dos técnicas ya descritas, no se logró. Esto podría deberse a que la transfección influyó de alguna manera, ya que en el laboratorio se han hecho con células parentales (Aguilar, 2019).

Como solución podría utilizarse un inhibidor de ATR, por ejemplo AZ20 (No. Cat. A3210, APEX BIO), un inhibidor selectivo que ha mostrado actividad antitumoral en cáncer colorrectal, tanto *in vitro* como *in vivo*, (Foote et al., 2013) y tratar de formar nuevamente MTS y realizar en éstos los respectivos experimentos.

En cuanto a HPAF-II se observó una importante disminución en el diámetro de los esferoides tratados con gemcitabina con el gen inhibido (sh-ATR) respecto al control de transfección (sh-Luc), en el cual solo se observa un crecimiento respecto al tiempo, lo cual apunta que el mecanismo de acción de la gemcitabina mas, niveles bajos del gen ATR afectan el crecimiento del esferoide, esto podría ser importante en el tratamiento de éste cáncer.

En los primeros días se observa un mayor diámetro en los esferoides con sh-ATR control y tratados con gemcitabina, esto puede deberse a la presencia de mayor población CSC (células troncales cancerígenas) en el esferoide, estas células tienen la capacidad de auto-renovación y dan lugar a células de tejidos diferenciados, además se ha descrito un aumento en la DDR en estas células lo cual puede deberse a la pérdida de genes de reparación, como ATR y cuentan con mecanismos de protección y reparación más eficiente que en las células diferenciadas (Chang et al., 2015) lo que en parte contribuye a su radio y quimio resistencia al activar su mejorada respuesta al daño y reparación del DNA. Para comprobar lo anterior en el fenómeno observado del día 3 al 9, como perspectivas se tienen la identificación de posible población CSC para lo cual se debe repetir la formación de los esferoides y

al día 3, 6 y 9, disgregarlos y mediante marcadores de superficie medir la población de CSC pancreática como CD44v6, c-Met, Tspan8, alpha6beta4, CXCR4, CD133, EpCAM y claudin7 (Heiler et al., 2016).

Mientras que en sh-ATR, después del día 9 de tratamiento comienzan a decrecer llegando a ser más pequeños al día 15 que el primer día de medición, esto puede deberse a la gemcitabina, ya que ciclos repetidos de tratamientos dañinos al DNA mueren principalmente las células no *stem* (Ronco et a., 2017) al tener deficiencia en ATR lo que les impide atender los daños ocasionados por el fármaco. Lo cual es consistente con los esferoides Luc ya que no se observa un decremento importante al administrar el fármaco.

Otro fenómeno observado, fue el número de esferoides formados, menor en los sh-ATR, tanto en el grupo control como en el tratado con gemcitabina, en comparación con los formados con sh-Luc. El número de esferoides está relacionado a la capacidad de adhesión celular, aunque no se ha reportado la influencia de la inhibición de la cinasa en la unión celular.

Los cambios observados en los experimentos en cultivo en monocapa así como los esferoides tumorales apuntan a que niveles bajos de ATR tiene repercusiones en las células tratadas con gemcitabina, lo cual podría estudiarse y en el futuro sumado a la quimioterapia, utilizarse un inhibidor de ATR en beneficio a los pacientes con cáncer de páncreas.

CONCLUSIONES

*La inhibición de ATR mediante RNA de horquilla corta, en cultivo en monocapa de líneas celulares estables CFPAC-1 y HPAF-II muestra una disminución estadísticamente significativa en la IC₅₀ respecto al control, lo cual apunta a que el gen ATR tiene un importante papel en la supervivencia de estas células.

*En el modelo de esferoides tumorales multicelulares proveniente de células estables con sh-ATR a pesar de que en un inicio los esferoides son más grandes que en el control, se observó drástica disminución en el diámetro después de 9 días en tratamiento con gemcitabina, respecto al control no tratado, y una disminución en número respecto al control sh-Luc.

Con lo anterior se concluye que al exponer ésta línea celular de cáncer de páncreas con gemcitabina más, niveles bajos del gen ATR se reduce la supervivencia celular al observarse disminución en el diámetro de los esferoides, lo cual podría presentar beneficios en el tratamiento de éste cáncer.

Anexo 1

Figura 1. Determinación de la IC_{50} en las células estables con sh-ATR a diferentes tiempos. A) En la línea celular CFPAC-1 se decidió trabajar los posteriores experimentos hasta las 72 horas, tiempo adecuado para el cálculo de la IC_{50} , B) Para HPAF-II se observó una disminución hasta las 96 horas.

Anexo 2

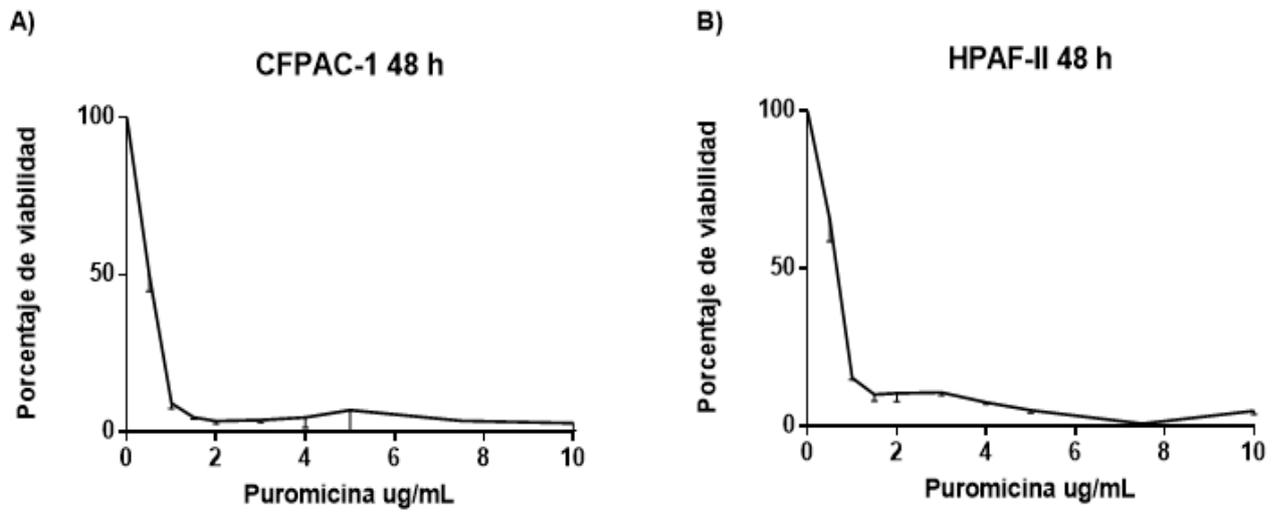


Figura 2. Gráfica de viabilidad celular con puromicina en células parentales.

Referencias

Abramson, M. A., Jazag, A., van der Zee, J. A., & Whang, E. E. (2007). The molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*, 1(4 Suppl 2), S7-S12.

Aguilar, A., (2019). Cambios en los estados de metilación y expresión del gen CHMP4Bp1 en un modelo de cáncer de páncreas, (tesis de pregrado), Instituto de Medicina Genómica, México.

Andersen, D. K., Korc, M., Petersen, G. M., Eibl, G., Li, D., Rickels, M. R., ... & Abbruzzese, J. L. (2017). Diabetes, pancreatogenic diabetes, and pancreatic cancer. *Diabetes*, 66(5), 1103-1110.
Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003; 4():237-56.

Ansari, D., Gustafsson, A., y Andersson, R. (2015). Actualización sobre el tratamiento del cáncer de páncreas: la cirugía no es suficiente. *Revista mundial de gastroenterología: WJG* , 21 (11), 3157.

Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., & Rupasinghe, H. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular cancer*, 17(1), 48. doi:10.1186/s12943-018-0804-2

Bracci, P. M. (2012). Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular carcinogenesis*, 51(1), 53-63.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*.

Buisson R, Boisvert JL, Benes CH and Zou L. (2015). Distinct but concerted roles of ATR DNA-PK, and Chk1 in countering replication stress during S phase. *Mol Cell.* 59:1011–1024.

Carlsson, J., & Yuhas, J. M. (1984). Liquid-overlay culture of cellular spheroids. In *Spheroids in cancer research* (pp. 1-23). Springer, Berlin, Heidelberg.

Chang, C. H., Zhang, M., Rajapakshe, K., Coarfa, C., Edwards, D., Huang, S., & Rosen, J. M. (2015). Mammary stem cells and tumor-initiating cells are more resistant to apoptosis and exhibit increased DNA repair activity in response to DNA damage. *Stem Cell Reports*, 5(3), 378-391.

Chapdelaine, J. M. (2001). MTT reduction-a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. Application Note 5, MAXline™.

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2004). *The cell: Molecular approach*. Medicinska naklada.

Curtin N., Pollard J. (2018) Targeting ATR for Cancer Therapy: Profile and Expectations for ATR Inhibitors. In: Pollard J., Curtin N. (eds) *Targeting the DNA Damage Response for Anti-Cancer Therapy*. Cancer Drug Discovery and Development. Humana Press, Cham

Dart DA, Adams KE, Akerman I, Lakin ND (2004) Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase. *J Biol Chem* 269:16433–16440

de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A. M., ... & Hoeijmakers, J. H. J. (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Current biology*, 10(8), 479-482.

de Sousa Cavalcante, L., & Monteiro, G. (2014). Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European journal of pharmacology*, 741, 8-16.

Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., & ... Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425-435.

Dhar, P., Kalghatgi, S., & Saraf, V. (2015). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis. *Indian journal of surgical oncology*, 6(1), 57-62.

Durkin AJ, Bloomston PM, Rosemurgy AS, Giarelli N, Cojita D, Yeatman TJ, Zervo. (2003). Defining the role of the epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer grown in vitro. *Am J Surg*

Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA (1988), *Oncogenes and tumor-suppressing genes*. *New Engl J Med* 318:618–622,

Foote KM, Blades K, Cronin A, Fillery S, Guichard SS, Hassall L, Hickson I, Jacq X, Jewsbury PJ, McGuire TM, et al: Discovery of 4-{4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1H-indole (AZ20): A potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity. *J Med Chem*. 56:2125–2138. 2013.

Giamas, G., Stebbing, J., Vorgias, C. E., & Knippschild, U. (2007). Protein kinases as targets for cancer treatment.

Giroux V, Iovanna J, Dagorn JC: Probing the human kinome for kinases involved in pancreatic cancer cell survival and gemcitabine resistance. *FASEB J* 2006

González-Santiago, O., Yeverino-Gutiérrez, M. L., del Rosario González-González, M., Corral-Symes, R., & Morales-San-Claudio, P. C. (2017). Mortality assessment of patients with pancreatic cancer in Mexico, 2000–2014. *ecancermedicalscience*, 11.

Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C., & Hoeflich, K. P. (2015). Targeting cancer with kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation*, 125(5), 1780-1789.

Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. S., Moskaluk, C. A., Da Costa, L. T., Rozenblum, E., ... & Kern, S. E. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21. 1. *Science*, 271(5247), 350-353.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Hansel, D. E., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2003). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annual review of genomics and human genetics*, 4(1), 237-256.

Heiler, S., Wang, Z., & Zöller, M. (2016). Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push. *World journal of gastroenterology*, 22(26), 5971–6007. doi:10.3748/wjg.v22.i26.5971

Herman, J. G., Wang, T. H., Baylin, S. B., ... Ahuja, N. (2013). Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(23), 6544-6555.

Huntoon, C. J., Flatten, K. S., Hendrickson, A. E. W., Huehls, A. M., Sutor, S. L., Kaufmann, S. H., & Karnitz, L. M. (2013). ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer research*, 73(12), 3683-3691.

Ho, W. Y., Yeap, S. K., Ho, C. L., Rahim, R. A., & Alitheen, N. B. (2012). Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PloS one*, 7(9).

Ihse, I., Permert, J., Andersson, R., Borgström, A., Dawiskiba, S., Enander, L. K., ... & Lindell, G. (2002). Guidelines for management of patients with pancreatic cancer. *Lakartidningen*, 99(15), 1676-80.

Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(44), 9694.

Itakura E, Umeda K, Sekoguchi E, Takata H, Ohsumi M, Matsuura A (2004) ATR-dependent phosphorylation of ATRIP in response to genotoxic stress. *Biochem Biophys Res Commun* 323(4):1197–1202

Jia, Y., & Xie, J. (2015). Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes & Diseases*, 2(4), 299-306.

Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Singh, S., & Singh, A. P. (2015). Insights into the Role of microRNAs in Pancreatic Cancer Pathogenesis: Potential for Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Advances in experimental medicine and biology*, 889, 71–87.

Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 388(10039), 73-85.

Kim, M. P., & Gallick, G. E. (2008). Gemcitabine resistance in pancreatic cancer: picking the key players. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*, 14(5), 1284-1285.

Kunz- Schughart, L. A. (1999). Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell biology international*, 23(3), 157-161.

Furukawa, T., Sunamura, M., & Horii, A. (2006). Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. *Cancer science*, 97(1), 1-7.

Lippert, T. H., Ruoff, H. J., & Volm, M. (2008). Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors. *Arzneimittelforschung*, 58(06), 261-264.

Maitra, A., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2006). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 20(2), 211-226.

Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T., & Taxman, D. J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 629, 141-58.

Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., ... & Ungefroren, H. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. *Virchows Archiv*, 439(6), 798-802.

Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics*, 163, 94–108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013

National Cancer Institute. Estimated new cancer cases and deaths for 2013. SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) cancer statistics review. Available from: <http://www.seer.cancer.gov>.

Pandol, S. J., Apte, M. V., Wilson, J. S., Gukovskaya, A. S., & Edderkaoui, M. (2012). The burning question: why is smoking a risk factor for pancreatic cancer?. *Pancreatology*, 12(4), 344-349.

Pandol, S., Gukovskaya, A., Edderkaoui, M., Dawson, D., Eibl, G., & Lugea, A. (2012). Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27 Suppl 2(0 2), 127-34.

Peasland, A., Wang, L. Z., Rowling, E., Kyle, S., Chen, T., Hopkins, A., ... & Curtin, N. J. (2011). Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *British journal of cancer*, 105(3), 372.

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb-prot5439.

Rizo, P., González, A., Sánchez, F., & Murguía, P. (2015). Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evidencia Médica e Investigación en salud*, 8(1), 5-15.

Ronco, C., Martin, A. R., Demange, L., & Benhida, R. (2017). ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *MedChemComm*, 8(2), 295-319.

Rustgi, A. K. (2014). Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes & development*, 28(1), 1-7.

Saad, A. M., Turk, T., Al-Husseini, M. J., & Abdel-Rahman, O. (2018). Trends in pancreatic adenocarcinoma incidence and mortality in the United States in the last four decades; a SEER-based study. *BMC cancer*, 18(1), 688. doi:10.1186/s12885-018-4610-4

Sultana, A., Smith, C. T., Cunningham, D., Starling, N., Tait, D., Neoptolemos, J. P., & Ghaneh, P. (2007). Systematic review, including meta-analyses, on the management of locally advanced pancreatic cancer using radiation/combined modality therapy. *British journal of cancer*, 96(8), 1183.

Sakorafas, G. H., Tsiotou, A. G., & Tsiotos, G. G. (2000). Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer treatment reviews*, 26(1), 29-52.

Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, Bekker-Jensen S, Mailand N, Bartek J, Lukas J (2013) ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 155(5):1088–1103

Wallez, Y., Dunlop, C. R., Johnson, T. I., Koh, S. B., Fornari, C., Yates, J., Bernaldo de Quirós Fernández, S., Lau, A., Richards, F. M., ... Jodrell, D. I. (2018). The ATR Inhibitor AZD6738 Synergizes with Gemcitabine In Vitro and In Vivo to Induce Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Regression. *Molecular cancer therapeutics*, 17(8), 1670-1682.

Weber, A. M., & Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 149, 124-138.

Wong MCS, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JJY. Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Sci Rep*. 2017;7:3165.

Yi, J. M., Guzzetta, A. A., Bailey, V. J., Downing, S. R., Van Neste, L., Chiappinelli, K. B., Keeley, B. P., Stark, A., Herrera, A., Wolfgang, C., Pappou, E. P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Goggins, M. G.,

Yu, X., Zhang, Y., Chen, C., Yao, Q., & Li, M. (2010). Targeted drug delivery in pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 97-104.

Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(24), 2897.

Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300(5625):1542–1548