



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Identificación de H2A.Z y modificaciones post-
traduccionales de histonas expresados diferencialmente
durante la progresión del cáncer de páncreas”**

TESIS

Que presenta

PEDRO ANTONIO ÁVILA LÓPEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de tesis:

DRA. ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS

Ciudad de México.

Agosto, 2016.

ASESORES

DR. MIGUEL ÁNGEL VARGAS MEJÍA

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS.

DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA CONACYT CON EL NÚMERO DE REGISTRO 631030.

Dedicatorias

A mis padres, Obed y Gabriel, por el apoyo y amor que me brindan

A mis hermanos, Gabriela y Francisco, por estar conmigo a pesar de todo

A mis sobrinos, Valentina y Eduardo, por ser la luz de mi vida

Agradezco a:

Dra. Rosaura Hernández Rivas
Dra. Abril Marcela Herrera Solorio
M. en C. Daniela Lozano Amado
M. en C. Gabriela Romero Meza
Carlos Alonso Castillo

Por su apoyo, paciencia y pertinentes observaciones durante el desarrollo del proyecto de investigación que sustenta esta tesis.

Índice

Resumen	vii
Abstract.....	ix
Introducción	1
Anatomía y fisiología del cáncer de páncreas.....	1
Cáncer de páncreas	2
Aspectos clínicos del cáncer de páncreas	3
Síntomas	3
Diagnóstico.....	3
Estadificación	4
Tratamiento	6
Cáncer de páncreas exocrino.....	7
Clasificación del cáncer de páncreas exocrino.....	10
Adenocarcinoma Ductal Pancreático	10
Lesiones precursoras del Adenocarcinoma Ductal Pancreático	11
Alteraciones moleculares involucradas en el Adenocarcinoma Ductal Pancreático	13
Oncogén K-RAS.....	14
Gen supresor de tumores CDKN2A/p16	16
Gen supresor de tumores p53.....	17
Gen supresor de tumores SMAD4/DPC4	17
Otros genes alterados	18
Acortamiento de los telómeros	19
Vías de señalización Hedgehog y Notch en el Adenocarcinoma Ductal Pancreático	19
Mecanismos epigenéticos involucrados en el Adenocarcinoma Ductal Pancreático	20
Metilación del DNA en Adenocarcinoma Ductal Pancreático	25
Modificaciones post-traduccionales de las histonas y complejos del grupo Polycomb en Adenocarcinoma Ductal Pancreático	26
MicroRNAs en Adenocarcinoma Ductal Pancreático.	29
Justificación	33

Hipótesis	34
Objetivos	35
Objetivo general.....	35
Objetivos particulares.....	35
Materiales y métodos.....	36
Líneas celulares.....	36
Subcultivo celular	36
Obtención de extractos proteicos totales.....	37
Obtención de histonas por el método de extracción ácido.....	38
Fraccionamiento núcleo/citoplasma	38
Determinación de modificaciones post-traduccionales de la histona H3.....	39
Western Blots	40
Análisis estadísticos	44
Resultados.....	45
Estadificación de las líneas celulares	45
Niveles elevados de H2A.Z en líneas celulares y biopsias de cáncer de páncreas.....	48
Alteración en las PTM del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4 en líneas celulares de cáncer de páncreas.....	50
Alteración en los niveles de enzimas modificadoras de la cromatina en PDAC	58
Discusión	62
Líneas celulares con diferente grado histológico y molecular.....	64
Niveles elevados de H2A.Z en PDAC.....	66
Alteración en las PTM del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4	70
Hiperacetilación de histonas en PDAC.....	70
Alteración global de la metilación de histonas en PDAC	77
Aspectos clínicos de las alteraciones epigenéticas en PDAC.	79
Conclusiones	81
Perspectivas	82
Bibliografía.....	83

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del páncreas.....	2
Figura 2. Lesiones precursoras del PDAC.....	13
Figura 3. Alteraciones moleculares durante el proceso carcinogénico multipasos del cáncer de páncreas	14
Figura 4. Mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la transcripción génica.....	23
Figura 5. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs.....	30
Figura 6. Organización de los pozos del EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric).....	40
Figura 7. Estadificación de las líneas celulares empleadas.....	47
Figura 8. Niveles elevados de H2A.Z en PDAC.	50
Figura 9. Alteración en los niveles de PTM de la histona H3 en PDAC.	55
Figura 10. Alteración en los niveles de PTM de la histona H4 en PDAC.	57
Figura 11. Alteración de los niveles de las enzimas modificadoras HDAC3 y SIRT1 en PDAC.	61

Índice de tablas

Tabla I. Agrupación del sistema TNM por etapas en cáncer de páncreas.....	5
Tabla II. Mutaciones en línea germinal asociadas al cáncer de páncreas	8
Tabla III. Anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios utilizados.....	43
Tabla IV. Características clínicas, histológicas y genéticas de las líneas celulares empleadas en este trabajo.	46
Tabla V. Participación de algunas PTM en la sobrevida de pacientes con PDAC.....	71

Abreviaturas

5-FU	5-fluorouracilo
5-mC	5-metilcitocina
acH2A.Z	H2A.Z acetilada
RB	Proteína de Retinoblastoma
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CSC	Cancer Stem Cells o Célula troncal cancerosa
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNMT	Metil-transferasa de DNA
DSB	Ruptura de doble cadena en DNA
EMT	Transición epitelio-mesenquima
ER α	Receptor de estrógeno alfa
GAP	Proteínas Activadoras de GTPasas
GEF	factor intercambiador de nucleótido de guanina
GEM	Gemcitabina
HAT	Acetil-transferasa de histonas
HDAC	Deacetilasa de histonas
HMT	Metil-transferasa de histonas
IL-6	Interleucina-6
IPMN	Neoplasia Intraductal Papilar Mucinoso
lncRNA	RNA largo no codificante
MCN	Neoplasia Quística Mucinoso
miRNA	MicroRNA
MSP	PCR metilación específica
MUC	Mucina
ncRNA	RNA no codificante
nt	Nucleótido
PanIN	Neoplasia Intraepitelial Pancreática
PDAC	Adenocarcinoma Ductal Pancreático

PRC1/2	Complejo Represor Polycomb 1/2
PRMT	Proteína metil-transferasa de arginina
PSA	Persulfato de amonio
PTM	Modificación post-traducciona
qPCR	PCR cuantitativa
RICS	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNApolIII	RNA polimerasa II
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero Fetal Bovino
shRNA	RNA small hairpin
siRNA	RNA pequeño de interferencia
sncRNA	RNA pequeño no codificante
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
WB	Western Blot

Resumen

El Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC) es uno de los cánceres más letales a nivel mundial. Este presenta un índice de fatalidad del 96%, es decir, casi el 100% de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad mueren en un periodo menor a un año. Por lo que la comprensión de los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo del PDAC nos permitirá entender las vías que se desregulan y proponer nuevas moléculas blanco en contra de esta enfermedad. Con el propósito de averiguar qué mecanismos epigenéticos se encuentran desregulados en el PDAC y cuáles de estos podrían ser específicos de los diferentes grados de tumor durante el desarrollo de este cáncer. Es que en el presente trabajo determinamos si existían alteraciones específicas graduales y progresivas en los niveles de expresión de la variante de histonas H2AZ y si ocurrían a nivel global alteraciones en la cantidad de modificaciones post-traduccionales (PTM) de las histonas H3 y H4 en el PDAC. Como modelo de PDAC utilizamos la línea celular hTERT-HPNE (como nuestro control normal) y 3 líneas celulares de cáncer de páncreas: Capan-1, BxPC-3 y PANC-1, las cuales tienen diferente grado de progresión tumoral. Mediante la técnica de WB y anticuerpos dirigidos contra proteínas de uniones estrechas y de mesénquima. Se corroboró el grado de progresión tumoral de estas líneas. Nuestros resultados indican que Capan-1 es la línea que presenta el nivel más bajo de tumor de páncreas, mientras que las líneas BxPC-3 y PANC-1 tienen un grado medio y alto del PDAC, respectivamente. Una vez estadificadas nuestras líneas, se determinó mediante ensayos de WB y usando histonas purificadas de cada línea celular, que la variante de histonas H2A.Z se expresa en niveles más altos en las tres líneas celulares de PDAC con respecto a hTERT-HPNE. Sin embargo, nuestros datos indican que el incremento en los niveles de expresión de H2AZ, no es proporcional al grado de malignidad del tumor.

Evaluación de 21 PTMs por microarreglos para la histona H3 revelaron que existe un aumento global en la cantidad de marcas asociadas tanto a represión

como activación transcripcional en la línea celular PANC-1 con respecto a hTERT-HPNE. Posteriormente mediante ensayos de WB se determinó que en las tres líneas de PDAC también existe un estado de hiperacetilación en ciertos residuos de la histona H3 (lisina 9, 14, 18,), así como en la histona H4 (lisinas (5, 8, 12 y 16) con respecto a hTERT-HPNE. Nosotros proponemos que esta hiperacetilación podría deberse en parte a que la desacetilasa de histona SIRT1 está presente solo en el citoplasma y ausente en el núcleo de nuestras tres líneas de PDAC. Finalmente, y de manera interesante identificamos que la monometilación de la arginina 3 de la histona H4, solamente está presente en las líneas celulares donde K-Ras esta mutado (Capan-1 y PANC-3) y está ausente en la línea normal hTERT-HPNE y BxPC3, la cual no tiene K-Ras. Por lo que estos resultados nos permiten proponer que las PTMs de las histonas, así como la variante de histona H2A.Z podrían ser dos mecanismos epigenéticos que pueden estar participando de manera importante en el desarrollo del PDAC y que probablemente la marca epigenética H4R3me1 es un marcador epigenético específico de PDAC en donde K-Ras esta mutado.

Abstract

The Pancreatic Adenocarcinoma Ductal (PDAC) is one of the most lethal cancers worldwide. This has a fatality rate of 96%, ie almost 100% of patients diagnosed with this disease die in a minor period to one year. So understanding the molecular level to epigenetic changes allow us to better understand the biology of PDAC and identify new diagnostic and therapeutic molecules. That is why the aim of this study was to determine whether there are alterations in epigenetic mechanisms such as histone variants and post-translational modifications (PTM) of histones H3 and H4 in PDAC. As a model of PDAC we used the cellular line hTERT-HPNE and three cellular lines of cancer of pancreas Capan-1, BxPC-3 and PANC-1, which have different tumour degree. We found that Capan-1, BxPC-3 and PANC-1, have a low, medium and high level of tumor respectively. In this work we determined that H2A.Z histone variant showed high level of expression in the 3 PDAC cell lines compared with hTERT. We found that some PTMs of histones H3 and H4, are enriched in three PDAC lines in comparison with hTERT. Specifically the lysine 9, 14 and 18 in the histone H3 are hyperacetylated and a similar situation was found for the histone H4, in the residue 5, 6, 12 y 16. We found that this hyperacetylated state is produced because the histone deacetylase Sirt1 is located only in the cytoplasm but not in the nucleus. Interestingly, we determined that mono-methylation of Arginine 3 in the histone H3 is an epigenetic mark exclusive the PDACin which the K-ras protein is mutated;

In conclusion allthese data support the idea that the histone variants H2AZ and PMTs in the histones H3 and H4 could be participated in the progression of PDAC.

Introducción

Anatomía y fisiología del cáncer de páncreas

El páncreas es una glándula mixta localizada detrás del estómago. Es un órgano alargado, constituido por una cabeza ancha, la cual conecta con el duodeno, un cuerpo que va de ancho a delgado y una cola puntiaguda. En el individuo adulto, este órgano llega a medir aproximadamente 6 pulgadas de largo por 2 pulgadas de ancho (Figura 1).

El páncreas se considera una glándula mixta ya que está constituida tanto por tejido exocrino como por tejido endocrino. En este órgano, el tejido exocrino ocupa más del 95% de la masa pancreática y está conformado por conjuntos de células secretoras en forma de sacos, conocidos como acinos pancreáticos, los cuales forman una red con los conductos pancreáticos (un segundo tipo de células). Mientras que, las células centroacinares (un tercer tipo de células), interconectan los acinos y los conductos pancreáticos (Figura 1). El producto secretado por los acinos pancreáticos es el jugo pancreático, el cual está compuesto por las enzimas pancreáticas, necesarias para la correcta digestión de los alimentos en el intestino delgado. En lo que respecta al tejido endocrino, este constituye del 1% al 2% del total de la masa pancreática. Esta porción está organizada en pequeños islotes de células secretoras conocidos como Islotes de Langerhans, los cuales secretan hormonas como la insulina, importante para la regulación del metabolismo de la glucosa (Sherwood L., 2011).

Debido a la importante función que desempeña este órgano, alteraciones en el mismo llegan a repercutir gravemente en la homeostasis del organismo y conducen al desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus, la pancreatitis y el cáncer de páncreas.

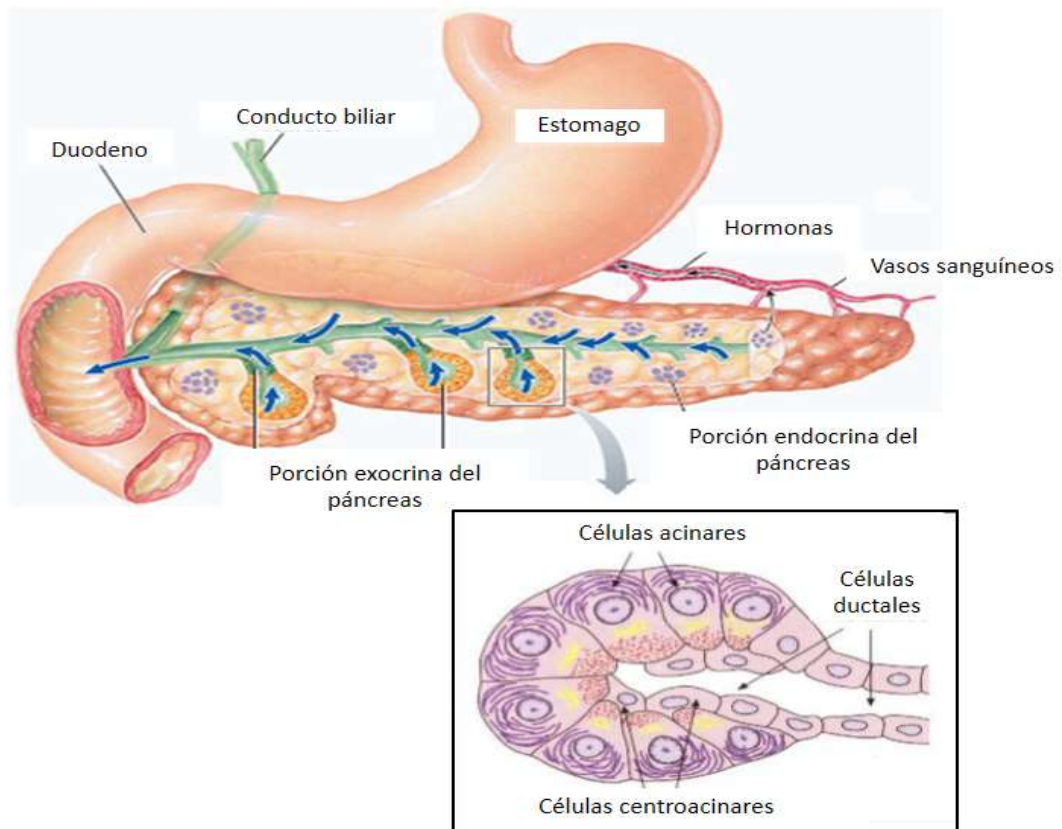


Figura 1. Anatomía del páncreas. En el esquema se muestra la organización del tejido exocrino y endocrino que constituyen al páncreas. Así como la conexión de las células acinares con los conductos pancreáticos (Tomado y modificado de Sherwood L., 2011).

Cáncer de páncreas

El cáncer constituye un importante grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular descontrolado y la capacidad de invadir tejidos diferentes a partir del cual se originó. La incidencia mundial del cáncer va en aumento, se estima que para el año 2020 la incidencia de esta enfermedad se incremente en un 50%, llegando a tener hasta 15 millones de nuevos casos en todo el mundo. Por su parte, el cáncer de páncreas se ubica en el 12vo lugar en incidencia a nivel mundial, ocupando el 7mo lugar en mortalidad. En México, estadísticas del 2010 reportan una incidencia del 3.2%, ubicándose

en el 9no lugar en mortalidad, con un índice de fatalidad del 96%, es decir, casi el 100% de los pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas mueren en el país (Aldaco F., 2012). El pronóstico de los pacientes con cáncer de páncreas no es muy bueno, tan solo el 26% de los pacientes diagnosticados con este cáncer (específicamente con adenocarcinoma ductal pancreático o PDAC) presentan una sobrevida de 1 año, mientras que el 5% de los pacientes llegan a tener una sobrevida de 5 años (Neureiter D., *et al.*, 2014).

Aspectos clínicos del cáncer de páncreas

Síntomas

Durante las primeras etapas del cáncer de páncreas, los pacientes cursan por un cuadro asintomático, y no es hasta que el tumor invade otros tejidos o realiza metástasis a otros órganos que se empiezan a observar síntomas de la enfermedad. Entre los síntomas típicos están: dolor abdominal, ictericia obstructiva y pérdida de peso. En ocasiones, la obstrucción del conducto pancreático puede dar lugar a cuadros de pancreatitis (American Cancer Society, 2015).

Diagnóstico

Lamentablemente la detección del PDAC en la mayoría de los casos ocurre en etapas avanzadas (80% de los casos), en las cuales el tumor primario ha realizado metástasis a otros órganos. Esto trae como consecuencia que la enfermedad sea en su mayor parte incurable. Por lo tanto, la detección precoz del PDAC resulta ser importante para una mayor probabilidad de curación (Hezel A., *et al.*, 2006).

Para realizar el diagnóstico, los médicos hacen uso de tres herramientas, que además de detectar la presencia del cáncer ayudan a la estadificación del tumor. Primeramente, los estudios de imagen son importantes para la detección de la masa tumoral. Actualmente, la tomografía computarizada es el mejor estudio disponible para el diagnóstico y la estadificación del PDAC. Este tiene la capacidad de detectar el cáncer en etapas localmente avanzadas, así

como detectar los lugares que presentan metástasis. La ecoendoscopia también puede servir para el diagnóstico del PDAC, la cual además de la gran precisión que ofrece, sirve para la toma de biopsias al momento del procedimiento. La resonancia magnética puede realizarse en aquellos casos donde el paciente presenta intolerancia al contraste intravenoso administrado en la tomografía computarizada. La tomografía por emisión de positrones puede confirmar los sitios específicos que presentan metástasis (Hezel A., *et al.* 2006; American Cancer Society, 2015).

Por otra parte, los estudios de laboratorio pueden detectar marcadores tumorales empleando muestras biológicas como sangre, jugo pancreático o biopsias. Los marcadores tumorales corresponden a moléculas liberadas por las células cancerosas o por células normales en respuesta a la presencia del cáncer. Para el cáncer pancreático, existen dos marcadores tumorales que pueden ser de utilidad, el CA 19-9 y el antígeno carcinoembrionario. El CA 19-9 es el marcador más utilizado, es secretado por las células cancerosas exocrinas del páncreas. Presenta una sensibilidad del 80%, sin embargo, puede disminuir hasta un 55% en aquellos tumores menores de 3 cm. Desafortunadamente, aunado a la baja sensibilidad de este marcador, en pacientes con lesiones precursoras del alto grado, la concentración del CA 19-9 en suero tiende a ser normal (Maitra A. and Hruban R. 2008). Por esta razón, resulta indispensable el estudio de nuevos marcadores tumorales que puedan mejorar el diagnóstico del cáncer de páncreas.

Finalmente, los estudios histológicos realizados a las biopsias del tejido afectado sirven para confirmar el hallazgo de los estudios de imagen, además de que sirven para descartar tumores benignos presentes en el páncreas.

Estadificación

A la par del diagnóstico, es necesario identificar la etapa en la cual se presenta la enfermedad. El estadio es un factor importante para poder considerar las opciones de tratamiento, además de predecir el pronóstico del paciente. Actualmente se cuenta con diferentes sistemas de estadificación del cáncer,

siendo el sistema TNM es el más utilizado. Este sistema toma en cuenta tres criterios importantes: el tamaño del tumor (T), la propagación a ganglios linfáticos adyacentes (N) y la presencia de metástasis (M). Dependiendo de lo avanzado que se encuentra el cáncer al momento del diagnóstico, se pueden asignar diferentes grados a estas categorías. Posterior a la asignación de las categorías TNM, se asigna una etapa general que va de la etapa I a la etapa IV, que es la que toma en cuenta el médico para considerar el posible tratamiento (Vincent A., *et al.* 2011; American Cancer Society, 2015). En la tabla I se muestran las características macroscópicas de cada etapa, así como el porcentaje de sobrevivida a 5 años para cada una de ellas.

Tabla I. Agrupación del sistema TNM por etapas en cáncer de páncreas (Tomado y modificado de American Cancer Society, 2015).

Etapa	Categoría TNM	Características	Sobrevida a 5 años
0	Tis (<i>in situ</i>), N0, M0	El tumor está confinado a las capas superiores de células del conducto pancreático y no ha invadido los tejidos más profundos. No se ha propagado fuera del páncreas.	
IA	T1, N0, M0	El tumor está confinado en el páncreas y mide menos de 2 cm. No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes ni a sitios distantes.	14%
IB	T2, N0, M0	El tumor está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm. No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes ni a sitios distantes.	12%
IIA	T3, N0, M0	El tumor presenta crecimiento fuera del páncreas, pero no hasta los vasos sanguíneos o nervios principales. No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes.	7%

(Continuación) Tabla I. Agrupación del sistema TNM por etapas en cáncer de páncreas (Tomado y modificado de American Cancer Society, 2015).

Etapa	Categoría TNM	Características	Sobrevivida a 5 años
IIB	T1-3, N1, M0	El tumor está confinado fuera del páncreas o fuera de él, pero no hacia los vasos sanguíneos o nervios principales. Se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes.	5%
III	T4, NX-1, M0	El tumor se presenta fuera del páncreas hacia los vasos sanguíneos o nervios principales adyacentes. Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes ni a sitios distales.	3%
IV	T1-4, NX-1, M1	El cáncer se ha propagado a sitios distantes. Tumores secundarios.	1%

Tratamiento

Una vez confirmado el diagnóstico del cáncer de páncreas, se puede optar por varios tratamientos disponibles dependiendo de la etapa en la que se encuentre el paciente. Los tratamientos convencionales disponibles actualmente son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (Vincent A., *et al.* 2011).

Por un lado, la cirugía en los pacientes con cáncer de páncreas puede ser potencialmente curativa, específicamente en aquellos individuos donde los resultados de los estudios sugieran que es posible extraer por completo el tumor. Por el contrario, si los resultados muestran que el tumor está demasiado extendido como para extraerlo completamente, se opta por una cirugía paliativa, con la cual se busca aliviar los síntomas y complicaciones que se puedan llegar a presentar. Por su parte, la radioterapia es utilizada en pacientes con etapas intermedias, donde el tumor se encuentra localmente

avanzado. El tipo de radioterapia más utilizada para el cáncer de páncreas es la radioterapia externa, la cual irradia el tumor desde fuera del cuerpo. Por último, la quimioterapia es el tratamiento más utilizado para tratar aquellos pacientes en los cuales el cáncer ha realizado metástasis (Vincent A., *et al.* 2011). El medicamento más utilizado para el cáncer de páncreas es el análogo de nucleósidos gemcitabina (GEM), el cual puede emplearse en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) o con capecitabina. Los efectos secundarios que ocasiona este tratamiento son muy agresivos, debido a la poca especificidad que presenta para las células cancerosas. Entre los efectos secundarios se encuentran: la caída de cabello, náuseas, vomito, úlceras bucales, una elevada susceptibilidad a infecciones, hemorragias, etc. (Vincent A., *et al.* 2011; American Cancer Society, 2015).

La realidad clínica es que la mayoría de los pacientes se diagnostican en etapas tardías, en las cuales hay presencia de metástasis, lo cual resulta en un mal pronóstico. Por lo tanto, resulta urgente el desarrollo de herramientas con una mayor especificidad y eficacia para el tratamiento del cáncer pancreático, sobre todo para etapas avanzadas, en las cuales es muy difícil eliminar en su totalidad las células cancerosas (Vincent A., *et al.* 2011; American Cancer Society, 2015). Por lo que un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el inicio y desarrollo de este cáncer podría proporcionarnos nuevas moléculas blanco que puedan ser empleadas para contrarrestar esta enfermedad.

Cáncer de páncreas exocrino

El cáncer de páncreas exocrino representa más del 95% de todos los cánceres pancreáticos. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer de páncreas exocrino, se encuentra el hábito de fumar, ya que el tabaco aumenta al doble la probabilidad de padecer la enfermedad, atribuyéndole uno de cada cuatro casos reportados. La historia familiar es otro factor de riesgo fuertemente asociado con el cáncer de páncreas, al cual se le atribuyen del 7% al 10% del total de casos reportados. Se sabe que individuos con familiares

de primer grado que presentan cáncer de páncreas tienen nueve veces más probabilidad de padecer la enfermedad, incluso antes de los 50 años. Otros factores de riesgo asociados con el cáncer de páncreas son: la edad (generalmente se presenta en individuos mayores de 70 años), el sexo (los hombres son 30% más propensos a padecer la enfermedad), la raza (más común en afroamericanos), la diabetes mellitus tipo 2, la pancreatitis crónica, la obesidad, la exposición a ciertos químicos (solventes de hidrocarburos clorados, níquel, etc.), y algunos hábitos alimenticios (dieta alta en carnes y grasas) (Vincent A., *et al.*, 2011; Maitra A. and Hruban R., 2008).

También se ha reportado alteraciones genéticas en línea germinal asociadas con el desarrollo del cáncer de páncreas en algunos genes supresores de tumores como BRCA2, CDKN2A/p16, así como en genes implicados en la reparación del DNA. En la tabla II se enlistan las mutaciones descritas, así como la enfermedad asociada a cada mutación (Vincent A., *et al.*, 2011; Maitra A. and Hruban R. 2008).

Tabla II. Mutaciones en línea germinal asociadas al cáncer de páncreas (tomado y modificado de Vincent A., *et al.*, 2011; Maitra A. and Hruban R. 2008).

Gen	Función	Enfermedad
BRCA2	Gen supresor de tumores implicado en reparación de daño cromosómico, principalmente en la reparación por recombinación homóloga.	Síndrome hereditario de cáncer de seno y ovario
CDKN2A/p16	Gen supresor de tumores implicado en regular la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (RB) por la inhibición de las cinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6.	Melanoma familiar

(Continuación) Tabla II. Mutaciones en línea germinal asociadas al cáncer de páncreas (tomado y modificado de Vincent A., et al., 2011; Maitra A. and Hruban R. 2008).

Gen	Función	Enfermedad
PRSS1	Gen codificante para la tripsina 1, importante en la digestión de los alimentos en el intestino delgado.	Pancreatitis familiar
MLH1/2	Gen involucrado en la reparación de errores durante la replicación del DNA.	Cáncer colorrectal hereditario sin poliposis
LKB1/STK11	La serina/treonina cinasa 11 es un gen supresor de tumores implicado en regular la polaridad celular.	Síndrome de Peutz-Jeghers
Otros: PALB2, VHL, MLH3, MSH6, TGBR2, PMS1/2.		

Sin embargo, también se han observado casos de cáncer de páncreas esporádicos donde no se detectan mutaciones en BRCA2 ni en CDKN2A/p16 en etapas tempranas, pero si en etapas intermedias o avanzadas. Sugiriendo que estas alteraciones en línea germinal tienen más impacto sobre la progresión de la enfermedad que sobre la propia iniciación del cáncer de páncreas (Hezel A., *et al.* 2006).

Por todo lo anterior, la importancia clínica de estas alteraciones presentes en línea germinal radica en la posibilidad de poder detectarlas en aquellos individuos portadores, lo cual ayudaría al diagnóstico oportuno de la enfermedad.

Clasificación del cáncer de páncreas exocrino

Basado en la malignidad del tumor, la Organización Mundial de la Salud ha clasificado al cáncer de páncreas exocrino en tres categorías:

- Benignos
 - Cistoadenoma Seroso
 - Cistoadenoma Mucinoso
- Limfótrofos (con potencial maligno incierto)
 - Neoplasia Quística Mucinoso (MCN)
 - Neoplasia Intraductal Papilar Mucinoso (IPMN)
- Malignos
 - Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC)
 - Cistoadenocarcinoma Seroso

De todos estos, el PDAC es el más común de los cánceres pancreáticos, por lo que a continuación se describirá con mayor detalle.

Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Este cáncer de páncreas exocrino representa del 90% al 95% del total de los cánceres pancreáticos. El PDAC se desarrolla a partir de cualquiera de las tres células del tejido exocrino (presentándose con mayor frecuencia en la cabeza del páncreas), teniendo como apariencia final un fenotipo de tipo ductal (Quilichini E, and Haumaitre C. 2015). El PDAC puede infiltrar tejidos adyacentes como son el bazo, la cavidad peritoneal y los ganglios linfáticos, también puede presentar metástasis en órganos como el hígado y pulmón. Inicialmente, el PDAC exhibe un patrón con estructuras tipo ductales y varios grados de atipia celular y de diferenciación. Histológicamente se distinguen algunas variantes del PDAC, las cuales presentan focos glandulares con diferenciación ductal (Neureiter D., *et al.*, 2014; Klöppel G. *et al.*, 1985).

Alteraciones histológicas en el PDAC y su importancia en la estadificación

El PDAC, al igual que todos los carcinomas presentan varios grados de alteraciones histológicas comparadas con el tejido normal del cual se derivó, esta propiedad es definida como grado del tumor (Devita V.T. *et al*, 2015), el cual puede repercutir en el pronóstico, así como en la respuesta a la terapia, es decir, pacientes con PDAC de grado bajo presentan un mejor pronóstico, así como una mejor respuesta a las terapias. Mientras que, pacientes con PDAC de alto grado tienen un mal pronóstico y en general son resistentes a las terapias convencionales. Además, los diferentes grados en PDAC también correlacionan con firmas de expresión génica específicas para diferentes subtipos de PDAC. Por ejemplo: el subtipo “clásico” se asocia con tumores de bajo grado y se caracteriza por la expresión de genes epiteliales y de adhesión. Por su parte, el subtipo “quasi-mesenquimal” está asociado con tumores de grado alto los cuales muestran una mayor expresión de genes mesénquimales (Collisson E.A., *et al*, 2011). Dentro de esta clasificación también se incluyen a las líneas celulares de PDAC, del subtipo “clásico” y del subtipo “quasi-mesenquimal” (Collisson E.A., *et al*, 2011).

Lesiones precursoras del Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Mediante estudios clínicos e histológicos se han detectado tres lesiones precursoras del PDAC. La PanIN (Neoplasia Intraepitelial Pancreatica), la Neoplasia Quística Mucinoso (MCN), y la Neoplasia Intraductal Papilar Mucinoso (IPMN), de las cuales, la PanIN es la más común (Hezel A., *et al*. 2006), ya que esta se encuentra presente en un 82% de los canceres que derivan en PDAC.

La PanIN presenta un espectro de divergencia morfológica en las células ductales, lo cual, dependiendo del grado de atipia celular, permiten clasificar a las PanINs en tres grados diferentes (PanIN I, PanIN II y PanIN III). El PanIN I se caracteriza por una apariencia de epitelio columnar mucinoso, mientras que

en PanIN II y PanIN III se presenta un incremento en la desorganización de la arquitectura celular, así como una atipia nuclear elevada (Figura 2). Todas las lesiones PanINs se caracterizan por tener un tamaño menor a un centímetro por lo que su detección por análisis de imagenología resulta poco probable.

Otras lesiones precursoras menos frecuentes que pueden dar origen al PDAC son la MCN y la IPMN, las cuales se presentan en menor frecuencia que la PanIN (20% y 3-5% respectivamente). Por un lado, la MCN presenta lesiones caracterizadas por un epitelio quístico productor de mucina, y a diferencia de las otras lesiones, está presenta un estroma tipo ovárico (Figura 2). Presenta un grado variable de displasia epitelial con focos de invasión, sin llegar a invadir los conductos pancreáticos (Maitra A. and Hruban R., 2008). Por su parte, la IPMN presenta grandes semejanzas con la PanIN a nivel celular ya que se puede presentar en el conducto pancreático principal o en sus ramificaciones principales (Figura 2). Esta lesión presenta de igual manera un grado variable de displasia celular (Maitra A. and Hruban R., 2008). La MCN y la IPMN, al presentar un crecimiento tumoral mayor que el presente en PanIN, pueden ser detectadas más fácilmente por estudios de imagen como la tomografía computarizada o resonancia magnética, y una vez detectadas pueden ser tratadas quirúrgicamente evitando de esta manera el desarrollo del cáncer.



Figura 2. Lesiones precursoras del PDAC. Se observa la histología de las lesiones precursoras, así como el tamaño promedio que presentan (Tomado y modificado de Hezel A., et al. 2006).

De todas estas lesiones se ha demostrado que las PanIN III progresan a PDAC con presencia de focos de invasión más allá de la membrana basal. Además de que estudios de los perfiles moleculares de las PanINs y la PDAC han reforzado el modelo de progresión PanIN-PDAC (Hruban R.H. *et al.*, 2009). En donde mutaciones en genes supresores de tumor, oncogenes, ciclinas y vías como Hedgehog y Notch parecen participar de manera activa e importante en el desarrollo del PDAC.

Alteraciones moleculares involucradas en el Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Análisis moleculares realizados en células de PDAC han proporcionado conocimiento sobre las alteraciones moleculares presentes en las células cancerosas, principalmente en genes supresores de tumores, oncogenes, y

genes involucrados en la reparación de daños en el DNA, los cuales describen un proceso carcinogénico multipasos (Figura 3). Muchas de estas alteraciones tienen una fuerte asociación con la iniciación y progresión de la enfermedad (Hruban R.H. *et al.*, 2000).

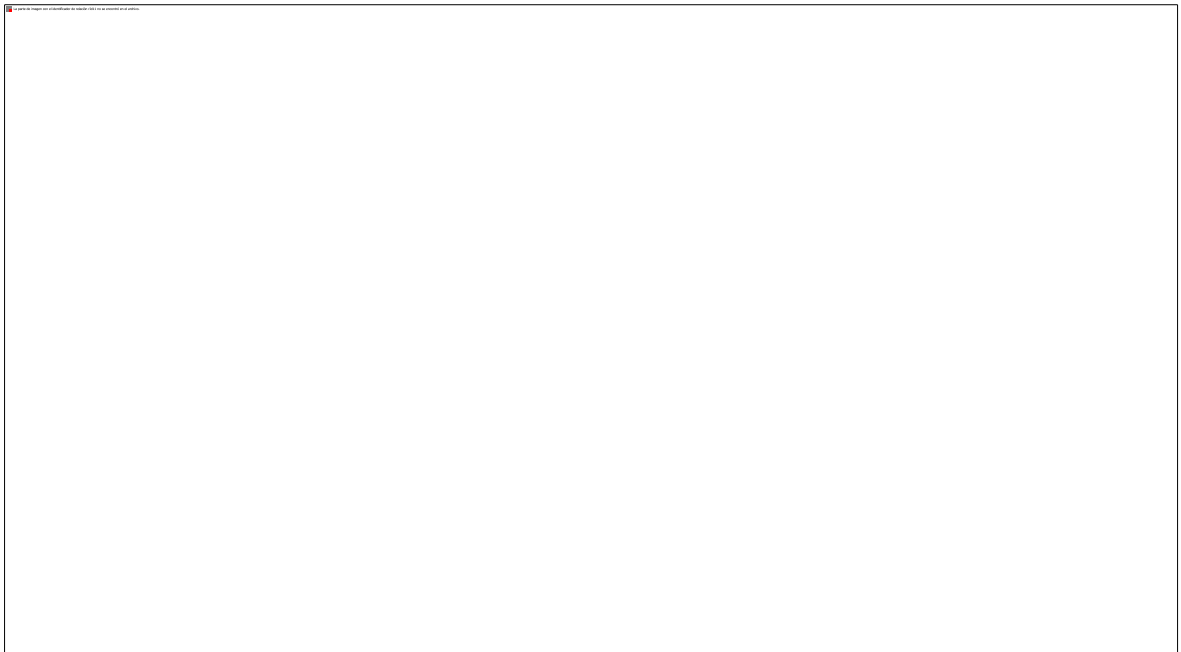


Figura 3. Alteraciones moleculares durante el proceso carcinogénico multipasos del cáncer de páncreas (Tomada y modificada de Vincent A., *et al.*, 2011).

A continuación, se describirá la función de los genes más fuertemente relacionados con el PDAC, así como la alteración que presentan, y su posible participación en la iniciación y progresión del cáncer de páncreas.

Oncogén K-RAS

El gen K-RAS codifica para la GTPasa del mismo nombre, la cual regula una gran variedad de funciones celulares importantes para la señalización, como son la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular.

En PDAC, la mutación de K-RAS se encuentra en más del 95% de los casos. Las mutaciones en K-RAS corresponden a mutaciones puntuales en el codón

12 (98% de los casos), donde se da el cambio de una glicina (G) por un ácido aspártico (D) (K-RAS^{G12D}), el otro 2% de las mutaciones en K-RAS ocurren en los codones 13 y 61 (Eser S., *et al.*, 2014). Estas mutaciones dirigen una activación constitutiva independiente de factores de crecimiento, además de que se logra bloquear la interacción entre la GTPasa y las GAPs (Proteínas Activadoras de GTPasas), manteniendo de esta manera la activación constitutiva de las vías efectoras moduladas por K-RAS. Estas mutaciones ocurren de manera esporádica en el páncreas y se detectan en aproximadamente el 30% de las neoplasias tempranas con un aumento de casi el 100% en el PDAC avanzado (Hezel A., *et al.*, 2006).

Las vías efectoras reguladas por K-RAS que juegan un papel importante en la iniciación, progresión y mantenimiento del PDAC son la vía RAF/ERK, la vía PI3K/AKT y la vía RalGDS/p38MAPK. Por un lado, la activación constitutiva de la vía de RAF/ERK conlleva a un fenotipo proliferativo, resultado de la interacción de la serina-treonina cinasa RAF con K-RAS, lo cual inicia una cascada de señalización que culmina con la activación de MARK y el aumento de la proliferación celular. Un punto a destacar de esta vía, es que en PDAC se ha reportado una mutación activadora en RAF, lo cual favorece aún más el proceso proliferativo (Sato N. and Goggins M. 2006; Campbell S., *et al.* 1998). La vía PI3K/AKT se encarga de regular el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la migración mediante la activación de efectores como PDK1, AKT y RAC (Cantley L. 2002). En PDAC, se ha reportado que la vía PI3K/AKT juega un papel importante en el proceso tumorigénico, así como en la progresión de la enfermedad (Eser S., *et al.* 2014). El regulador negativo de esta vía, PTEN, se ha encontrado silenciado en PDAC por hipermetilación de su promotor. Este evento favorece la activación sostenida de la vía, sin ningún efecto inhibitorio sobre la señalización. Así mismo, la proteína efectora AKT2 se encuentra aumentada del 10% al 20% en PDAC (Hezel A., *et al.*, 2006). Finalmente, la vía RalGDS/p38MAPK también tiene especial importancia en PDAC. Esta proteína GEF (factor intercambiador de nucleótido de guanina), activa GTPasas pequeñas de la familia RAS, como son RAL-A y RAL-B, las

cuales, en PDAC se han encontrado asociadas con favorecer el crecimiento tumoral y la presencia de metástasis (Campbell S., *et al.* 1998).

Experimentalmente se ha confirmado el papel carcinogénico de la mutación K-RAS^{G12D} empleando ratones modificados. Los ratones que expresan la mutación activadora de K-RAS desarrollan lesiones precursoras similares a las PanINs, las cuales llegan a progresar a un PDAC. Sin embargo, la inactivación de genes supresores de tumores como CDKN2A/p16, p53 y SMAD4/DPC4 aceleran la progresión a PDAC, sugiriendo que la mutación activadora en K-RAS es necesaria para la iniciación, progresión y mantenimiento del PDAC, pero además se requiere de la inactivación de ciertos genes supresores de tumores para una progresión más rápida de la enfermedad, durante la cual se van acumulando alteraciones moleculares favoreciendo de esta manera, el proceso carcinogénico (Eser S., *et al.* 2014).

Gen supresor de tumores CDKN2A/p16

CDKN2A/p16 es el gen supresor de tumores más frecuentemente inactivado en PDAC. El gen CDKN2A codifica para dos proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, p16^{INK4} y p19^{ARF}. P16^{INK4} pertenece a la familia de los inhibidores de las CDKs. La función de p16^{INK4} es prevenir la fosforilación activadora de la proteína de RB por inhibición de los complejos CDK4/CycD y CDK6/CycD, para impedir la entrada a la fase S del ciclo celular. Por otra parte, p19^{ARF} estabiliza a p53 al impedir su degradación vía MDM2 (William D., 1997).

La inactivación de CDKN2A/p16 en PDAC puede ocurrir por varios procesos como son: delección homocigota (en el 40% de los casos), mutación intergénica (40% de los casos), y por hipermetilación del promotor (en 15% de los casos) (Hansel D., *et al.*, 2003). Por lo tanto, la inactivación de CDKN2A/p16 resulta en la inapropiada fosforilación de RB, facilitando así la progresión del ciclo celular a través de la transición G1/S. La pérdida de CDKN2A/p16 generalmente ocurre en etapas intermedias, subsecuentes a la adquisición de la mutación K-RAS^{G12D}. Estas mutaciones son consideradas indispensables para el desarrollo del PDAC. En estudios con ratones modificados conteniendo

tanto la mutación K-RAS^{G12D} como la inactivación de CDKN2A/p16 se observa un mayor desarrollo de las lesiones pancreáticas comparadas con aquellas donde solo se altera un gen (Maitra A. and Hruban R., 2008), sugiriendo el sinergismo de ambas mutaciones en el desarrollo del cáncer de páncreas.

Gen supresor de tumores p53

p53 es un factor de transcripción que en condiciones normales se encuentra unido a la proteína MDM2, la cual se encarga de dirigir su degradación vía proteosoma. Cuando se genera daño al DNA se activan las proteínas cinasas ATM y CHK2, la cuales fosforilan a p53 desestabilizando su unión con MDM2 dejando a p53 activa, cuya función principal es arrestar el ciclo celular en G1/G2 permitiendo la reparación del daño al DNA o en su defecto, induciendo a muerte celular (Philomena G., 2011).

Las mutaciones de p53 en PDAC ocurren predominantemente a través de mutaciones intragénicas (Hansel D., *et al.*, 2003). En el PDAC la mutación ocurre generalmente en el dominio de unión a DNA. Esta mutación permite la progresión del ciclo celular aun en presencia de daño al DNA, permitiendo además la acumulación de más alteraciones genéticas. La inactivación de p53 ocurre en lesiones precursoras avanzadas (PanIN III), en las cuales hay presencia significativa de displasia celular. Por lo tanto, la pérdida de la función de p53 podría permitir el crecimiento y la supervivencia de las células con alteraciones carcinogénicas (Hezel A., *et al.*, 2006).

Gen supresor de tumores SMAD4/DPC4

SMAD4/DPC4 tiene un papel crítico en la vía de TGF- β . Esta vía es activada por la unión del TGF- β a su receptor en la superficie celular. Este reconocimiento induce una cascada de señalización que resulta en el reclutamiento de SMAD2/3 al receptor TGFBR1. El receptor TGFBR1 fosforila a SMAD2/3, los cuales posteriormente forman un complejo con SMAD4 para poder translocarse al núcleo, donde se unen a distintas regiones promotoras de genes involucrados en la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la

neogénesis de matriz extracelular y en inmunosupresión, además de que se favorece el arresto del ciclo celular en la fase G1 (Yang G. and Yang X., 2010). Este gen se encuentra inactivado en el 55% de los casos de PDAC, principalmente por delección homocigota (en 30% de los casos) o por mutación intragénica (25% de los casos) (Hansel D., *et al.*, 2003). Por lo tanto, la pérdida de SMAD4/DPC4 en PDAC facilita el crecimiento constitutivo de las células cancerosas, además de que la elevada señalización de TGF- β contribuye a la progresión de la enfermedad. En PanIN III se detecta inactivación de SMAD4/DPC4, mientras que en IPMN y MCN la expresión de SMAD4/DPC4 se mantiene intacta (Hansel D., *et al.*, 2003). Por otro lado, diferentes estudios han reportado la sobreexpresión de isoformas de TGF- β y TGFBR1/2 en PDAC, lo cual podría contribuir a la progresión del cáncer pancreático (Yang G. and Yang X., 2010).

Otros genes alterados

Otros genes supresores de tumores son inactivados en proporciones menores (5% al 10%) en PDAC. Algunos de estos genes incluyen a LKB1/STK11, BRCA2, TGFBR1/2, ACVR1B y MKK4 (Hezel A., *et al.*, 2006).

Además de los oncogenes y genes supresores de tumores, varios genes de mantenimiento del genoma también se encuentran alterados. Estos genes juegan un papel importante en impedir la acumulación de daño al DNA, manteniendo así la integridad del genoma. La alteración de estos genes se observa más frecuentemente en mutaciones de línea germinal (Tabla I). Sin embargo, existen casos esporádicos con alteraciones en genes como MLH1/2 y BRCA2 (Vincent A., *et al.*, 2011). Específicamente, el gen BRCA2 se encuentra alterado en lesiones avanzadas (PanIN III), por lo que se sugiere que BRCA2 promueve la progresión de tumores pancreáticos. BRCA2 regula el mantenimiento del genoma por recombinación homóloga en casos de daño al DNA. Por lo tanto, la pérdida de BRCA2 trae como consecuencia la acumulación de aberraciones cromosómicas con alto potencial carcinogénico (Hezel A., *et al.*, 2006).

Acortamiento de los telómeros

Uno de los eventos que acompañan la mutación K-RAS^{G12D} durante las primeras etapas de la carcinogénesis pancreática, específicamente en PanIN I, es el acortamiento de los telómeros (Maitra A. and Hruban R., 2008).

Los telómeros están constituidos por secuencias repetidas del tipo TTAGGG a los cuales se le unen varias proteínas denominadas shelterinas, las cuales confieren estabilidad a los cromosomas impidiendo por un lado la fusión de sus extremos con los de otros cromosomas, y por otro lado impidiendo la degradación por exonucleasas. Es por esto, que el acortamiento de estos repetidos teloméricos conlleva a fusiones entre brazos de los cromosomas, formando estructuras inestables durante la mitosis, denominadas puentes anafásicos, los cuales ocasionan rearrreglos cromosomales anormales (Tjarda van Heek N., *et al.*, 2002).

Vías de señalización Hedgehog y Notch en el Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Otras alteraciones importantes ocurren en la vía de Hedgehog y de Notch durante el proceso de carcinogénesis pancreática. La vía de señalización Hedgehog es una vía conservada evolutivamente, la cual está implicada en el desarrollo embrionario, y en la vida adulta, es una vía crítica para la renovación, regeneración y mantenimiento de diversos tejidos. En PDAC, la activación de la vía Hedgehog ha sido implicada en la iniciación, así como en el mantenimiento de las etapas avanzadas (Hezel A., *et al.*, 2006). Se ha reportado la expresión del ligando Shh en el 70% de PDAC, de igual manera, el ligando Ihh se ve aumentada 35 veces más en PDAC comparado con tejido pancreático normal (Wong H. and Lemoine N., 2009).

Por otro lado, la vía de Notch, otra vía conservada evolutivamente, regula procesos como la decisión del destino celular y la proliferación durante el desarrollo embrionario. En el páncreas normal los niveles de Notch y sus ligandos se encuentran en niveles indetectables, sin embargo, en lesiones PanIN y en PDAC estas moléculas se encuentran elevadas, induciendo la

expresión de los genes diana, principalmente HES-1, el cual está asociado con mal pronóstico en PDAC, facilitando muy posiblemente un fenotipo indiferenciado (Hu H. *et al.*, 2013). Por otro lado, el receptor Notch-3 se encuentra sobreexpresado en el 70% de los PDAC, sugiriendo una participación importante de esta vía durante la progresión del PDAC, específicamente en la generación de metástasis a ganglios linfáticos por mecanismos aún desconocidos (Maitra A. and Hruban R., 2008).

Mecanismos epigenéticos involucrados en el Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Muchos investigadores continúan viendo al cáncer pancreático exclusivamente como una enfermedad de células exocrinas epiteliales, las cuales se transforman por la acumulación de alteraciones genéticas. Sin embargo, con el advenimiento de la epigenética se ha podido demostrar que las alteraciones genéticas se comunican con cambios epigenéticos que dan origen no solo a la transformación neoplásica, sino que también determina muchas de las características del fenotipo del cáncer y sus síntomas, y que ambas contribuyen al desarrollo y progresión de esta enfermedad. Afortunadamente, con el conocimiento de la epigenética, se ha logrado una mayor comprensión de los mecanismos que favorecen la progresión del PDAC, y se han logrado proponer nuevas herramientas para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

Metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de las histonas, variantes de histonas, complejos remodeladores dependientes de ATP, RNAs no codificantes, proteólisis del extremo amino de la histona H3 y arquitectura nuclear son los siete mecanismos epigenéticos actualmente descritos (Figura 4).

De manera general, la metilación del DNA ocurre en residuos de citosinas adyacentes a guaninas, principalmente en regiones ricas en estos dinucleótidos llamadas islas CpG. Aproximadamente el 60% de todos los genes presentan regiones ricas en islas CpG, principalmente en la región

promotora, por lo que son susceptibles a metilación, impidiendo de esta manera la transcripción del gen en cuestión. Las DNA metil-transferasas (DNMTs), son las encargadas de metilar el carbono de la posición 5 de las citosinas. Existen tres DNMTs diferentes en las células de mamíferos: la DNMT1, encargada de mantener el patrón de metilación durante el proceso de replicación del DNA, y las DNMT3a y DNMT3b, encargadas de la metilación *de novo*.

Las histonas, proteínas encargadas de compactar el DNA dentro del núcleo, sufren modificaciones post-traduccionales (PTM), en sus extremos amino y carboxilo terminal. Estas modificaciones pueden ser metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, fosforilaciones, SUMOilaciones, ADP-ribosilaciones o citrulinaciones, además pueden presentarse en diferentes grados (mono, di o tri), las cuales pueden regular el nivel de compactación de la cromatina, permitiendo o impidiendo la accesibilidad de los complejos transcripcionales. La metilación y la acetilación son las PTMs mejor estudiadas. Por un lado, la acetilación facilita la transcripción al relajar el estado de compactación de la cromatina. Las acetil-transferasas de histonas (HATs) son las enzimas encargadas de transferir el grupo acetilo al grupo amino de las lisinas presentes en las histonas. La remoción del grupo acetilo es llevado a cabo por las deacetilasas de histonas (HDACs), las cuales suprimen la relajación de la cromatina ejercida por la acetilación, permitiendo así el silenciamiento génico. Por otro lado, la metilación de las histonas puede ocurrir en residuos de lisina o arginina de los extremos de las histonas. Las enzimas encargadas de la metilación son las histonas metil-transferasas (HMT), cada una de las cuales es específica para cada residuo de aminoácido. La metilación de las histonas puede asociarse tanto a activación como a represión transcripcional, dependiendo de la marca que se genere, por ejemplo, la di o trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4Me2/3) y la trimetilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79Me3) se asocian con activación transcripcional, mientras que la di y trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9Me2/3), la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3

(H3K27Me_{2/3}) y la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20Me₃) se asocian con represión transcripcional. Las proteínas de la familia Polycomb y Trithorax son complejos proteicos asociados al silenciamiento y activación génica debido a la generación de la H3K27me₃ y la H3K4me₃ respectivamente. Estos complejos tienen una función importante en la regulación de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo embrionario. Dentro del grupo Polycomb, existen dos complejos represores denominados PRC1 y PRC2. El complejo PRC1 está constituido por CBX2/4/8, PHC1/2/3, BIM1 y RING1A/1B o RNF2, y es el encargado de mantener el silenciamiento mediante la marca H3K27me₃. Por su parte, el PRC2, está compuesto por EZH2, SUZ12 y EED, y su función es generar la marca H3K27me₃ *de novo* (Neureiter D., *et al.*, 2014).

Además de las histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4), existen variantes de histonas asociadas con determinados patrones de expresión, las cuales pueden formar parte de nucleosoma permitiendo una expresión génica determinada. Estas combinaciones específicas de las histonas y variantes de histonas han llevado a establecer el llamado “código de histonas”. La variante H2A.X ha sido asociada a regiones del DNA que han sufrido rupturas de doble cadena (DSB), donde la fosforilación en la serina 139 (γ H2A.X) permite el reclutamiento de la maquinaria de reparación. Por su parte, la variante H2A.Z ha sido asociada a regulación transcripcional, memoria epigenética, estabilidad cromosomal, etc.

Otros complejos multiproteicos que participan en el remodelamiento de la cromatina son complejos remodeladores dependientes de ATP. Estos complejos tienen una subunidad de ATPasa, necesaria para que puedan llevar a cabo el desplazamiento, expulsión o reestructuración de los nucleosomas, facilitando de esta manera el proceso de transcripción.

La arquitectura nuclear implica toda la organización espacial que tienen el genoma y los organelos subnucleares dentro del núcleo. Esta organización espacial y temporal comprende una gran complejidad y una gran dinámica. Se

sabe que el genoma adopta una distribución topológica bien definida dentro del núcleo, donde los cromosomas ocupan territorios específicos bien establecidos, conocidos como territorios cromosomales. Esta organización es específica de cada tejido y linaje celular. Otra de las características de la arquitectura del núcleo es su amplio rango de estructuras u organelos subnucleares, como son el nucléolo, los cuerpos de Cajal, los cuerpos PML y los speckles, cuyas funciones son importantes para la regulación de la expresión génica, así como para la homeostasis celular. Por todo esto, la dinámica y organización nuclear corresponde un pilar importante para el entendimiento de la regulación de la expresión génica (Rincón-Arano H. and Recillas-Targa F., 2008).

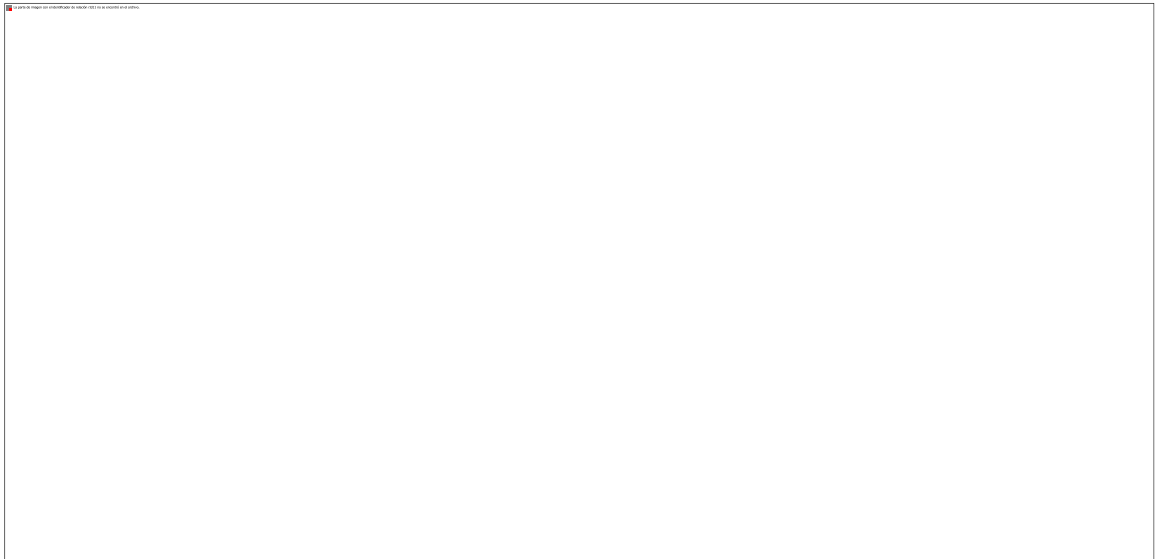


Figura 4. Mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la transcripción génica (Tomado de Kampen J., *et al.*, 2014).

Otro mecanismo epigenético que ha sido muy estudiado en los últimos años corresponde a los RNAs no codificantes (ncRNAs). Se sabe que cerca del 70% del genoma es transcrito, sin embargo, solo el 1.5% de estos transcritos codifican para proteínas, sugiriendo que el resto de los RNAs puede tener funciones regulatorias. De acuerdo al tamaño que presentan los transcritos no

codificantes estos se pueden clasificar en ncRNAs largos (lncRNAs), mayores a 200 nucleótidos (nt) y ncRNAs pequeños (sncRNAs), menores a 200 nt. Específicamente los microRNAs (miRNAs), son secuencias de 18 a 24 nt que alteran la estabilidad del mRNA, a pesar de no ser considerados como un verdadero mecanismo epigenético, estos pueden interactuar con reguladores epigenéticos como DNMTs, EZH2 y HDACs. Por su parte, los lncRNAs pueden unir a factores de transcripción y reclutar complejos remodeladores de la cromatina alterando de esta forma la expresión de genes (Holoach D. and Moazed D. 2015).

El último y más reciente mecanismo epigenético corresponde a la proteólisis del extremo amino de la histona H3. Este procesamiento es llevado a cabo por enzimas proteolíticas que procesan el extremo amino terminal de la histona H3 y ha sido asociado con el control de la expresión de genes implicados en el desarrollo y en la morfología celular. En ratón, la catepsina L ha sido identificada como la responsable de realizar el corte proteolítico entre los aminoácidos 21 y 22 lo que lleva a la subsecuente diferenciación de las células troncales embrionarias del ratón (Santos-Rosa H., *et al.*, 2009).

En cáncer, los mecanismos que más han sido estudiados son la metilación del DNA y la alteración en la expresión de ciertos miRNAs. En el caso del PDAC, se ha reportado alteraciones en estos procesos que afectan principalmente la expresión de genes supresores de tumores y oncogenes. En lo que respecta a las PTM de las histonas, este ha sido un mecanismo poco estudiado en PDAC. Sin embargo, el papel que tiene el complejo represor PRC2 sobre las *Cancer Stem Cells* (CSCs) pancreáticas ha sido bien establecido. Por otro lado, se ha observado silenciamiento epigenético por hipermetilación del promotor en los genes supresores de tumores: CDKN2A/p16, E-cadherina, ácido retinoico, SOCS-1, TSLC-1, Reprimo, RELN, etc. (Maitra A. and Hruban R., 2008). Además, se han reportado alteraciones epigenéticas en etapas muy tempranas del proceso carcinogénico, específicamente en las lesiones

precursoras, lo cual sugiere fuertemente que las alteraciones epigenéticas son un evento temprano en la iniciación y progresión del PDAC.

Metilación del DNA en Adenocarcinoma Ductal Pancreático

De todos los mecanismos previamente descritos, la metilación del DNA en PDAC ha sido la más estudiada. La metilación aberrante del DNA ha sido reportada tanto en PDAC como en lesiones precursoras. Estas observaciones sugieren fuertemente que alteraciones en el proceso de metilación del DNA juegan un papel importante en la iniciación y progresión del PDAC. Las alteraciones en el proceso de metilación del DNA se pueden dividir en, aquellas donde existe una metilación excesiva de las islas CpG presentes en las regiones promotoras (hipermetilación) y otras en donde la metilación de las regiones promotoras es deficiente (hipometilación). Por un lado, la hipermetilación se ha asociado con silenciamiento génico, principalmente en genes supresores de tumores. Mientras que la hipometilación, se asocia con una sobreexpresión génica, afectando en su mayor parte a oncogenes.

Un análisis de metilación global del genoma demostró que aproximadamente en el 60% de los casos de PDAC existe silenciamiento génico resultado de la hipermetilación en diferentes genes. Además, se ha considerado a la metilación aberrante como un evento temprano en el proceso carcinogénico, principalmente en lesiones precursoras del PDAC. Por ejemplo, el gen supresor CDKN2A/p16 es inactivado por hipermetilación de su promotor en el 15% de los casos de PDAC, lo cual favorece la progresión de la enfermedad (Norihiso Sato, 2006). Por otro lado, el gen FOXA1/2, asociado con la inhibición de la transición epitelio-mesénquima (EMT) al regular positivamente la transcripción de E-cadherina, se encuentra silenciado en PDAC por hipermetilación del promotor, lo cual favorece el fenotipo invasivo de la enfermedad (Neureiter D., *et al.*, 2014). También se ha detectado alteración de la metilación del DNA en lesiones precursoras. Por ejemplo, en IPMN se ha identificado hipermetilación en el promotor de CDKN1C/p57KIP2, cuya función es regular negativamente la proliferación celular (Omura N. and Goggings M.,

2009). Además, la hipermetilación de PENK, un opioide endógeno, ha sido detectada en PanINs e IPMN, donde también se asocia con el silenciamiento de CDKN2A/p16 (Neureiter D., *et al.*, 2014). En PanIN I se ha asociado la sobreexpresión de DNMT1 con el estado global de hipermetilación. Por lo que entonces todos estos resultados resaltan el importante papel que tiene la hipermetilación en la progresión de las lesiones precursoras.

Ejemplos de hipometilación han sido reportados en los promotores de varios oncogenes en PDAC. Una de las causas de la hipometilación en PDAC es la deficiencia de folatos o vitamina B12, la cual causa deficiencia de grupos metilo, llevando a la reducción global de la metilación del DNA. Por ejemplo, en la región promotora de la mucina 4 (MUC4) en lesiones precursoras (Neureiter D., *et al.*, 2014). También se ha detectado la sobreexpresión de S100A4 debido a la hipometilación específica de las islas CpG presentes en el primer intrón. De igual manera, se ha detectado hipometilación en los promotores de claudina 4, lipocaina 2, 14-3-3 sigma, mesotelina, PSCA y maspina (Sato N. and Goggins M., 2006). Tomando todas estas evidencias, se refuerza el papel importante que tiene la metilación del DNA (hipometilación e hipermetilación), sobre el desarrollo del cáncer pancreático.

Modificaciones post-traduccionales de las histonas y complejos del grupo Polycomb en Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Poco se conoce sobre el papel que tienen las PTM de las histonas en el proceso carcinogénico del PDAC. Actualmente, la acetilación y metilación de las histonas representan los únicos mecanismos basados en PTM de las histonas descritos, que se sabe, tienen efectos sobre el proceso carcinogénico del páncreas.

Alteraciones en las PTM de las histonas de los genes que codifican para las mucinas han sido reportadas. Las mucinas son glicoproteínas que tienen un papel importante sobre el proceso carcinogénico del páncreas, asociadas con su fenotipo secretor. PTM tales como la H3K9Me2/3 en el extremo amino de las histonas presentes en el sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen

MUC1 conducen a su represión. Mientras que en el gen MUC2, se ha demostrado que existe un enriquecimiento de las marcas H3K4Me2/3, acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9Ac) y acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac) en células de cáncer de páncreas, las cuales permiten la expresión de MUC2. También se ha demostrado que la transcripción de la MUC4 es afectada directamente por metilación *de novo* por parte de la DNMT3A y DNMT3B en la región 5'UTR de este gen, así como por las HDAC1 y HDAC3 (Omura N. and Goggings M., 2009).

Pero no solo la adición de grupos acetilo y metilo a los extremos amino terminales de las histonas parecen estar involucrados en el desarrollo del cáncer pancreático, sino también las enzimas responsables de eliminar las marcas de acetilación, es decir, las HDAC. Por ejemplo, se conoce que la HDAC2 se ve incrementada en PDAC, especialmente en tumores pobremente diferenciados confiriéndoles resistencia a la quimioterapia vía NOXA (Fritsche P., *et al.*, 2009). Por otro lado, HDAC7 se encuentra significativamente elevada en PDAC, además de que su expresión permite discriminar entre PDAC y otros tumores pancreáticos (Ouaïssi M., 2008). Adicionalmente, se ha observado una cooperación entre el factor de transcripción ZEB1, responsable del silenciamiento de E-cadherina, y las HDACs, ya que la hipermetilación del gen CDH1 (E-cadherina) se debe a la unión del complejo ZEB1-HDACs sobre su promotor. La participación de ZEB1 en reclutar a HDACs para reprimir su expresión fue corroborada en ratones *knock-down* para ZEB1. En estos ratones se observó que la ausencia de ZEB1 conlleva a la acetilación de las histonas del promotor de CDH1 permitiendo así su reexpresión (Aghdassi A., *et al.*, 2012)

Otros complejos modificadores que también participan durante el proceso carcinogénico del páncreas son los complejos represores del grupo Polycomb (PRC1 y PRC2), los cuales llevan a cabo la marca H3K27me3, la cual conduce a la represión transcripcional del gen en cuestión. Componentes del complejo PRC1, como son las proteínas BMI1 y RING1B, se han encontrado

sobreexpresados en PanIN (solo BMI1) y PDAC (ambos) (Martínez-Romero C., *et al.*, 2009), lo cual resulta en una alta susceptibilidad hacia la inducción de apoptosis (Song W., *et al.*, 2010). Estos resultados fueron confirmados realizando *knock-down* de Bmi1, en los cuales se induce una disminución de los niveles de ciclina D1, CDK2/4, Bcl-2 y AKT fosforilada, mientras se aumenta la expresión de p21 y Bax (Song W., 2010). Por otro lado, la proteína CBX7, otro miembro del complejo PRC1, muestra un decremento gradual conforme la progresión del PDAC (Karamitopoulou E., *et al.*, 2010). En el caso de la metil-transferasa de histonas EZH2 (subunidad del complejo represor PRC2, encargada de llevar a cabo la marca H3K27me3), se ha encontrado sobreexpresada tanto en muestras de PDAC como en líneas celulares de cáncer de páncreas, encontrándose una acumulación nuclear en células pobremente diferenciadas (Ougolkov A., *et al.*, 2008). Por lo que el empleo del RNA de interferencia (siRNA) dirigido hacia EZH2 resulta en la sensibilización a la quimioterapia, así como una reexpresión de p27 (un inhibidor de CDK), lo que conduce a un decremento en la proliferación celular. Resultados similares muestran que en pacientes con PDAC hay una relación inversa entre la expresión de EZH2 y E-cadherina, así como una relación entre la expresión de EZH2 y la sobrevida después de la quimioterapia con GEM (Toll A., *et al.*, 2010). Curiosamente, la inactivación de RUNX3 (factor de transcripción relacionado con RUNT-3), un componente de la vía de TGF- β , es mediada por dos mecanismos epigenéticos, tanto por EZH2 como por hipermetilación del DNA, sugiriendo que diferentes mecanismos epigenéticos, cooperan para favorecer el mecanismo carcinogénico en PDAC (Fujii S., *et al.*, 2008; Nomoto S., *et al.*, 2008). Recientemente, se ha demostrado la capacidad de EZH2 para regular negativamente la expresión del miR-218 en PDAC. El mecanismo propuesto es la formación de heterocromatina en el promotor de miR-218, donde la actividad de EZH2 favorece el reclutamiento de la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. En ensayos *in vitro*, miR-218 reduce la formación del tumor, la proliferación celular y el proceso de invasión (Li C., *et al.*, 2013).

MicroRNAs en Adenocarcinoma Ductal Pancreático.

En los últimos años se ha estudiado el papel que tienen los miRNAs sobre la biología del cáncer, principalmente en la capacidad para facilitar el crecimiento tumoral, invasión, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. Además, a nivel clínico, el perfil de ciertos miRNAs puede definir subtipos de cáncer, estadio, supervivencia, y algunos otros pueden servir para monitorear la respuesta al tratamiento (Lu J., *et al.*, 2005; Dvinge H., *et al.*, 2013).

El mecanismo de regulación de los miRNAs sobre los mRNAs puede ocurrir a nivel post-transcripcional o traduccional, dependiendo del nivel de complementariedad que tiene el miRNAs hacia el mRNA blanco. Si existe una complementariedad perfecta entre el miRNA y el extremo 3' del mRNA resultara en su degradación (mecanismos presentes en plantas), por el contrario, si la complementariedad no es perfecta, el miRNA podrá unirse en cualquier lugar del mRNA impidiendo su traducción (mecanismos presentes en mamíferos).

Los miRNAs son generados por la RNA polimerasa II (RNAPolII) a partir de regiones intergénicas o intrónicas, las cuales codifican para miRNAs precursores que son procesados dentro del núcleo por el complejo Drosha-DGCR8. Posteriormente este precursor se transporta al citoplasma por acción de la exportina XPO5, donde es procesada por el complejo Dicer-AGO2-TRBP resultando en miRNAs maduros los cuales posteriormente se acoplan al complejo RICS (complejo silenciador inducido por RNA), el cual lleva a cabo los mecanismos de regulación propiamente dichos (Figura 5) (Hayes J., *et al.*, 2014).



Figura 5. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs (Tomado de Hayes J., *et al.*, 2014).

En el cáncer de páncreas se ha detectado alteración en la expresión de una gran cantidad de miRNAs, debidos principalmente a la alteración en la metilación de sus regiones promotoras. Hasta la fecha, se ha reportado la alteración en la expresión de aproximadamente 744 miRNAs en PDAC (<http://pancreaticcancerdatabase.org/>, 2015). Sin embargo, solo algunos miRNAs han sido descritos que participan en etapas tempranas del PDAC. Por ejemplo, el miR-138a se encuentra silenciado por hipermetilación del promotor en PanIN I y PanIN II. Por otro lado, los miR-200 y miR-34a se encuentran alterados en etapas tardías del PDAC. En el caso del miR-200, este se encuentra sobreexpresado en PDAC invasivo, contribuyendo a la EMT por silenciamiento de E-cadherina. Por su parte, el miR-34a se encuentra hipermetilado, y su reexpresión induce senescencia y arresto del ciclo celular (Delpu Y., *et al.*, 2011).

Los miRNAs no solo se encuentran implicados en la carcinogénesis pancreática, sino también juegan un papel importante en el proceso de

metástasis. Se ha reportado la sobreexpresión de un grupo de miRNAs dirigidos a EP300, una HDAC, entre los cuales se encuentran el miR-194, miR-200b, miR-200c y miR-429, en PDAC invasivo comparado con PDAC no invasivo (Zhang L., *et al.*, 2011). También se ha observado que la sobreexpresión de los miR-224 y miR-486 promueven la metástasis en PDAC, al dirigirse específicamente al transcrito de CD40, una molécula importante para la respuesta inmune anti-tumoral. Por otro lado, se han reportado miRNAs con función anti-metastásica. En PDAC, la expresión ectópica del miR-146a inhibe la capacidad invasora de las células de cáncer de páncreas, por regulación negativa del EGFR y de IRAK1 (Zhang L., *et al.*, 2011).

El miR-96 se ha considerado un potencial supresor de tumores debido que se dirige específicamente a K-RAS. En PDAC, miR-96 se encuentra silenciado en comparación con tejidos normales. Su expresión ectópica logra inducir apoptosis e inhibición de la proliferación, de la migración e invasión de las células cancerosas. Por su parte, los miembros de la familia miR-200 también se consideran posibles supresores de tumores. Los miR-200 dirigen el silenciamiento de ZEB1/2, reduciendo el potencial de EMT. Sin embargo, no en todos los casos de PDAC la vía miR-200 está involucrada en la metástasis (Zhang L., *et al.*, 2011).

También existe asociación entre algunos miRNAs y la resistencia a la quimioterapia. Por ejemplo, el miR-21 se encuentra sobreexpresado en PDAC con mal pronóstico, además de ser encontrado en células cancerosas presentes después de la quimioterapia con GEM. En líneas celulares con expresión ectópica del miR-21 se observa un incremento en la proliferación e invasión celular, así como la inhibición de PTEN, de PDCD4 e inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y de las metaloproteasas de matriz 2 y 9 (Zhang L., *et al.*, 2011). De igual manera, se han reportado algunos miRNAs capaces de sensibilizar a las células a las terapias convencionales. Por ejemplo, el miR-34 se encuentra silenciado en PDAC, y su reexpresión induce arresto del ciclo celular y apoptosis.

Debido a la gran importancia que tienen los procesos epigenéticos en el proceso carcinogénico del PDAC; desde etapas tempranas hasta etapas avanzadas, se han tomado a algunos mecanismos como metilación del DNA y expresión de miRNAs como potenciales herramientas de diagnóstico y blancos terapéuticos.

Justificación

Lomberk et al. en el 2015 propone que el proceso carcinogénico en el páncreas está regulado no solo por alteraciones genéticas, sino también por alteraciones epigenéticas, las cuales, junto con alteraciones en la forma nuclear generan una intercomunicación favoreciendo procesos importantes de la biología del PDAC (Gwen A. Lomberk and Raul Urrutia., 2015). Sin embargo, hasta la fecha ha sido relativamente poco estudiadas las alteraciones de los mecanismos epigenéticos en PDAC.

Actualmente, se han reportado al menos 17 tipos de modificaciones en poco más de 30 residuos de aminoácidos de la histona H3 en humanos, entre las que se incluyen acetilación, ADP-ribosilación, biotinilación, citrulinación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otras (Yan-Ming Xu., et al. 2014). De todas ellas, solamente se ha estudiado la alteración de 6 PTM en PDAC. Por otro lado, de las 10 PTM que ocurren en el extremo amino de la histona H4, solo ha sido reportada la alteración de la H4K12Ac (Juliano CN., *et al.*, 2016). Con respecto a las variantes de histonas, no existen reportes al respecto de su participación en la progresión del PDAC.

Por todo lo anterior es que estamos interesados en saber si de igual manera que las alteraciones genéticas, las alteraciones a nivel epigenético juegan papeles importantes en el desarrollo del PDAC. Es decir, si existen alteraciones en PTMs o variantes de histonas con un patrón progresivo o específico de estadio del PDAC. Por todo lo anterior y considerando que existe una intercomunicación entre las alteraciones genéticas y epigenéticas es que creemos que un mayor conocimiento de lo que ocurre a nivel epigenético durante el desarrollo y progresión del PDAC permitirá en un futuro desarrollar nuevas drogas o estrategias en contra de esta enfermedad.

Hipótesis

Durante la progresión del cáncer pancreático existe un aumento gradual y específico de alteraciones a nivel epigenético.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si existe una alteración gradual o diferencial en la expresión de la variante de histonas H2A.Z y de modificaciones post-traduccionales en las histonas H3 y H4 en líneas celulares de cáncer de páncreas con diferentes grados de progresión.

Objetivos particulares

1. Determinar si la expresión de la variante de histonas H2A.Z está presente o varía en las diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas.
2. Estudiar si existe una expresión diferencial y progresiva del patrón de las modificaciones post-traduccionales de las histonas H3 y H4 no estudiadas hasta la fecha en PDAC.
3. Corroborar si alguno de las marcas epigenéticas identificadas en el presente trabajo está presente en biopsias de pacientes con PDAC.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron cuatro líneas celulares, una de ellas proveniente de páncreas normal y tres provenientes de cáncer pancreático con diferente grado de progresión (Tabla IV). La línea celular hTERT-HPNE (ATCC® CRL-4023™), perteneciente a páncreas normal e inmortalizadas con la subunidad de la telomerasa hTERT. Así como las líneas celulares de cáncer de páncreas BxPC-3 (ATCC® CRL-1687™), PANC-1 (ATCC® CRL-1469) y Capan-1 (ATCC® HTB-79), fueron proporcionadas por el Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía profesor del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.

La línea celular hTERT-HPNE se creció en medio DMEM sin glucosa (Sigma D-5030), suplementado con 25% de medio M3 Base (Incell Corp M300F-500), 2mM de L-glutamina, 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de EGF recombinante humano, 5.5 mM de D-glucosa y 750 ng/mL de puromicina. La línea celular BxPC-3 se cultivó en medio RPMI-1640 (ATCC® 30-2001™), suplementado con 10% de SFB. PANC-1 se creció en medio DMEM (ATCC® 30-2002™) suplementado con 10% de SFB y finalmente la línea celular Capan-1 fue crecida en medio IMDM (ATCC® 30-2005™), suplementado con 20% de SFB. Las líneas celulares fueron sembradas en placas P-100 y/o botellas de 75 cm², incubadas en una atmosfera húmeda, con CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 80-90%.

Subcultivo celular

Para realizar el subcultivo celular, así como para obtener una suspensión celular de trabajo se procedió de la siguiente manera. Una vez alcanzada la confluencia del 80-90%, se eliminó el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con PBS 1X estéril (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de

Na₂HPO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄), para remover las trazas del medio de cultivo. Posteriormente se agregó 2 mL de una solución de Tripsina-EDTA (BIOWEST L0931-500) y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Una vez que la monocapa se desprendió se agregaron 5 mL del medio de cultivo (suplementado con SFB), correspondiente para cada línea celular con el fin de inactivar la acción de la tripsina. La suspensión celular, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos para obtener el botón celular. Para la realización del subcultivo celular, se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo fresco, para finalmente distribuir de manera equitativa en placas de cultivo con medio fresco (aproximadamente 10x10⁵ células por placa).

Para obtener una suspensión celular de trabajo, el botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS 1X y se centrifugó 1000 rpm durante 5 minutos para lavar las células del medio de cultivo.

Obtención de extractos proteicos totales

Para la obtención de los extractos proteicos totales de las líneas celulares se utilizó el buffer de lisis *M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent* (PIERCE 78501). Brevemente, partiendo del botón celular en PBS 1X, se descartó este último y se agregó *M-PER® Reagent*, en una proporción 1:10 con respecto al volumen celular. Para evitar la degradación de las proteínas por acción de las proteasas se agregó el inhibidos de proteasas *cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (ROCHE 1187358000). Una vez que el botón se resuspendió, se incubó durante 30 minutos a 4 °C con agitación constante. Finalmente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos para remover los detritus celulares. Se transfirió el sobrenadante a un vial nuevo y se almaceno a -80 °C hasta su uso.

Obtención de histonas por el método de extracción ácido

Para determinar las marcas epigenéticas asociadas con las histonas (PTMs y variantes de histonas), se procedió a extraer las proteínas nucleares básicas mediante el método de extracción ácido descrito por Subirana (1973). Brevemente, las células fueron lisadas con el buffer hipotónico *Pre-Lysis Buffer* (Abcam ab113476) conteniendo *cOmplete™* durante 30 minutos a 4 °C con agitación constante. Este paso permite obtener los núcleos celulares los cuales son recuperados mediante una centrifugación a 12,000 rpm a 4 °C durante 60 segundos. Posteriormente el botón nuclear se lavó con una solución de NaCl al 0.3 M para disociar los complejos de histonas-DNA, así como histonas-dsRNA. La preparación se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 60 segundos. Este paso se repitió empleando NaCl al 0.5 M. El botón nuclear se resuspendió en 10 volúmenes de HCl 0.25 M suplementado con *cOmplete™* y se incubó toda la noche a 4 °C con rotación constante. Al día siguiente, la suspensión se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 30 minutos para obtener el sobrenadante el cual contiene las proteínas básicas (entre ellas las histonas). Este sobrenadante se precipitó toda la noche con 8 volúmenes de acetona a -20 °C. Las proteínas básicas se recuperaron por centrifugación a 14,000 rpm a 4 °C durante 60 minutos, finalmente se dejó secar el botón de proteínas y se resuspendieron en un volumen final de 100 uL de agua bidestilada estéril.

Fraccionamiento núcleo/citoplasma

Para determinar la presencia de enzimas modificadoras de la cromatina en la fracción nuclear y citoplasmática se realizó un fraccionamiento celular. Brevemente, las células fueron lisadas con el buffer hipotónico *Pre-Lysis Buffer* suplementado con *cOmplete™* durante 30 minutos a 4 °C con agitación constante. Posteriormente, los núcleos se recuperaron por centrifugación a 12,000 rpm a 4 °C durante 60 segundos. Se recuperó el sobrenadante (que contiene la fracción citoplasmática) y el botón que contiene a los núcleos se

lavó con una solución de NaCl al 0.3 M para disociar los complejos de histonas-DNA, así como histonas-dsRNA. La suspensión se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 60 segundos. Este paso se repitió empleando NaCl al 0.5 M. El botón obtenido en este paso (el cual contiene los núcleos) se resuspendió en 10 volúmenes del buffer de lisis *M-PER® Reagent* conteniendo *cOmplete™* y se incubó por 30 minutos a 4 °C con agitación constante. Finalmente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante (fracción nuclear). Ambas fracciones se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Determinación de modificaciones post-traduccionales de la histona H3

Para determinar el patrón global de PTMs de la histona H3 se utilizó el microarreglo de proteínas *EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric)* (EPIGENTEK P-3100-96), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 49 uL del buffer *Antibody Buffer* a los 96 pozos de la placa (Figura 6). En el caso de los pozos control, cuyas lecturas nos sirvieron para realizar los cálculos de concentración, se agregó 1 uL de la solución *Diluted Assay Control Protein* de 5 ng y 25 ng a los pozos correspondientes. Para general las lecturas correspondientes a las PTM, se agregaron 100 ng de extractos de histonas en un volumen de 1 uL de las líneas celulares hTERT-HPNE y Capan-1 a los pozos correspondientes (Figura 6). Se cubrió la placa con la cubierta *Adhesive Covering Film* para evitar la evaporación y se incubó a 37 °C por 90 minutos. Terminado el tiempo de incubación se retiró la solución de reacción de cada pozo y se lavó tres veces empleando 150 uL del buffer de lavado *Diluted Wash Buffer*. Posteriormente, se agregaron 50 uL del buffer *Diluted Detection Antibody* a cada pozo, se cubrió con una cubierta *Adhesive Covering Film* y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de la incubación se removió la solución de reacción y se lavó 4 veces con 150 uL del buffer de lavado *Diluted Wash Buffer*, procurando que en el último lavado la solución sea retirada completamente de los pozos. Finalmente, para generar la reacción colorimétrica, se agregaron 100 uL de la solución *Developer Solution* y se

incubó a temperatura ambiente por 5 minutos alejado de la luz. Una vez que el pozo se tiñera de azul se agregaron 100 uL de la solución *Stop Solution* la cual genera un color amarillo el cual se leyó en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm y 655 nm.

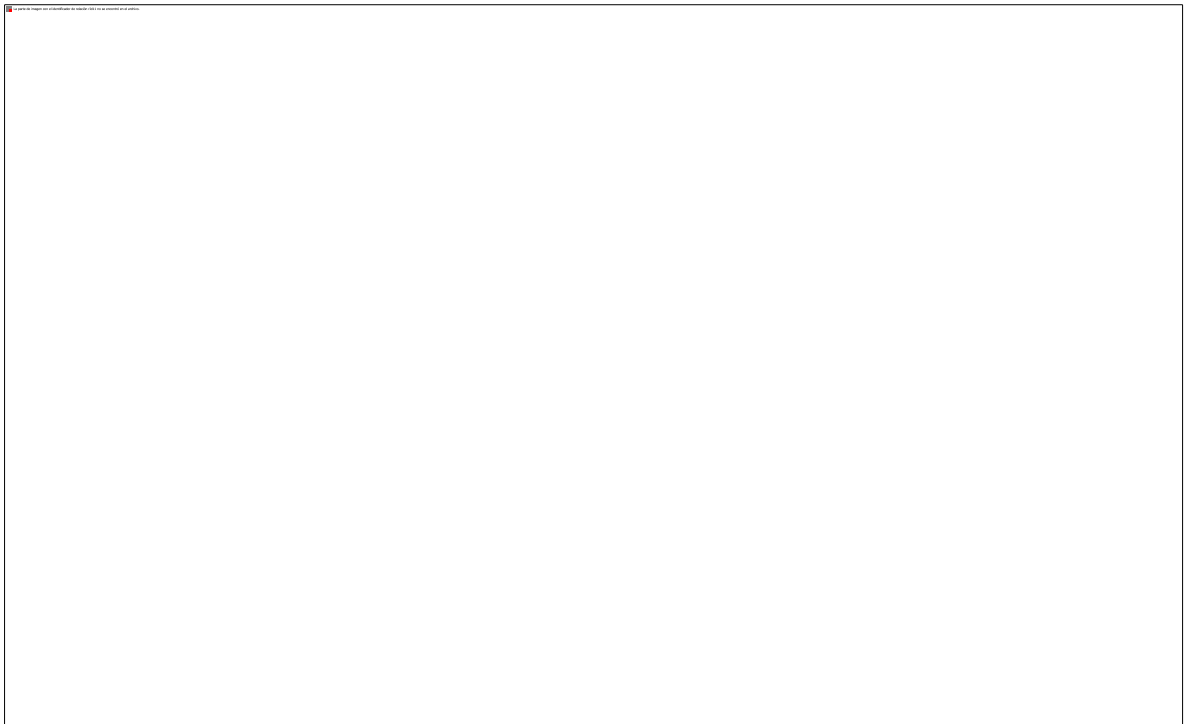


Figura 6. Organización de los pozos del EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric).

Western Blots

Para determinar el nivel de proteína (variantes de histonas y PTMs), se realizaron ensayos de western blot (WB) empleando electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970).

Para determinar diferencias en el nivel de proteínas específicas en los WBs fue necesario cuantificar la concentración total de proteínas presentes en los extractos celulares. La concentración fue determinada utilizando el kit de

cuantificación *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BIO-RAD 500-0006). Brevemente, para los extractos proteicos, en viales de 1.5 mL de agregaron 799 uL de agua inyectable más 1 uL del extracto de proteínas correspondiente a cada línea celular. Para el caso de la curva de calibración, se realizaron diluciones del stock de albumina de suero bovino 1ug/uL (BSA) en agua inyectable para obtener concentraciones de 0, 0.5, 1, 5 y 10 ug/uL. A cada uno de los viales se le agregaron 200 uL del reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* y tras una agitación empleando el vortex se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo la solución de cada vial se transfirió a celdas para espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Una vez cuantificados los extractos de proteína se prepararon geles SDS-PAGE, a una concentración del 12% para migrar los extractos totales, fracción nuclear y fracción citoplasmática. Mientras que para resolver los extractos de histonas se utilizaron geles SDS-PAGE al 18%.

Para la preparación de los geles al 18% se agregaron 3 mL de una solución de acrilamida:bisacilamida (30:0.08), 1.87 mL de Tris buffer pH 8.8, 50 uL de una solución de SDS al 10% y 31.7 uL de agua. Para la polimerización de agregaron 40 uL de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 8.3 uL de tetrametilendiamina (TEMED). Para preparar los geles al 12% se agregaron 2 mL de una solución de acrilamida:bisacilamida (30:0.08), 1.87 mL de Tris buffer pH 8.8, 50 uL de una solución de SDS al 10% y 1 mL de agua. Para la polimerización de agregaron 40 uL de PSA al 10% y 8.3 uL de TEMED. Una vez formado el gel separador se preparó el gel concentrador al 5% empleando 390 uL de una solución de acrilamida:bisacilamida (30:0.08), 370 uL de Tris buffer pH 6.8 y 30 uL de SDS al 10%. Para la polimerización se agregó 30 uL de PSA al 10% y 1.5 uL de TEMED.

Para la preparación de las muestras se utilizó buffer Laemmli (SDS al 4%, Glicerol al 20% 2-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al 0.004%, 0.125 M de Tris pH 6.8) el cual se agregó en una relación 4:1 con respecto a la

muestra y se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Finalmente se cargaron 10 ug de proteína en cada pozo y se corrieron a 120 Volts.

Para la transferencia de las proteínas a analizar a un soporte solido se utilizó la membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane* (GE Healthcare RPN303D) y buffer de transferencia (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, metanol al 20%) de acuerdo al protocolo descrito por Towbin (1979). Para preparar el cassette de transferencia se colocó el soporte de la cámara, seguido de una esponja, tres piezas de papel whatman, el gel con las proteínas resueltas, la membrana de nitrocelulosa, tres piezas de papel whatman y finalmente una esponja. El cassette se cerró perfectamente, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana de nitrocelulosa, y se colocó dentro de la cámara de transferencia dentro de la cual se colocó un bloque de hielo para evitar el sobrecalentamiento del buffer, adicionalmente la cámara fue colocada dentro de un recipiente con hielo. La transferencia se realizó a 100 Volts y 300 mA por 2 horas. Después de la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (2% de ácido acético, 0.5% de Ponceau en agua) para corroborar que la transferencia se realizó eficientemente. Una vez confirmado que la transferencia se realizó correctamente, las membranas fueron bloqueadas con leche libre de grasas en PBS-Tween (PBS conteniendo de tween-20 al 0.05%) durante 2 horas a temperatura ambiente, para evitar unión inespecífica del anticuerpo primario. Después del bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla III) a 4 °C con agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente las membranas se lavaron con PBS-Tween durante 10 minutos por triplicado. Al terminar los lavados se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla III) a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente se realizaron tres lavados con PBS-Tween durante 10 minutos cada uno.

Las imágenes fueron obtenidas en el ChemiDoc™ MP System (BIO-RAD 1708280) utilizando como sustrato el *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher 34095).

Tabla III. Anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Peso molecular	Especie	Título WB	Marca
Anticuerpos primarios				
E-cadherina	120 kDa	Conejo	1:500	Santa Cruz
Claudina 1	23 kDa	Conejo	1:500	Thermo Fisher Scientific
Claudina 4	23 kDa	Conejo	1:500	Thermo Fisher Scientific
Ocludina	60 kDa	Conejo	1:20,000	Casero
Vimentina	57 kDa		1:2,000	----
H2A.Z	13 kDa	Conejo	1:1,000	Abcam ab4178
H2A.Z	13 kDa	Conejo	1:1,000	Cell Signaling 2718
H3-COOH	15 kDa	Conejo	1:150,000	Abcam ab1791
H3K9Ac	15 kDa	Conejo	1:1,000	Millipore 06-942
H3K14Ac	15 kDa	Conejo	1:1,000	Millipore 07-353
H3K18Ac	15 kDa	Conejo	1:1,000	Millipore 07-354
H3K27Me3	15 kDa	Ratón	1:1,000	Abcam ab6002
H4K12Ac	12 kDa	Conejo	1:2,000	Abcam ab61238
H4PanAc	12 kDa	Conejo	1:4,000	Upstate 06-866
H4R3Me1	12 kDa	Conejo	1:1,000	Abcam ab17339
H4R3Me2 asimétrica	12 kDa	Conejo	1:1,000	Abcam ab129231

(Continuación) Tabla III. Anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Peso molecular	Especie	Título WB	Marca
Anticuerpos primarios				
GAPDH	36 kDa	Conejo	1:20,000	GeneTex GTX100118
SIRT1/SIR2	110 kDa	Conejo	1:1,000	Upstate 07-131
HDAC3	51 kDa	Conejo	1:1,000	Active Motive 40968
Anticuerpos secundarios				
HRP anti-conejo		Cabra	1:7,500	Zymed 81-6120
HRP anti-ratón		Cabra	1:7,500	Zymed 81-6520

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPad Prism 6.01. Los datos fueron expresados como media \pm SEM. La correlación estadística de los datos entre los grupos fue analizada por análisis de varianza de una cola (ANOVA) o por la prueba de T de Student según fuera el caso. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo a: *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.01 o ****P<0.001.

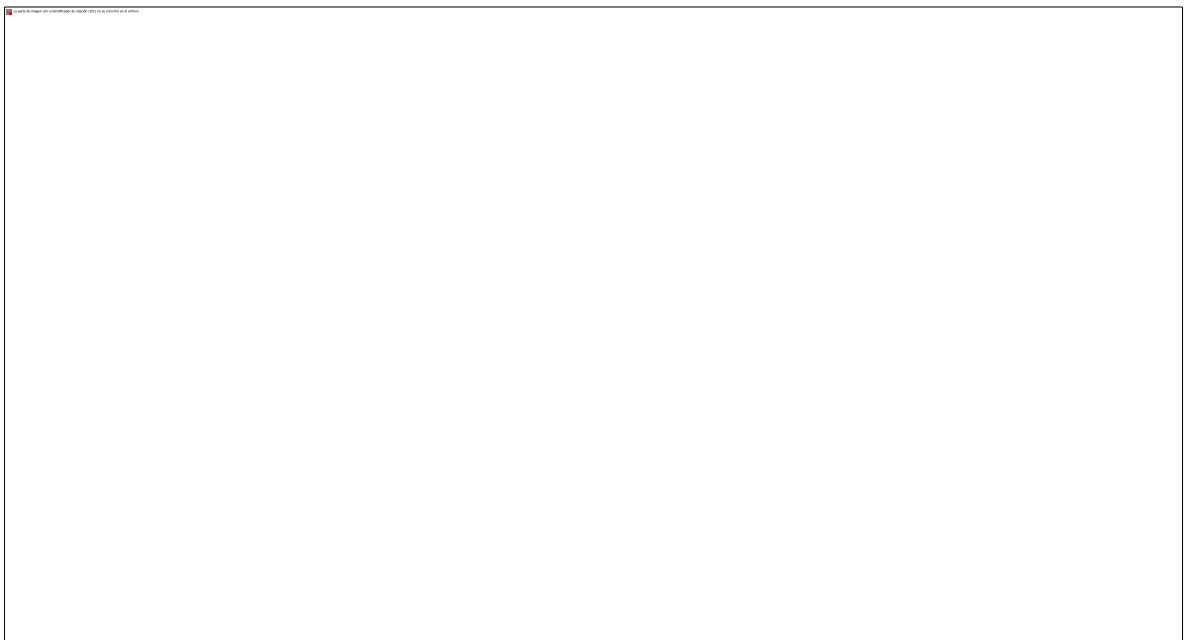
Resultados

Estadificación de las líneas celulares

Con el propósito de determinar si existen alteraciones diferenciales y progresivas de ciertas PTM, así como de la variante de histonas H2A.Z que correlacionen con los diferentes grados de malignidad del tumor, se emplearon 4 diferentes líneas celulares pancreáticas con distinto grado tumoral. Una de ellas corresponde a la línea celular hTERT-HPNE proveniente de tejido pancreático normal con fenotipo ductal, en la cual no han sido descritas alteraciones genéticas en los oncogenes y genes supresores de tumores característicos del PDAC (Tabla IV), por lo que esta línea celular fue utilizada como línea celular control para este trabajo. También se emplearon tres líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-1, BxPC-3 y PANC-1), las cuales tienen diferentes alteraciones genéticas (Tabla IV). Por ejemplo, la línea celular BxPC-3 carece de la mutación en el gen K-RAS, la cual es considerada la mutación oncogénica más importante para el desarrollo del PDAC. Debido a esto se considera que, si bien BxPc3 es una línea celular cancerígena, el fenotipo de estas células no debería ser tan agresivo comparado con otras líneas celulares en las cuales el gen K-RAS esta mutado. Por su parte, la línea celular PANC-1 clasificada como de alto grado, carece de la mutación en el gen SMAD4/DPC4, que regula el crecimiento celular además de intervenir en la señalización de TGF- β . Además, el perfil citogenético de esta línea celular (Tabla IV) revela un mayor número de cromosomas (63 cromosomas), lo cual indica que esta línea posee una alta inestabilidad cromosómica. Finalmente, la línea celular Capan-1, considerada como grado bajo posee mutaciones en el oncogén K-RAS y en los genes supresores de tumores CDKN2A/p16, p53, SMAD4/DPC4 y BRAC2 los cuales como ya se mencionó en la introducción son considerados como genes importantes para la progresión de la enfermedad, además de ser una línea celular proveniente de un sitio metastásico. Resulta importante mencionar que el estadio clínico de los pacientes de los cuales se obtuvieron estas líneas celulares es diferente y

tiende a ser gradual, ya que para la línea celular BxPC-3 le corresponde el estadio más leve (TxNxMx), para la línea celular PANC-1 se describe un estadio intermedio (T2N1M0), y finalmente la para la línea celular Capan-1, al provenir de un sitio metastásico presenta un estadio más agresivo (TxN1M1) (ver tabla IV).

Tabla IV. Características clínicas, histológicas y genéticas de las líneas celulares empleadas en este trabajo.

A large empty rectangular box with a thin black border, intended for the content of Table IV. The box is currently blank.

Sin embargo, en el 2003 Sipos y colaboradores, determinaron la estadificación de 12 líneas celulares de cáncer de páncreas, donde consideran a Capan-1 como línea celular de grado bajo, BxPC-3 de grado intermedio, PANC-1 de grado alto y finalmente a hTERT-HPNE como línea celular normal (Sipos B., *et al.*, 2003). Todo esto basado en estudios histológicos, principalmente al observar las estructuras celulares, entre ellas la presencia de polimorfismo celular y nuclear, así como la pérdida de la polaridad celular, las cuales fueron características del grado bajo y del grado intermedio. Por su parte, la reducción

en el número de los gránulos de mucina y organelos celulares correspondía al grado intermedio y al grado alto. Este grupo también analizó diferentes marcadores por inmunohistoquímica (IHC), demostrando que las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19, las cuales son exclusivas de PDAC bien diferenciado, están presentes en líneas celulares de grado bajo e intermedio, y por su parte, vimentina, un marcador de PDAC pobremente diferenciado, se encuentra presente en líneas celulares de alto grado (Sipos B. et al, 2003).

Por lo que para determinar con una mayor certeza la estadificación de cada una de estas líneas celulares, lo cual era indispensable para el objetivo que nos habíamos planteado en este trabajo es que decidimos realizar ensayos de WB empleando diferentes marcadores epiteliales (occludina, claudina 1, claudina 4 y E-cadherina), y mesénquimales (vimentina), con el fin de establecer con mayor precisión la estadificación de nuestras líneas celulares.

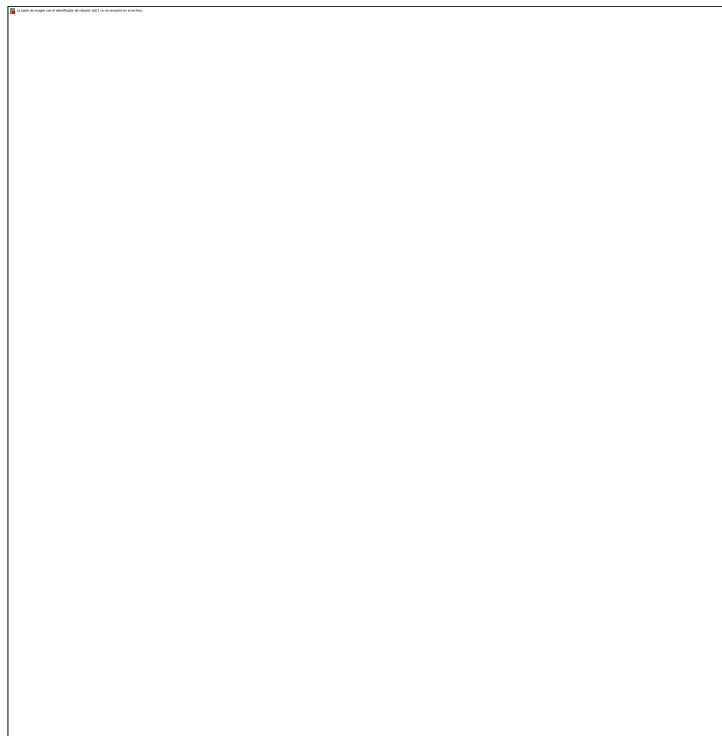


Figura 7. Estadificación de las líneas celulares empleadas. Evaluación de marcadores epiteliales y mesénquimales en las líneas celulares empleadas mediante la técnica de WB. El anticuerpo anti-GAPDH fue utilizado como control de carga. Se cargaron aproximadamente 10 ug de proteína por pozo.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos de los WBs empleando los marcadores epiteliales y mesénquimales. Analizando las líneas celulares de cáncer de páncreas empleadas en este trabajo, observamos que Capan-1 tienen niveles elevados de marcadores epiteliales como ocludina, claudina 1/4 y E-cadherina, por lo que se confirma como línea celular de bajo grado, además de tener niveles bajos de vimentina, un marcador mesénquimal. Por su parte PANC-1 presenta niveles muy reducidos de los marcadores epiteliales, mientras que tiene niveles elevados del marcador de mesénquima, vimentina, lo cual confirma su estadificación como línea celular de alto grado. Finalmente, la línea celular BxPC-3 posee niveles intermedios de los marcadores epiteliales claudina 1/4 y E-cadherina, así como niveles reducidos de ocludina y vimentina, por lo que se le puede clasificar como línea celular de grado intermedio.

Por lo que entonces, tomando en cuenta estos resultados, los diferentes grados de progresión para cada línea celular son los siguientes: hTERT-HPNE (línea celular normal), Capan-1 (grado bajo), BxPC-3 (grado intermedio), y PANC-1 (grado alto).

Niveles elevados de H2A.Z en líneas celulares y biopsias de cáncer de páncreas

Una vez que corroboramos que nuestras líneas celulares tuvieran el fenotipo adjudicado por el grado del tumor, estas fueron empleadas para averiguar si la histona H2A.Z participaba en el desarrollo del cáncer de páncreas. Decidimos estudiar esta variante porque ha sido demostrado que H2A.Z esta alterada en diferentes tipos de cáncer como cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, entre otros (Vardabasso C. et al., 2014). Además, se ha establecido que los niveles alterados de H2AZ en estos tipos de cáncer modula la transcripción de genes involucrados en regular el ciclo celular (E2F1, CDK1, AURKB, CDC6, etc.) por lo que se considerada un importante regulador epigenético en procesos carcinogénicos.

Con todos estos antecedentes nos planteamos la hipótesis de que la variante de histonas H2A.Z pudiera estar participando en el desarrollo y la progresión del PDAC. Por lo que entonces, para determinar si existía una expresión diferencial y progresiva en los niveles de expresión de la variante de histonas H2A.Z en las líneas celulares de cáncer de páncreas se realizaron ensayos de WB. Para esto se empleó un anticuerpo comercial que reconoce el extremo carboxilo terminal de esta variante en humanos (ab4174). Para lo cual, inicialmente se obtuvieron las histonas de las cuatro líneas celulares (Figura 8A), con las cuales se realizaron los ensayos de WB. Como se muestra en la figura 8B, se detectaron niveles altos de la variante H2A.Z en todas las líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular hTERT-HPNE. El análisis densitométrico que se muestra en la figura 8C permito determinar de manera cuantitativa que BxPC-3 presenta el doble de nivel de expresión de H2A.Z cuando se compara con hTERT-HPNE. Mientras que Capan-1 y PANC-1 presentan niveles muy parecidos entre ellas, los cuales son casi cuatro veces más altos con respecto a hTERT-HPNE. En donde la diferencia de Capan-1 con respecto a hTERT-HPNE resulta ser significativa ($P=0.0442$). Estos datos sugieren que la variante de histonas H2A.Z tiene niveles de expresión más elevados en líneas celulares de cáncer de páncreas independientemente del grado de progresión del tumor. En conclusión, todos estos datos indican que la desregulación en los niveles de expresión de H2A.Z podrían jugar un papel importante en el desarrollo y progresión del PDAC.



Figura 8. Niveles elevados de H2A.Z en PDAC. (A) Integridad de los extractos de histonas de las líneas celulares en gel de poliacrilamida al 18% **(B)** Evaluación de los niveles de H2A.Z en la línea celular normal y las líneas celulares de cáncer de páncreas mediante WB. El anticuerpo anti-H3-COOH fue utilizado como control de carga. Se cargaron aproximadamente 10 ug de proteína por pozo. **(C)** Densitometría de la señal obtenida para cada una de las líneas celulares. Los resultados se muestran normalizados con respecto a la señal obtenida de hTERT-HPNE. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ o **** $P < 0.001$, comparado con hTERT-HPNE.

Alteración en las PTM del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4 en líneas celulares de cáncer de páncreas

Tomando en cuenta el resultado anterior, es evidente que existen alteraciones a nivel epigenético en las líneas celulares de PDAC. Por lo que nos preguntamos si también las PTMs de las histonas podrían participar en el desarrollo del cáncer de páncreas. Estudios previos han demostrado que algunas de ellas se encuentran alteradas en biopsias de pacientes con PDAC

(Tabla V), por lo que se sugiere fuertemente que estas son importantes para regular ciertos procesos a lo largo de la progresión de la enfermedad (Wei Y., *et al.*, 2008; Manuyakorn A., *et al.*, 2010; Watanabe T., *et al.*, 2012; Juliano CN., *et al.*, 2016). Para analizar si otras PTMs de la histona H3 no estudiadas hasta la fecha en PDAC se encuentran alteradas con respecto a su contraparte normal se realizó un arreglo de proteínas tipo ELISA, (*EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric)*), el cual nos permitió determinar 21 diferentes PTM de la histona H3, de las cuales 15 (H3K4ME1, H3K9ME1/3, H3K27ME1/2, H3K36ME1/2/3, H3K79ME1/2/3, H3K14AC, H3K56AC, H3S10P Y H3S28P), no habían sido estudiadas en el PDAC. En este arreglo se analizaron las histonas obtenidas de la línea celular control hTERT-HPNE y de la línea celular Capan-1, ya que esta última presentó los niveles más elevados de la variante de histonas H2A.Z. El resultado de este arreglo se muestra en la figura 9A donde se observa que las 21 diferentes PTMs de la histona H3, tanto las asociadas a activación transcripcional como a represión transcripcional se encuentran elevadas en la línea celular Capan-1. Entre las PTM de la histona H3 que están elevadas en Capan-1 se encuentra la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10P), la cual está asociada con una mayor proliferación celular, la H3K9Ac y la acetilación de la lisina 18 de la histona H3 (H3K18Ac), de las cuales, su alteración ya ha sido reportada anteriormente en biopsias de pacientes de PDAC (Juliano C.N. *et al.* 2016) lo que validaba los resultados obtenidos en este ensayo.

Para corroborar los resultados en las PTMs no estudiadas y para investigar su estado en las otras líneas celulares no analizadas por el microarreglo se realizaron ensayos de WB. Sin embargo, solamente se estudiaron aquellas PTMs, de las cuales contábamos con los anticuerpos comerciales en el laboratorio. Una de las PTM analizadas y la cual fue identificada en el microarreglo fue la H3K9Ac, una marca asociada con activación transcripcional altamente enriquecida en los promotores de genes activos (Karmidiya, *et al.*, 2012). Como se aprecia en las figuras 9B y 9C, esta marca está incrementada en las histonas provenientes de todas las líneas celulares

de PDAC. En BxPC-3 y PANC-1 esta marca epigenética esta incrementada dos veces más con respecto a la línea celular normal. Mientras que, en Capan-1 la H3K9Ac se encuentra 4 veces más representada con respecto a hTERT-HPNE. Con lo que respecta a la acetilación de la lisina 14 de la histona H3 (H3K14Ac), otra PTM asociada con activación transcripcional que al igual que la H3K9Ac está presente en promotores de genes activos, así como en genes en estado “poised”. Nuevamente encontramos que está aumentada en las líneas celulares Capan-1 y BxPC-3 en comparación con la línea celular normal, siendo la línea celular Panc-1 la que muestra una menor señal (Figuras 9B y 9C). Debido a que en estas dos (H3K9Ac y H3K14Ac) marcas epigenéticas encontramos que están mas enriquecidas en la línea celular de bajo grado (Capan-1) queda claro entonces que el aumento de esta PTM es inversamente proporcional al grado de tumor de las líneas celulares de PDAC y que parece ser no gradual y progresivo.

Otra marca asociada con activación transcripcional, la H3K18Ac nuevamente se encuentra aumentada en las tres líneas celulares de PDAC en comparación con hTERT-HPNE y específicamente en las líneas celulares BxPC-3 y PANC-1 se presenta una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0624$ y $P=0.0556$ respectivamente) en comparación con la línea celular control (Figuras 9B y 9C). En este caso esta PTM tiende a aumentar de una manera directamente proporcional al grado de progresión de las líneas celulares.

Finalmente, la H3K27Me3, una marca asociada con represión transcripcional también se encontró elevada en las líneas celulares de PDAC en comparación con hTERT-HPNE. En este caso las líneas Capan-1 y PANC-1 presentan diferencia significativa ($P=0.0080$ y $P=0.0623$ respectivamente) con respecto a hTERT, mientras que BxPC-3 tiene una diferencia menos evidente (Figuras 9B y 9C).

Si bien, solamente encontramos que el aumento de la H3K9Ac y de H3K14Ac es inversamente proporcional y que el aumento de la H3K18Ac es directamente proporcional al grado del tumor, es evidente que estas

alteraciones pueden estar involucradas en favorecer el proceso carcinogénico. Por lo que, en conjunto, todos estos resultados indican que existen alteración en los niveles globales de PTM de la histona H3, en donde marcas como la H3K9Ac, la H3K14Ac, la H3K18Ac y la H3K27Me3 podrían estar regulando la expresión de genes importantes para la biología del PDAC, haciendo evidente la necesidad de seguir estudiando estas alteraciones desde un nivel molecular y funcional.

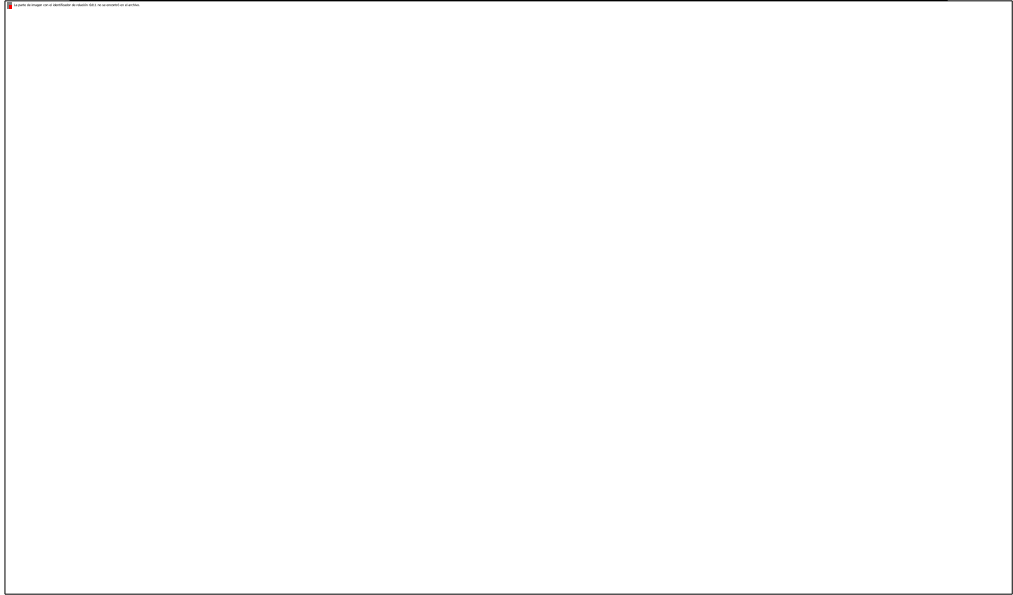
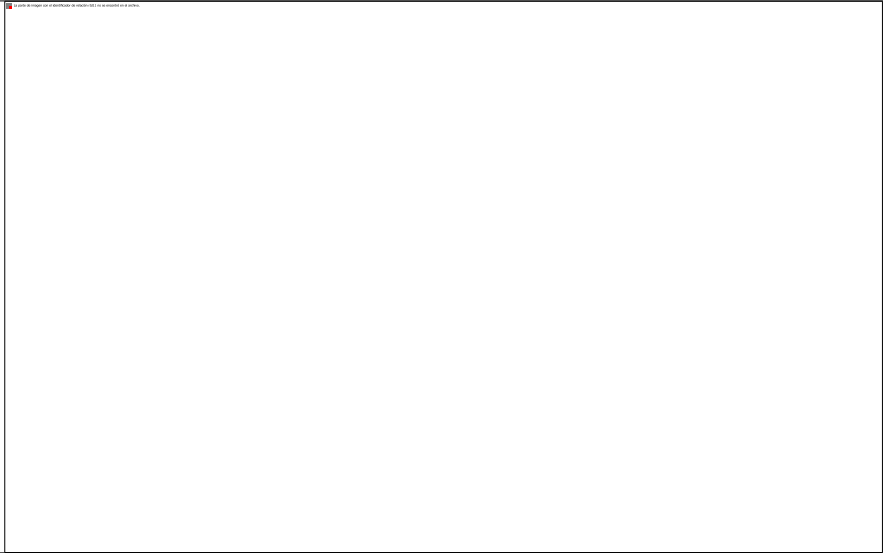
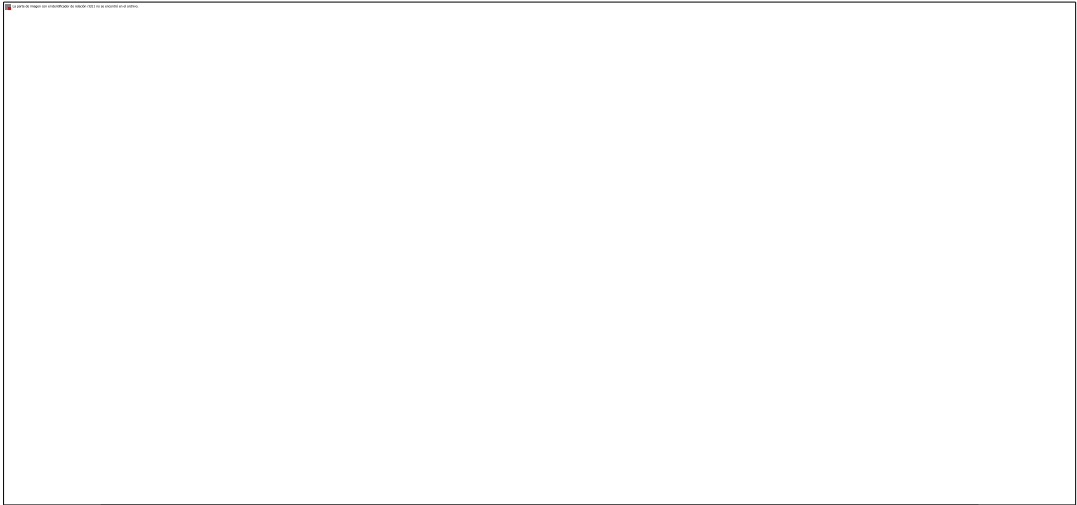


Figura 9. Alteración en los niveles de PTM de la histona H3 en PDAC. (A) Evaluación de los niveles de PTM de la histona H3 mediante el arreglo de proteínas EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Colorimetric), de la línea celular Capan-1 comparada con la línea celular hTERT-HPNE. Los resultados se muestran normalizados con respecto a la línea celular hTERT-HPNE. **(B)** Evaluación de los niveles de algunas PTM de la histona H3 en la línea celular normal y las líneas celulares de cáncer de páncreas mediante WB. El anticuerpo anti-H3-COOH fue utilizado como control de carga. Se cargaron aproximadamente 10 ug de proteína por pozo. **(C)** Densitometría de la señal obtenida para cada una de las líneas celulares de las PTM de la histona H3 analizadas. Los resultados se muestran normalizados con respecto a la señal obtenida de hTERT-HPNE. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.01 o ****P<0.001, comparado con hTERT-HPNE.

Tomando en cuenta todos estos resultados, quisimos averiguar si también las PTMs presentes en el extremo amino de la histona H4 estaban alteradas en las diferentes líneas celulares del PDAC con respecto a la línea celular hTERT-HPNE. Por lo que, procedimos a analizar cuatro diferentes PTMs de la histona H4, entre las que se encuentran: la acetilación de las lisinas K5, K8, K12 y K16 de la histona H4 (H4PANAc), la H4K12Ac, la monometilación de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3Me1) y la dimetilación asimétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3Me2Asi) (Figura 10A). Al analizar los resultados que obtuvimos para las 4 líneas celulares la H4PANAc, esta incrementada en las 3 líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular normal. De manera importante encontramos que para el caso de Capan-1 esta diferencia es estadísticamente significativa (P=0.0334) (Figura 9B y 9C). Por lo que este resultado indica que existe la posibilidad de que uno o varios residuos de lisinas (K5, K8, K12 y/o K16), se encuentren acetilados en mayor grado en las líneas celulares de PDAC. Para averiguar de manera específica algunos de los residuos que reconoce el anticuerpo H4PanAc decidimos averiguar que pasaba con la acetilación de la lisina 12 de la histona H4. Como se aprecia en le figura 10B y C, esta marca se encuentra aumentada en las líneas celulares de PDAC en comparación con hTERT-HPNE (Figura 10B y 10C), teniendo significancia estadística para Capan-1 y PANC-1 (P=0.0352 y P=0.0303

respectivamente), con respecto a hTERT-HPNE. Por lo que tomando en cuenta los resultados obtenidos para la histona H3 y H4 en las 3 líneas de PDAC, nuevamente encontramos que las lisinas (estudiadas en este trabajo) de ambas histonas están hiperacetiladas. Por lo que estudiar cual es el significado de esta hiperacetilación en el desarrollo y progresión del PDAC se vuelve imperativo.

En el caso de la H4R3Me1, una marca asociada con activación transcripcional, encontramos de manera muy interesante que esta marca está presente únicamente en dos de las tres líneas de PDAC. Al analizar el genotipo encontramos que tanto Capan-1 como Panc-1 tienen mutado al gen K-RAS a diferencia de la línea celular BxPC3 en donde este gen no está mutado. Este resultado se confirmó más de tres veces porque entonces esta marca epigenética parece ser exclusiva de líneas celulares de PDAC en donde el gen K-RAS esta mutado. Otra marca epigenética presente en la histona H4 es la dimetilación asimétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3Me2Asi), una marca que en mamíferos se asociada con activación transcripcional (en levaduras se asocia a represión transcripcional). De manera inesperada encontramos que esta marca epigenética está ausente en la línea normal y en las tres líneas de PDAC. Lo que sugeriría que esta PTM, se encuentra ausente en el tejido pancreático tanto normal como canceroso. Para eliminar la posibilidad de que nuestro anticuerpo no estuviera reconociendo la H4R3Me2Asi, corrimos al mismo tiempo las histonas de nuestras cuatro líneas celulares y además un carril con histonas comerciales pertenecientes a timo de bovino (ROCHE). En este caso pudimos detectar una señal en el peso esperado (Figura 10B y 10C) en las histonas de bovino. Por lo que tomando en cuenta todos estos datos esto indica que el anticuerpo funciona y reafirma la posibilidad de que la H4R3Me2Asi está ausente en el tejido pancreático.

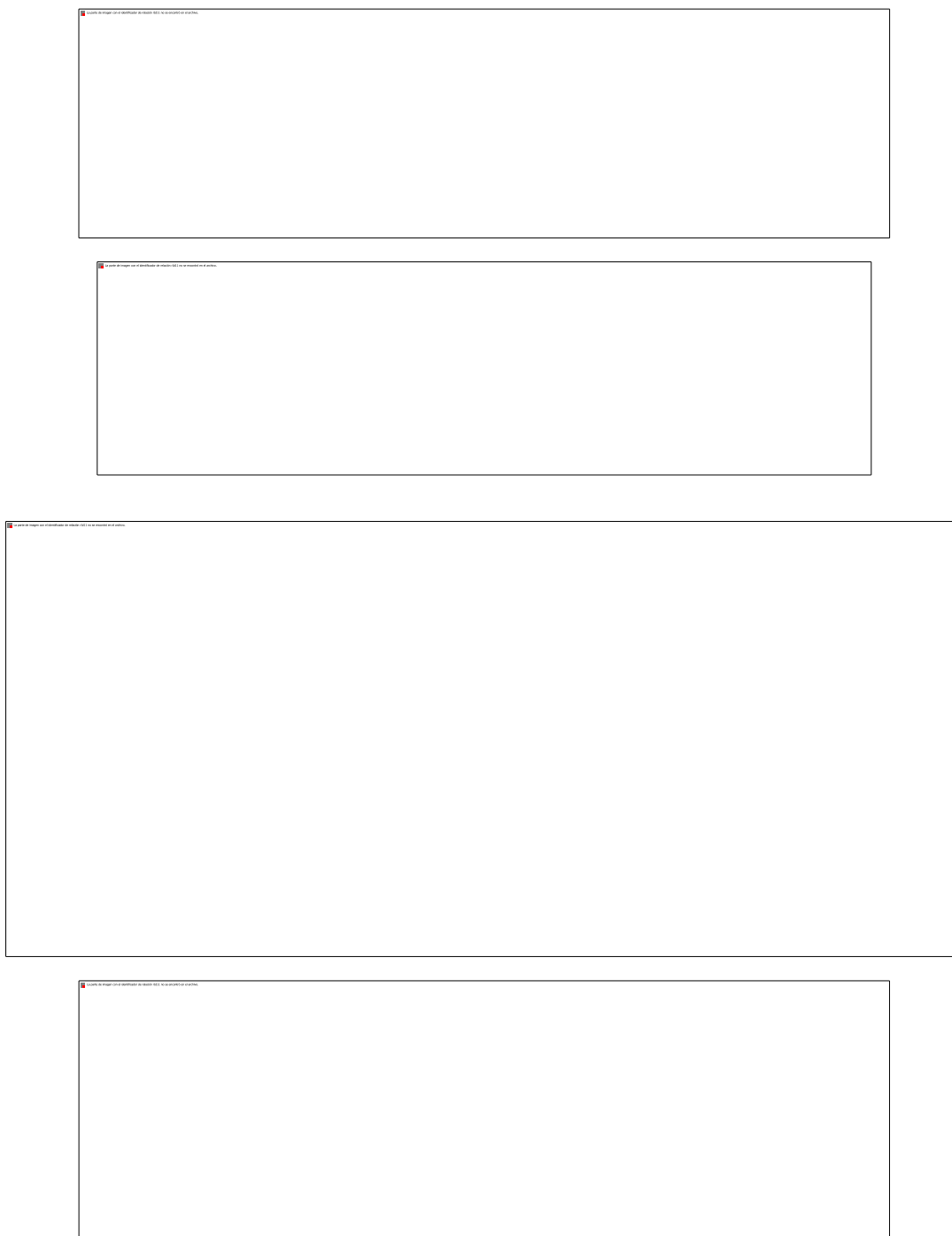


Figura 10. Alteración en los niveles de PTM de la histona H4 en PDAC. (A) Representación de las PTM presentes en el extremo amino de la histona H4 analizadas. Los triángulos representan acetilaciones y los pentágonos representan metilaciones. **(B)** Evaluación de los niveles de las PTM de la histona H4 en la línea

celular normal y las líneas celulares de cáncer de páncreas mediante WB. El anticuerpo anti-H3-COOH fue utilizado como control de carga. Se cargaron aproximadamente 10 ug de proteína por pozo. **(C)** Densitometría de la señal obtenida para cada una de las líneas celulares de las PTM de la histona H4 analizadas. Los resultados se muestran normalizados con respecto a la señal obtenida de hTERT-HPNE. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *P<0.1, **P<0.05, ***P<0.01 o ****P<0.001, comparado con hTERT-HPNE.

En conclusión, en el caso de las PTMs estudiadas para la histona H4, encontramos que al menos 4 de sus lisinas están hiperacetiladas (K5, K8, K12 y K16) y que al menos la monometilación de la arginina 3 de la histona H4 parece estar presente únicamente en los tumores de PDAC en donde k-RAS esta mutado.

Alteración en los niveles de enzimas modificadoras de la cromatina en PDAC

Tomando en cuenta los resultados obtenidos previamente en donde se observa que hay una alteración en los niveles globales de PTM tanto de la histona H3 como de la histona H4, nos preguntamos si esto podría deberse a que las enzimas encargadas de adicionar o eliminar estas PTMs también se encontraran alteradas. Es decir, podría haber la posibilidad de que el incremento en la acetilación de las lisinas pudiera deberse a que las HATs estuvieran incrementadas o a que las HDACs estuvieran disminuidas. Todo esto podría repercutir en incrementar los niveles de acetilación observados en PDAC. Para probar esta hipótesis se realizaron ensayos de WB para analizar los niveles de expresión de específicamente dos HDACs: la HDAC3, deacetilasa de la clase 1 encargada de deacetilar los residuos H3K9, H3K18, H4K5, H4K8, H4K12 y H4K16, y la SIRT1, deacetilasa de la clase 3 (sirtuinas), encargada de deacetilar los residuos H3K14 y H3K16; ya que algunos de estos residuos (H3K9, H3K18, H4K12, H4PanAc), se encuentran modificados en las líneas celulares analizadas en este trabajo.

Mediante ensayos de WB empleando extractos proteicos totales de las líneas celulares y los anticuerpos para las histonas HDAC3 y SIRT1, se encontró que los niveles de estas dos enzimas se encuentran elevadas en las líneas celulares de PDAC en comparación con hTERT-HPNE (Figura 11A), siendo estadísticamente significativos los niveles de la SIRT1 entre la línea celular PANC-1 y la línea celular hTERT-HPNE ($P=0.0381$). Una de las características de estas enzimas modificadoras es que necesitan ser activadas por diferentes señales en el citoplasma para poder translocarse al núcleo y ejercer su acción sobre la cromatina. Por esta razón se realizó un fraccionamiento celular y posteriormente se realizaron los WBs correspondientes para estas enzimas. Encontrándose que la HDAC3 presenta niveles altos tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción nuclear de todas las líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular normal hTERT-HPNE (Figura 11B), por lo que la acción que está ejerciendo esta HDAC en el núcleo puede ser fundamental para el proceso carcinogénico, pero esto no explica los niveles de hiperacetilación observados, sugiriendo que posiblemente otras HDACs pidieran tener un papel sobre el proceso de deacetilación de las histonas.

En lo que respecta a la deacetilasa SIRT1, también se observaron niveles elevados en la fracción citoplasmática de las líneas de PDAC en comparación con hTERT-HPNE, y de manera muy interesante se observó una disminución en los niveles de esta HDAC en la fracción nuclear tanto de las líneas celulares de cáncer de páncreas como en la línea celular control (Figura 11B). Este último resultado podría explicar los niveles de acetilación elevados en los residuos H3K14 ya que al encontrarse incrementada la SIRT1 en el citoplasma la HDAC no podría eliminar los grupos acetilos presentes en la K16 de la histona H4 en el núcleo.

Sin embargo, los resultados obtenidos para estas dos HDAC no explican el aumento de acetilación de histonas encontrado en las 3 líneas de

PDAC, por lo que cabe la posibilidad de que otras HDAC pudieran estar participando o bien que las HDACs, aunque estén presentes no tengan actividad catalítica. Sin embargo, también existe la posibilidad de que las HDACs no sean las enzimas implicadas en el incremento de las acetilaciones observadas en el extremo amino de las histonas, sino que las enzimas modificadoras de la cromatina encargadas de agregar los grupos acetilo también se encuentren alteradas. Sin embargo, esta es una pregunta que queda abierta ya que pese a varios esfuerzos para identificar a la acetilasa de histonas GCN5 el anticuerpo con el que trabajamos no nos dio señales claras.

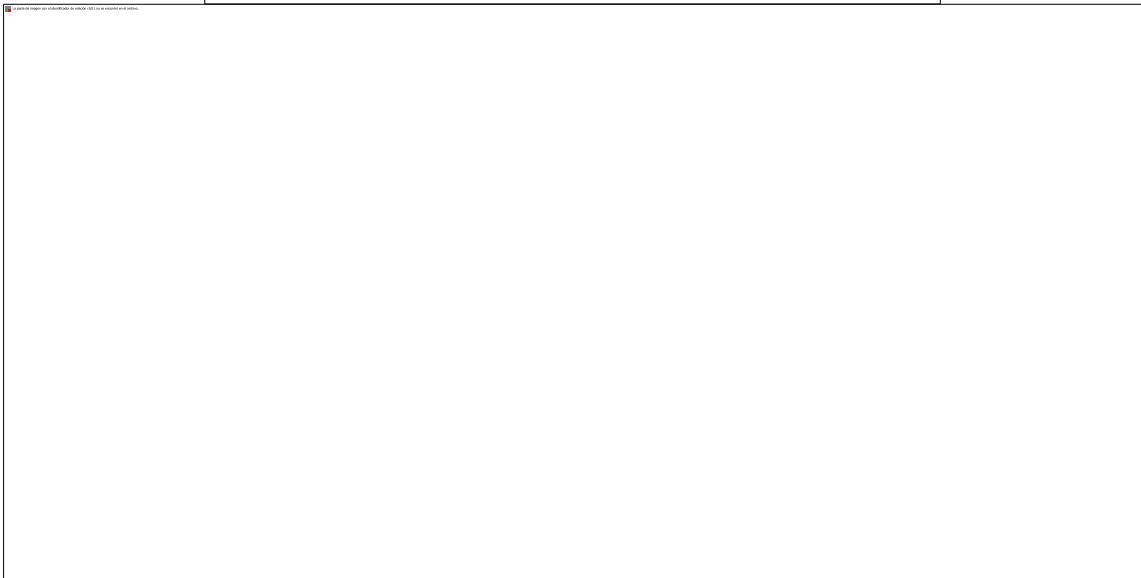
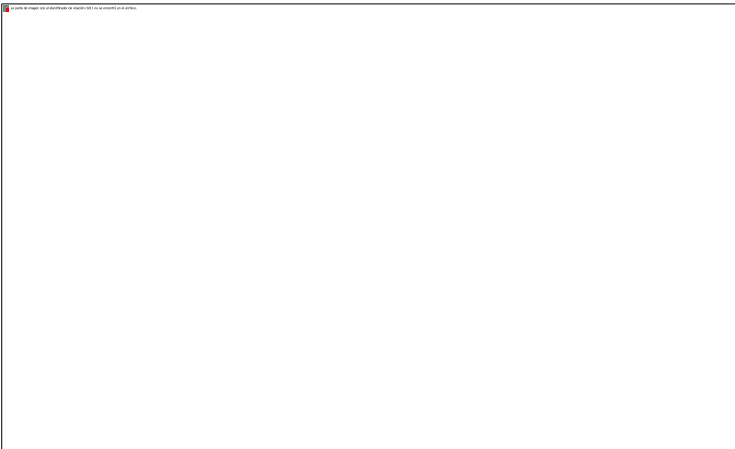


Figura 11. Alteración de los niveles de las enzimas modificadoras HDAC3 y SIRT1 en PDAC. (A) Evaluación de los niveles de HDAC3 y SIRT1 en la línea celular normal y las líneas celulares de cáncer de páncreas mediante WB. El anticuerpo anti-GAPDH fue utilizado como control de carga. Se cargaron aproximadamente 10 ug de proteína por pozo. **(B)** Evaluación de los niveles de HDAC3 y SIRT1 en las fracciones citoplasmáticas y fracciones nucleares de la línea celular normal y las líneas celulares de cáncer de páncreas mediante WB. Los anticuerpo anti-GAPDH y anti-H3-COOH fueron utilizados como controles de carga. Se cargaron aproximadamente 10 ug de proteína por pozo.

Discusión

El Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC) es uno de los cánceres más letales a nivel mundial, ocupa el 12vo lugar en incidencia y el 7mo en mortalidad. En México, las estadísticas más recientes (del año 2010), reportan una incidencia del 3.2%, además de ocupar el 9no lugar en mortalidad, con un índice de fatalidad del 96%, lo cual quiere decir que casi el 100% de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad muere en un periodo menor a un año (Aldaco F., 2012). El pronóstico de los pacientes con cáncer de páncreas no es muy bueno, ya que solo el 26% de los pacientes diagnosticados presenta una sobrevida de 1 año, mientras que el 5% de los pacientes llegan a tener una sobrevida de 5 años (Neureiter D., *et al.*, 2014). La causa de este mal pronóstico se debe principalmente a la ausencia de síntomas patognomónicos en etapas tempranas de la enfermedad, evitando que los métodos de diagnóstico convencionales puedan servir para detectar esta enfermedad, debido a la poca sensibilidad y especificidad que estos presentan (Hezel A., *et al.*, 2006; American Cancer Society, 2015). Esta ineficiencia en el diagnóstico trae como consecuencia que el tumor primario realice metástasis a órganos distantes como el hígado y los pulmones, desencadenando una enfermedad debilitante y progresiva la cual se caracteriza por la presencia de anorexia, dolor general, astenia y caquexia (Donghui Li, *et al.*, 2004). Desafortunadamente, el 80% de los diagnósticos se realiza en etapas metastásicas, en las cuales no existe tratamiento efectivo, ya que la quimioterapia nunca llega a ser curativa en estos estadios, y es por esto que solo se realiza como herramienta paliativa, es decir, se utiliza para reducir los efectos causados por los síntomas antes mencionados, además de que primeramente es necesario valorar la administración de la quimioterapia ya que puede llegar a presentar efectos tóxicos propios (Donghui Li, *et al.*, 2004).

La estrategia planteada para mejorar el pronóstico de estos pacientes es la detección temprana de esta enfermedad, con lo cual se busca evitar las

complicaciones clínicas presentes en estadios avanzados. Para esto es necesario conocer los eventos moleculares que se encuentran regulando la progresión de la enfermedad, ya que al conocer estos, así como las redes moleculares en las cuales participan, se tendría un panorama más claro sobre la enfermedad, además de poder desarrollar potenciales herramientas tanto de diagnóstico como de tratamiento.

Múltiples alteraciones a nivel genético y epigenético se encuentran regulando la progresión del PDAC, desde las etapas preneoplásicas (PanINs) hasta las etapas invasivas (Lomberk G.A. and Urrutia R., 2015). Estas alteraciones regulan mecanismos como la EMT, la quimiorresistencia, la resistencia a la apoptosis, la formación de los nichos prometastásicos, la supresión de la respuesta inmune, entre otros (Yachida S. and Iacobuzio-Donahue C.A., 2013; Evans Quilichini and Cécile Haumaitre. 2015), los cuales evidentemente favorecen la progresión del cáncer pancreático. Específicamente los mecanismos epigenéticos, contribuyen de manera importante en el desarrollo del PDAC, ya que muchos de estos se encuentran alterados en este cáncer (Evans Quilichini and Cécile Haumaitre., 2015), por lo que su comprensión podría ayudar a entender mejor la biología del PDAC y, por consiguiente, nos permitirá desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento.

En el PDAC, los mecanismos epigenéticos más estudiados hasta la fecha han sido la metilación del DNA, los ncRNA, específicamente las diferentes poblaciones de miRNAs, así como algunas PTM de la histona H3 y H4, y algunas enzimas modificadoras de la cromatina (Evans Quilichini and Cécile Haumaitre, 2015, Norihiso Sato, 2006; Omura N. and Goggings M., 2009; Martínez-Romero C., *et al.*, 2009; Lu j., *et al.*, 2005; Dvinge H., *et al.*, 2013), y se ha demostrado su participación en la progresión del PDAC.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento de los mecanismos epigenéticos que se encuentran alterados en el PDAC nos dimos a la tarea de analizar la expresión global de algunas PTM de las histonas H3 y H4 de las cuales aún no existen reportes en PDAC. También analizamos la expresión de algunas

enzimas modificadoras de la cromatina las cuales a su vez pudieran estar regulando las PTM analizadas. Además, decidimos estudiar los niveles de la variante de histonas H2A.Z, la cual corresponde a un mecanismo epigenético no estudiado en PDAC, esto debido a que esta variante de histonas se encuentra regulando el proceso carcinogénico en diferentes cánceres.

Líneas celulares con diferente grado histológico y molecular

El PDAC, al igual que todos los carcinomas presentan varios grados de alteraciones histológicas comparadas con el tejido normal del cual se derivó, esta propiedad es definida como grado del tumor (Devita V.T. *et al*, 2015), el cual puede repercutir en el pronóstico, así como en la respuesta a la terapia, es decir, pacientes con PDAC de grado bajo presentan un mejor pronóstico, así como una mejor respuesta a las terapias. Mientras que, pacientes con PDAC de alto grado tienen un mal pronóstico y en general son resistentes a las terapias convencionales. Además, los diferentes grados en PDAC también correlacionan con firmas de expresión génica específicas para diferentes subtipos de PDAC. Por ejemplo: el subtipo “clásico” se asocia con tumores de bajo grado y se caracteriza por la expresión de genes epiteliales y de adhesión. Por su parte, el subtipo “quasi-mesenquimal” está asociado con tumores de grado alto los cuales muestran una mayor expresión de genes mesénquimales (Collisson E.A., *et al*, 2011). Dentro de esta clasificación también se incluyen a las líneas celulares de PDAC, del subtipo “clásico” y del subtipo “quasi-mesenquimal” (Collisson E.A., *et al*, 2011).

En este trabajo nosotros decidimos utilizar líneas celulares de PDAC con diferentes grados tumorales desde el grado bajo hasta grado alto, con el fin de determinar si las alteraciones epigenéticas ocurren de manera gradual y si son específicas y diferenciales de acuerdo al grado tumoral. Es por esto que decidimos utilizar tres líneas celulares de PDAC con diferente grado tumoral (Tabla IV), las cuales fueron Capan-1, BxPC-3 y PANC-1 correspondientes a grado bajo, grado intermedio y grado alto respectivamente.

Para confirmar la estadificación de nuestras líneas celulares realizamos ensayos de WB empleando marcadores epiteliales y mesénquimales, los cuales nos permitieron confirmar los grados tumorales asignados (Figura 7), donde observamos que Capan-1 tienen niveles elevados de los marcadores epiteliales ocludina, claudina 1/4 y E-cadherina, por lo que se confirma como línea celular de bajo grado, además de tener niveles bajos de vimentina, un marcador de mesénquima. Por su parte PANC-1 presenta niveles muy reducidos de los marcadores epiteliales, mientras que presenta niveles elevados del marcador de mesénquima, vimentina, con lo que se confirma su estadificación como línea celular de alto grado. Finalmente, BxPC-3 posee niveles intermedios de los marcadores epiteliales claudina 1/4 y E-cadherina, así como niveles reducidos de ocludina y vimentina, por lo que se considera como línea celular de grado intermedio. Con respecto a esto, recientemente Diaferia y colaboradores, confirmaron mediante análisis epigenómicos y de secuenciación masiva la estadificación de ciertas líneas celulares. Adicionalmente en este trabajo se identificaron ciertos factores de transcripción que se encargan de controlar el estado de diferenciación de las líneas celulares de PDAC. Además de la regulación transcripcional ejercida por los factores de transcripción detectados, también se determinaron diferentes patrones de PTM asociados con la actividad de regiones potenciadoras (como son, la acetilación de la lisina K27 de la histona H3, y la H3K4Me1), lo cual demuestra la intercomunicación que existe entre los mecanismos genéticos y epigenéticos en la regulación del PDAC (Diaferia GR., *et al.*, 2016; Lomberk G.A. and Urrutia R., 2015). Por lo que entonces el trabajo de Diaferia proporciona una base muy importante para agrupar a las líneas celulares no solamente desde un punto de vista histológico (como el que ya había propuesto Sipos y colaboradores en el 2003), sino también de acuerdo a bases moleculares; haciendo más certero y más fácil la interpretación de los datos que se puedan obtener a partir de estas líneas celulares. Tomando en base estos dos trabajos y los resultados obtenidos en el presente proyecto los diferentes grados de tumorigenicidad para cada línea

celular son los siguientes: hTERT-HPNE (línea celular normal), Capan-1 (grado bajo), BxPC-3 (grado intermedio), y PANC-1 (grado alto).

Niveles elevados de H2A.Z en PDAC

Las variantes de histonas son reguladores clave de la cromatina, debido a su importancia en controlar procesos tales como: la segregación de cromosomas, la expresión de genes, la reparación del DNA, etc. Mediante la depresión de H2A.Z empleando siRNAs, el grupo de Tremethick en el 2004 encontró una desestabilización en las interacciones de HP1 α y regiones de la cromatina principalmente en los brazos de los cromosomas y regiones pericéntricas, esto debido a que H2A.Z controla la localización de HP1 α en estas regiones (Rangasamy D., *et al.*, 2004). Con respecto al papel en la expresión de genes, Allis y colaboradores mostraron que H2A.Z se enriquece exclusivamente en los macronúcleos transcripcionalmente activos de *Tetrahymena thermophila* (Allis CD., *et al.* 1986). Además, con ensayos de ChIP-seq, se ha determinado que H2A.Z se enriquece en los promotores de genes activos, esto en levadura y eucariontes superiores (Guillemette B., *et al.* 2005; Barski A. *et al.* 2007). Con respecto a la reparación del DNA, H2A.Z permite el remodelamiento de la cromatina adyacente a regiones con DSBs, facilitando de esta manera el reclutamiento de proteína encargadas de la reparación como BRCA1 y Ku70/80 (Xu, Y., *et al.* 2012). Por lo que entonces, alteraciones en la expresión de H2A.Z podrían contribuir de manera importante en desencadenar procesos aberrantes en el genoma, característicos del cáncer.

Un número creciente de evidencias apuntan hacia la importante participación que las variantes de histonas tienen durante el proceso carcinogénico de ciertos tumores (Vardabasso C. *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es la variante de histonas H2A.Z, la cual conserva una identidad de secuencia del 60% con respecto a la histona canónica H2A (Malik H.S. *and* Henikoff S., 2003). Hasta la fecha se conocen dos isoformas codificadas por los genes no alélicos: la H2AFZ (isoforma H2A.Z.1) y la H2AFV (isoforma H2A.Z.2), en donde esta

última puede generar por *splicing* alternativo una tercera isoforma denominada H2A.Z.2.2 (Vardabasso C. et al., 2014).

Este trabajo se convierte en el primer reporte en demostrar que existen niveles elevados de H2A.Z en PDAC (Figura 8), sumándose a la lista de varios tipos de cánceres en donde se han reportados altos niveles de expresión como por ejemplo el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga, melanoma maligno y cáncer de hígado (Valdés-Mora F., et al, 2012; Svtelis A. et al, 2010; Kim, K. et al, 2013; Vardabasso C. et al, 2015; Yang, H. D., et al, 2016). En todos estos tipos de cáncer se ha reportado que H2A.Z regula la expresión de genes involucrados en la proliferación celular, por lo que podríamos sugerir que en PDAC muy posiblemente se encuentra regulando el mismo tipo de genes.

La pregunta que surge en este punto es ¿Por qué en PDAC se presentan niveles elevados de H2A.Z? Nosotros creemos que los altos niveles de expresión de H2AZ podrían deberse al aumento en el número de copias de los genes H2AFZ o H2AFV, como ocurre en melanoma maligno. En donde por PCR cuantitativa (qPCR), determinaron que existe un incremento en el número de copias del 13% y 52% para el gen H2AFZ y H2AFV respectivamente; Por lo que este incremento correlaciona con un aumento en los niveles de los mRNA y por consiguiente en los niveles de proteína (Vardabasso C. et al, 2015). Otra posible explicación para la sobreexpresión de H2A.Z en PDAC sería la posible asociación de moléculas coactivadoras con el promotor de los genes H2AFZ o H2AFV. Ya que en el cáncer de mama la elevada expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α) correlaciona con los altos niveles de H2A.Z, y esto se debe que el receptor ER α se enriquece en el promotor del gen de H2A.Z lo cual favorece su elevada tasa transcripcional (Svtelis A. et al, 2010).

Pero ¿Cómo H2A.Z participa en el proceso carcinogénico? La forma en que H2A.Z favorece el proceso carcinogénico ha sido ampliamente reportada, encontrándose que la sobreexpresión del mRNA de H2A.Z en las células

MCF7 promueve significativamente la proliferación celular, en comparación con células que sobreexpresan a la histona canónica H2A (Svotelis A. *et al*, 2010). Esto se debe a que H2A.Z se enriquece a lo largo del TSS de genes reguladores del ciclo celular lo que favorece la elevada expresión de oncogenes como YAP1 y CCND (los cuales también se encuentran elevados en PDAC) (Kim, K. *et al*, 2013). Más recientemente y gracias al empleo de la técnica de *small hairpin RNA* (shRNA), se logró silenciar a cada una de las dos isoformas H2AFZ y H2AFV en células de melanoma maligno y se analizó el perfil transcripcional para cada caso. Interesantemente, la mayoría de los genes se encontraban regulados negativamente por ambas isoformas. Encontrándose que la isoforma H2A.Z.2 controla genes pertenecientes a reguladores del ciclo celular, principalmente de la familia E2F. Por otro lado, los genes regulados por la isoforma H2A.Z.1 corresponden a genes que participan en vías inmunológicas (Vardabasso C. *et al*, 2015), por lo que H2A.Z.2 se considera como la principal isoforma en regular la progresión de la enfermedad. En el cáncer de hígado, se determinó que la sobreexpresión de la isoforma H2A.Z.1 se encuentra regulando positivamente genes involucrados en modular el ciclo celular como CDK4, CDK6, ciclina D1 y CDK2, además de suprimir la transcripción de los reguladores negativos p21^{WAF/Cip1} y p27^{Kip1} (Yang, H. D., *et al*, 2016). De manera interesante, H2A.Z.1 también regula genes involucrados en la EMT, como fibronectina y E-cadherina (Yang, H. D., *et al*, 2016). En conjunto, todos estos reportes demuestran la participación de la variante de histonas H2A.Z en regular la carcinogénesis en diferentes órganos, regulando principalmente moduladores tanto positivos como negativos del ciclo celular. Por lo que en base a lo anterior resulta necesario realizar los ensayos necesarios en nuestro modelo de PDAC para conocer las razones moleculares por las cuales H2A.Z se encuentra sobreexpresado, así como los genes que está controlando o desregulando. Por lo que creemos que ensayos de RNA-seq en nuestras líneas celulares nos darían información del perfil transcripcional de las diferentes líneas celulares, y combinándolo con ensayos de ChIP-seq nos diría en primer lugar la firma ocupacional de H2A.Z

en el genoma, y, en segundo lugar, nos proporcionaría información de que genes están siendo regulados directamente, ya sea de manera negativa o positiva por esta variante. También resultaría interesante determinar cuál de las dos isoformas es la predominante en PDAC, ya que como se mencionó anteriormente, las dos tienen funciones no redundantes en cáncer de hígado y en melanoma maligno, es decir, se encuentran regulando diferentes procesos, favoreciendo cada una el proceso carcinogénico.

Por otro lado, no debemos olvidar que las variantes de histonas, al tener residuos de aminoácidos extras son susceptibles de sufrir PTM que no existen en las histonas canónicas (Ana Sevilla and Olivier Binda, 2014). En particular, la variante de histonas H2A.Z puede ser acetilado en los residuos de lisina K4, K7, K11, K13 y K15 presentes en el extremo amino terminal, por acción de la enzima modificadora de la cromatina TIP60, favoreciendo así la transcripción génica. También puede sufrir mono-ubiquitinaciones en los residuos de lisina K120, K121 y K125 por RING1B, así como mono-metilaciones en los residuos de lisina K4 y K7 por SETD6, lo que en conjunto favorecen la represión transcripcional (Ana Sevilla and Olivier Binda, 2014). Valdés-Mora y colaboradores, investigaron la firma ocupacional de H2A.Z y H2A.Z acetilada (acH2A.Z), en células de cáncer de próstata. Empleando ensayos de ChIP-seq determinaron que H2A.Z se enriquece en el TSS tanto de genes activos como de genes en estado “poised”, donde, específicamente la forma deacetilada se encuentra en genes “poised” y la forma acetilada (acH2A.Z), en genes activos transcripcionalmente. Este grupo también encontró que, en células cancerosas en comparación con células normales, existe una reorganización de la firma ocupacional de H2A.Z y acH2A.Z en los TSS de genes encargados de regular el proceso carcinogénico (Valdés-Mora F., *et al*, 2012).

Por todo lo anterior, es que resulta importante seguir caracterizando molecularmente las funciones que tienen los niveles de H2A.Z en PDAC, para entender de una mejor manera su papel a lo largo de la progresión de este

cáncer y su posible función en controlar la expresión de oncogenes o genes supresores de tumores.

Alteración en las PTM del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4

Hiperacetilación de histonas en PDAC

Alteraciones en las PTM de las histonas han sido asociadas con procesos de carcinogénesis y progresión de diferentes cánceres, producidas principalmente por alterar la acetilación y metilación de histonas. La expresión global de algunas PTM detectadas por IHC han servido como marcadores para predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer. Por ejemplo, Seligson y colaboradores, demostraron que un incremento de la marca epigenética H3K18Ac correlaciona positivamente con el aumento en el grado de tumor e inversamente con la recurrencia de cáncer de próstata (Seligson D.B., *et al.*, 2005). Resultados similares indican que los niveles bajos de la H3K18Ac predicen pobre supervivencia en cáncer de pulmón y de riñón (Seligson D.B., *et al.* 2009). Estos desbalances de PTM podrían estar dirigiendo la expresión aberrante de oncogenes o el silenciamiento de genes supresores de tumores favoreciendo de esta forma la progresión de la enfermedad. Con respecto a PDAC, existen cuatro estudios donde demuestran la alteración global de algunas PTM en comparación con páncreas normal (Tabla V), por los que se les consideran como potenciales biomarcadores de diagnóstico, así como posibles blancos terapéuticos (Wei Y., *et al.*, en 2008; Manuyakorn A., *et al.*, 2010; Watanabe T., *et al.*, 2012; Juliano CN., *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta toda esta información es que en este trabajo decidimos estudiar tres PTM presentes en la histona H4 no analizadas anteriormente; además de confirmar que en PDAC existe un incremento en la marca epigenética H4K12Ac la cual ha sido descrita recientemente para este tipo de cáncer en este tipo de cáncer (Juliano CN., *et al.*, 2016). La acetilación en el residuo de lisina 12 de la histona H4 ocurre en los nucleosomas presentes en el TSS, así como en los nucleosomas que se encuentran ubicados en el cuerpo

de genes transcripcionalmente activos. Además de ser una modificación muy importante para la progresión a la fase S del ciclo celular. Esta PTM presento niveles elevados en las líneas celulares de cáncer de páncreas que empleamos en este trabajo en comparación con la línea celular hTERT-HPNE (Figuras 10B y 10C), específicamente las líneas celulares Capan-1 y PANC-1 presentaron niveles por arriba de BxPC-3. Este resultado confirma los resultados de Juliano y colaboradores, quienes encontraron en biopsias de pacientes un aumento de la H4K12Ac con respecto al estadio de la enfermedad, teniendo una asociación clínica con el grado y diferenciación del tumor, así como con la sobrevida de los pacientes (Juliano CN., *et al.*, 2016).

Tabla V. Participación de algunas PTM en la sobrevida de pacientes con PDAC.

PTM	Estadio clínico	Asociación clínica	Referencia
H3K27me3 (disminución)	Una cohorte de 165 pacientes -Estadio temprano: 68.51% -Estadio avanzado: 31.48%	-Grado del tumor -Propagación a ganglios linfáticos	Wei Y., et al., 2008
H3K4me2 (disminución)	Dos Cohortes: -229 pacientes: estadios al azar	-Pobre sobrevida -Ausencia de propagación a ganglios linfáticos	Manuyakorn A., et al., 2010
H3K9me2 (disminución)	-140 pacientes: estadios I y II	-Resistencia al tratamiento	
H3K18ac (disminución)		adyuvante con 5-FU	

(Continuación) Tabla V. Participación de algunas PTM en la sobrevida de pacientes con PDAC.

PTM	Estadio clínico	Asociación clínica	Referencia
H3K4Me3 (disminución)	Una cohorte de 61 pacientes: -30 pacientes con GEM post operación	-Tumor pobremente diferenciado	Watanabe T., et al., 2012
H3K4Me2 (disminución)	-31 pacientes sin GEM	-Invasión perineural	
H3K18ac (aumento)	Una cohorte de 119 pacientes: -Estadio I: 2.5%	-Grado del tumor -Diferenciación del tumor	Juliano CN., et al., 2016
H3K9ac (aumento)	-Estadio II: 23.3%	-Pobre sobrevida	
H4K12ac (aumento)	-Estadio III: 31.7%		
	-Estadio IV: 42.5%		

De igual manera, empleando un anticuerpo que reconoce la acetilación de las lisinas K5, K18, K12 y K16 de la histona H4 (H4PanAc), encontramos un incremento en las líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular control (Figuras 10B y 10C), el cual se incrementa considerablemente en la línea celular de grado bajo (Capan-1) y empieza a decrecer conforme aumenta el grado de progresión de las líneas celulares. Este resultado nos sugiere que además del aumento en la acetilación de la lisina 12 de la histona H4 también podría haber un incremento en la acetilación de las lisinas K5, K8 o K16 de la histona H4 en PDAC, lo cual necesita ser corroborado empleando anticuerpos específicos para cada PTM. La H4K5Ac es una PTM considerada como marcador epigenético o “*epigenetic bookmarking*” (Zhao *et al.*, 2011). Esto se debe a que una vez que la lisina 5 de la histona H4 ha sido acetilada, es reconocida por el bromodominio de

BRD4, permitiendo la inmediata activación transcripcional después de la división celular (Zhao *et al.*, 2011). Por lo que un aumento de esta marca en PDAC podría estar favoreciendo una rápida transcripción de genes importantes para la carcinogénesis. Por su parte, la H4K8Ac es considerada como un PTM medular que se encuentra en promotores de genes activos (Turner, B.M., 2000), por lo que su sobreexpresión en PDAC confirmaría el papel de la acetilación en la activación de ciertos genes importantes en la biología de este cáncer. Finalmente, la H4K16Ac es un caso especial, ya que Fraga y colaboradores, empleando un amplio panel de líneas celulares y biopsias de diferentes cánceres, encontraron una reducción global de esta PTM en comparación con su contraparte normal. Esta reducción de la acetilación en la K16 ocurre en secuencias repetidas y genera una intercomunicación con la metilación del DNA, la cual también se encuentra disminuida (Fraga, M.F. *et al.*, 2005), por lo que resulta necesario determinar los niveles de esta PTM en nuestro modelo de PDAC empleando un anticuerpo específico para dicha marca, para de esta forma empezar a dilucidar los mecanismos moleculares que se encuentra regulando.

Por otro lado, Juliano y colaboradores, también reportaron un aumento en la acetilación de la H3K9Ac y H3K18Ac en pacientes con PDAC, teniendo asociación con respecto al grado y diferenciación del tumor, y con la supervivencia de los pacientes (Juliano CN., *et al.*, 2016), estos resultados también fueron confirmados en este trabajo empleando nuestras líneas celulares (Figuras 9B y 9C), donde ambas PTM se encuentran elevadas en las líneas celulares de PDAC. Para el caso de la H3K9Ac encontramos niveles elevados en Capan-1 y PANC-1 en comparación con la línea celular control (más del doble), mientras que en BxPC-3 los niveles son ligeramente menores que Capan-1 y PANC-1. Con respecto a la H3K18Ac el aumento tiende a ser directamente proporcional con respecto al grado del tumor, teniendo que Capan-1 expresa niveles ligeramente mayores que hTERT-HPNE, mientras que BxPC-3 y PANC-1 presentan aun aumento estadísticamente significativo (Figuras 9B y 9C). La H3K9Ac tiene particular importancia en la activación transcripcional, ya que se

enriquece en los promotores de genes activos, además de colocalizar con la H3K14Ac (Karmidiya, *et al.*, 2012), otra PTM determinada en este trabajo. Por su parte, la H3K18Ac, se presenta en TSS de genes activos y en estado “poised”, además se sabe que una hiperacetilación de H3K18 en regiones pericéntricas genera una acumulación aberrante de transcritos pericéntricos generando inestabilidad genómica, característica del PDAC (Tasselli L., *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo encontramos un ligero aumento de la H3K14Ac en las líneas celulares de PDAC en comparación con hTERP-HPNE (Figuras 9B y 9C), la cual es una PTM no analizada hasta la fecha en PDAC. Esta marca, se encuentra enriquecida en potenciadores activos, y en conjunto con la H3K9Ac en promotores de genes activos, por lo que el aumento de estas dos PTM podría generar una elevada transcripción de oncogenes en PDAC. Además, también se ha detectado que la H3K14Ac, en conjunto con la H3K9Me3 y H3K27Me3 están presentes en promotores de genes inactivos, lo cual podría favorecer la represión de genes con actividad supresora de tumores. Por lo que en base a todo lo anteriormente expuesto resulta necesario seguir analizando el papel que tienen estas marcas en el desarrollo y progresión del cáncer.

Queda claro que los datos publicados y los datos obtenidos en el presente trabajo indican que el estado de hiperacetilación global de las histonas puede estar teniendo un papel importante en regular la progresión del PDAC. Interesantemente, en cáncer de próstata, la hiperacetilación global de las histonas correlaciona directamente con el incremento en el grado del tumor, lo cual sugiere un aumento en la capacidad proliferativa de tumores pobremente diferenciados, relacionado directamente con una mayor actividad transcripcional (Seligson D.B., *et al.*, 2005). De manera similar en cáncer de pulmón y de riñón, el estado de hiperacetilación de histonas repercute en una baja probabilidad de supervivencia de los pacientes (Seligson D.B., *et al.*, 2009). Estos resultados nos sugieren que células pancreáticas normales tienen un estado de acetilación de histonas basal, el cual permite la correcta regulación

génica, y es solo hasta que las células pancreáticas se tornan cancerígenas que los niveles de acetilación de histonas incrementan favoreciendo de esta manera el proceso carcinogénico. Algo similar sucede en el colon, donde el nivel de acetilación de histonas es bajo en biopsias de tejido sano, mientras que en biopsias de adenocarcinomas de colon se presentan tinciones nucleares fuertes empleando anticuerpos contra histonas acetiladas (Ashktorab H., *et al.*, 2009). Este estado de hiperacetilación de histonas tanto en líneas celulares como en biopsias de PDAC podrían estar regulando importantemente la progresión de la enfermedad al modular directamente el proceso de transcripción de genes importantes para la carcinogénesis, por lo que resulta necesario analizar tanto las causas como los efectos de estos niveles elevados de acetilación.

Con respecto a las posibles causas, sabemos que las enzimas modificadoras de la cromatina como las HAT's y/o HDAC's se encuentran alteradas en diferentes cánceres. Ouaiissi y colaboradores, encontraron que los niveles de mRNA y proteína de la HDAC7 se encuentran considerablemente elevados en PDAC, mientras que, en pancreatitis crónica, cistoadenoma seroso e IPMN los niveles se encontraban reducidos (Ouaïssi M. *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que esta HDAC se encuentra regulando de manera muy importante la actividad de genes específicos de la biología del PDAC, los cuales, no se encuentran en otras patologías del mismo órgano. Por otra parte, también se ha determinado que la HDAC2 se encuentra sobreexpresada en PDAC, en donde regula negativamente la expresión de la proteína pro-apoptótica NOXA, confiriendo de esta manera resistencia a la quimioterapia (Fritsche P., *et al.*, 2009).

En este trabajo demostramos la sobreexpresión de una HDAC de la clase I, HDAC3, y una HDAC de la clase III, SIRT1 (Figura 11). Específicamente, encontramos un aumento en la cantidad de HDAC3 en las fracciones citoplasmática y nuclear de las líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular control, lo cual sugiere que esta HDAC se encuentra regulando la deacetilación de diferentes blancos dentro y fuera del

núcleo (Figuras 11B). La sobreexpresión de HDAC3 en PDAC fue determinada en 2014 por Jiao y colaboradores, donde empleando líneas celulares y biopsias de PDAC demuestran su sobreexpresión. Además, demuestran su papel como regulador oncogénico ya que se encuentra regulando la proliferación, migración e invasión celular, además de incrementar la resistencia a drogas anti-cancerígenas (Jiao, F., *et al.*, 2014). Interesantemente, mediante ensayos de CHIP, encontraron que HDAC3 se encuentra regulando el silenciamiento génico de p53, p27 y Bax al regular la deacetilación de H3K9 (Jiao, F., *et al.*, 2014). Este estudio demuestra claramente que los procesos propios de la biología del PDAC están regulados por alteraciones epigenéticas como PTM, las cuales, a su vez están siendo reguladas por enzimas modificadoras de la cromatina. Estos estudios demuestran el papel de los mecanismos epigenéticos en regular una amplia variedad de procesos en PDAC como son la progresión de las lesiones precursoras hacia el mismo cáncer pancreático, así como la capacidad invasiva de las células cancerosas, entre otras características.

De manera interesante en este trabajo encontramos que en la fracción nuclear de las líneas celulares de PDAC la SIRT1 se encuentra disminuida en comparación con hTERT-HPNE, lo cual explicaría los niveles elevados de la H3K9Ac encontrada en las líneas celulares de cáncer, ya que esta marca es un blanco de esta sirtuina. Los niveles elevados de la SIRT1 habían sido reportados anteriormente en PDAC, donde demuestran mediante ensayos de IHC la sobreexpresión de esta proteína en tumores pobremente diferenciados, llegando a ser considerada como un predictor de baja sobrevida (Stenzinger, A., *et al.*, 2013). Si bien los bajos niveles de la SIRT1 en la fracción nuclear de las líneas celulares de PDAC explica el aumento en la H3K9Ac en las mismas líneas celulares, no explica los niveles elevados de las restantes PTM encontradas. Además, el haber encontrado niveles elevados de la HDAC3 en las fracciones nucleares no descarta la posibilidad de que otras HDAC's puedan estar regulando la hiperacetilación en las histonas encontradas en las

líneas celulares de PDAC, por lo que es necesario seguir analizando la causa de este fenómeno de hiperacetilación de histonas.

Alteración global de la metilación de histonas en PDAC

También encontramos un aumento en la H3K27Me3 (Figuras 9B y 9C), una marca asociada con represión transcripcional, la cual es generada por la subunidad del PRC2, EZH2. Wei y colaboradores, reportaron una disminución de esta PTM en biopsias de PDAC. Este estudio se realizó en una cohorte de 165 pacientes (Tabla V), de los cuales, solo el 24% presentó tinción nuclear empleando la técnica de IHC con el anticuerpo α H3K27Me3 (Wei Y., *et al.*, 2008). Si bien, solo el 24% de los pacientes presentaron tinción con esta marca, resulta obvio que no se encuentra completamente ausente, sugiriendo que a pesar de la heterogeneidad del tumor existen poblaciones o subclonas celulares que presentan niveles relativamente elevados de la H3K27Me3. Para justificar esto es necesario mencionar el trabajo de Yachida y Iacobuzio-Donahue, quienes secuenciaron el exoma de tumores metastásicos y prometastásicos, encontrando dos diferentes grupos de mutaciones. Las mutaciones fundadoras, presentes solamente en tumores primarios y consideradas esenciales para la iniciación del PDAC; y las mutaciones progresoras, presentes exclusivamente en tumores metastásicos y necesarias justamente para generar las características invasoras del cáncer pancreático (Yachida, S. and Iacobuzio-Donahue, C., 2013). Estos resultados sugieren la existencia y generación de diferentes subclonas celulares como resultado de las diferentes alteraciones a nivel genético y epigenético. Esta elevada heterogeneidad de subclonas celulares favorecería aspectos importantes como la progresión del tumor, la resistencia a múltiples tratamientos, así como la recaída de la enfermedad. Es por esto que nosotros sugerimos que nuestras líneas celulares de PDAC, pudieron provenir de una subpoblación celular caracterizada por los elevados niveles de H3K27Me3. Además, este resultado correlacionaría perfectamente con lo reportado por Ougolkov y colaboradores, quienes encontraron que EZH2, la histona metil-transferasa encargada de

general la H3K27Me3, se encuentra sobreexpresada en pacientes con PDAC con pobre supervivencia, contribuyendo principalmente con la proliferación de las células cancerosas (Ougolkov A., *et al.*, 2008). La presencia de esta PTM resulta importante ya que es una marca generada por PRC2 la cual se encuentra regulando el silenciamiento de genes muy importantes en la diferenciación y destino celular, por lo que resulta necesario realizar ensayos de ChIP-seq para conocer que regiones de la cromatina se encuentran enriquecidas con esta marca y de esta forma saber cómo repercute en el fenotipo de las células de PDAC.

Con respecto a las PTM de la histona H4, encontramos un incremento en la H4R3Me1 en las líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular normal (figuras 10B y 10C). Esta PTM está asociada con activación transcripcional por receptores hormonales nucleares, además de ser una marca importante para la subsecuente acetilación de las histonas H3 y H4 por la HAT p300 (Lorenzo and Bedford., 2011). Por lo que en PDAC podría ser importante en la generación del estado de hiperacetilación descrito anteriormente, lo cual permitiría la expresión aberrante de genes con capacidad carcinogénica. El papel de la H4R3Me1 no ha sido muy estudiado en cáncer, por lo que resulta necesario seguir caracterizando esta PTM, así como la enzima modificadora de la cromatina encargada de generarla, es decir, las proteínas arginina metil-transferasas 1 y 6 (PRMT1/6), y los procesos de la biología del PDAC en los que está implicada. Finalmente, la H4R3Me1 presentó niveles disminuidos en las líneas celulares de cáncer así como en la línea celular hTERT-HPNE (Figuras 10B y 10C). En mamíferos esta PTM está relacionada con activación transcripcional ya que se encuentra enriquecida en las regiones promotoras de genes activos. Esta marca es generada por la PRMT5/7 (Lorenzo and Bedford., 2011).

Si bien, hasta el momento hemos logrado identificar alteraciones globales de PTM de las histonas H3 y H4 en las líneas celulares de cáncer de páncreas en comparación con la línea celular normal hTERT-HPNE, es necesario seguir estudiando desde un punto de vista molecular cómo repercuten estas

alteraciones en PDAC. Ensayos de ChIP acoplados a secuenciación masiva nos dará la información necesaria para conocer las regiones de la cromatina que estos se encuentran regulado, además de conocer si entre estas mismas PTM y variantes de histonas existe una intercomunicación que favorezca el desarrollo del cáncer de páncreas.

Aspectos clínicos de las alteraciones epigenéticas en PDAC.

La expresión diferencial de estas PTM de las histonas H3 y H4, así como de la expresión de HDAC3 y SIRT1, y los altos niveles de la variante de histonas H2A.Z además de explicar muchos de los mecanismos que llevan a la transformación neoplásica del páncreas pueden tener también un alto potencial como biomarcadores de diagnóstico y/o blancos terapéuticos. La ventaja de poder considerar estas moléculas como posibles biomarcadores son varias: 1) pueden ser detectados en muestras de biopsias líquidas como sangre, saliva, orina o jugo pancreático, lo cual hace innecesario el uso de protocolos invasores como son la toma de biopsias de tejido transformado, los cuales ponen en riesgo el bienestar del paciente (Falasca M., 2012), 2) muchas de estas moléculas tienen una elevada estabilidad en los fluidos debido principalmente a que estas se presentan dentro de vesículas extracelulares con bicapa lipídica, conocidas como exosomas, los cuales, además de contener una gran cantidad de proteínas pueden contener también fragmentes de ácidos nucleicos como DNA, mRNAs, lncRNAs y miRNAs (Melo S., *et al.*, 2015), y 3) mediante las herramientas actuales pueden ser detectados desde cantidades muy pequeñas (10 ng), lo cual resulta en técnicas más sensibles y específicas (Pai P., *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Fukushima y colaboradores, donde detectan en jugo pancreático de pacientes con PDAC por MSP fragmentos de PENK y CDKN2A/p16 metilado (Fukushima N., *et al.*, 2003), demuestran claramente el potencial uso de estos mecanismos epigenéticos como biomarcadores. También existen estudios donde detectan miRNAs en muestras de sangre como el reporte generado por Matthaei y colaboradores, quienes proponen el

uso de la detección de los miR-196 y miR-217 para el diagnóstico del PDAC, con la ventaja de poder descartar una pancreatitis crónica (Matthaei H., *et al.*, 2012). Con respecto a los exosomas, en 2015, Melo y colaboradores, reportaron la detección específica de los exosomas en sangre de pacientes con PDAC, los cuales tienen una proteína en su bicapa lipídica conocida como GPC1. La detección de estos exosomas-GPC1⁺ tienen una especificidad y una especificidad del 100% en muestras de pacientes con PDAC, con la ventaja de que aparecen desde etapas muy tempranas del proceso carcinogénico, es decir, en PanINs (Melo S., *et al.*, 2015). Este estudio nos sugiere fuertemente que existe la posibilidad de encontrar proteínas como histonas o variantes de histonas dentro de los exosomas liberados por las células cancerígenas, lo cual, hace posible que las alteraciones epigenéticas encontradas en este trabajo puedan ser detectadas en biopsias líquidas. Con respecto a esto, en 2015, Bauden y colaboradores, empleando un ensayo tipo ELISA conteniendo anticuerpos específicos para H3K4Me2, 5-metilcitosina (5-MC), mH2A1.1, H2A.Z y el antígeno CA 19-9, así como muestras de plasma sanguíneo de pacientes con PDAC, logran alcanzar una sensibilidad del 92% y una especificidad del 90% para el diagnóstico de esta enfermedad (Bauden, M., *et al.*, 2015). Estos resultados confirman claramente la posibilidad de utilizar a los reguladores epigenéticos encontrados en este trabajo como potenciales biomarcadores de PDAC. Por lo que es necesario realizar más estudios empleando muestras de tejido pancreático normal, así como muestras de pacientes con PDAC para corroborar si nuestros resultados pueden ser extrapolados a pacientes mexicanos. De ser así, el siguiente paso sería buscar estas mismas moléculas en fluidos de pacientes e individuos sanos con el fin de ver si pueden ser detectadas en biopsias líquidas, lo cual sería de vital importancia, ya que se está evitando la toma de muestras sólidas.

Conclusiones

1. Existen cambios epigenéticos graduales y específicos de acuerdo a la progresión de las líneas celulares.
2. Los niveles de la variante de histonas H2A.Z se incrementan gradualmente con respecto al grado de progresión de las líneas celulares de PDAC. Datos preliminares realizados en biopsias de pacientes con PDAC sugieren que esto también ocurre en pacientes con PDAC. Por lo que entonces H2A.Z podría participar en el desarrollo del PDAC
3. En las líneas celulares de cáncer de páncreas existe una alteración en el patrón global de PTM de las histonas H3 y H4. Específicamente existe un aumento en la acetilación de los residuos H3K9, H3K14, H3K18 y en los residuos H4K5, H4K8, H4K12 y H4K16. Lo cual nos sugiere que el estado de hiperacetilación de las histonas puede estar regulando la expresión aberrante de transcritos importantes para la carcinogénesis pancreática.
4. Además, estos estados de hiperacetilación de histonas pueden deberse a la alteración de los niveles de enzimas modificadoras de la cromatina, como la disminución gradual de los niveles de expresión de la HDAC3 y la ausencia de la SIRT1 en el núcleo de las líneas celulares de PDAC.
5. El aumento gradual de la H3K27Me3 y el aumento específico de la H4R3Me1 en PDAC sugieren que el incremento de todas estas marcas podría estar regulando varios genes implicados en el desarrollo del PDAC.

Desde un punto de vista clínico, estos datos podrían servir como punto de partida para poder considerar a estos reguladores epigenéticos posibles biomarcadores de diagnósticos y/o terapéuticos para el PDAC.

Perspectivas

Confirmar los resultados obtenidos de la variante de histonas H2A.Z, así como de algunas PTM de las histonas H3 y H4 empleando biopsias de pacientes de PDAC mediante la técnica de IHC.

Realizar ensayos de CHIP-seq para determinar el perfil ocupacional de los diferentes reguladores epigenéticos en PDAC.

Realizar ensayos funcionales para determinar los mecanismos celulares que se encuentran regulando estos reguladores epigenéticos.

Bibliografía

Aghdassi A., et al. (2012). Reclutment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut*, 61: 439-448.

Aldaco F. (2012). Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *Gaceta Mex Onc*, 11 (6): 371-379.

Alessandra Di Lorenzo and Mark T. Bedford. (2011). Histone arginine methylation. *Epigenetics*. 7; 2024-2031

Allis CD, Richman R, Gorovsky MA, Ziegler YS, Touchstone B, Bradley WA, Cook RG. (1986). Hv1 is an evolutionarily conserved H2A variant that is preferentially associated with active genes. *J Biol Chem*. 261:1941–1948

American Cancer Society. (2014). Cáncer de páncreas. American Cancer Society. Sitio Web: <http://www.cancer.org>.

Ana Sevilla and Olivier Binda. (2014). Post-translational modifications of the histone variant h2az. *Stem Cell Research*, 12; 289–295.

Ashktorab H, Belgrave K, Hosseinkhah F, et al. (2009). Global histone H4 acetylation and HDAC2 Expression in colon adenoma and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 54; 2109–2117.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 129:823–837.

Bauden, M., Pamart, D., Ansari, D., Herzog, M., Eccleston, M., Micallef, J., ... Andersson, R. (2015). Circulating nucleosomes as epigenetic biomarkers in pancreatic cancer. *Clinical Epigenetics*, 7, 106. <http://doi.org/10.1186/s13148-015-0139-4>

Broers JL, Raymond Y, Rot MK, Kuijpers H, Wagenaar SS, Ramaekers FC. (1993). Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *Am J Pathol.* 143:211–20

Campbell S., et al. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 17: 1395-1413.

Cantley L. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296: 1655-1657.

Chiara Vardabasso, Alexandre Gaspar-Maia, Dan Hasson, Sebastian Pünzeler, David Valle-Garcia, Tobias Straub, Eva C Keilhauer, Thomas Strub, Joanna Dong, Taniya Panda, Chi-Yeh Chung, Jonathan L Yao, Rajendra Singh, Miguel F Segura, Barbara Fontanals-Cirera, Amit Verma, Matthias Mann, Eva Hernando, Sandra B Hake, Emily Bernstein. (2015). Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma. *Mol Cell* 1; 75-88.

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.

Coradeghini R, Barboro P, Rubagotti A, Boccardo F, Parodi S, Carmignani G, et al. (2006). Differential expression of nuclear lamins in normal and cancerous prostate tissues. *Oncol Rep.* 15:609–13.

Danny Rangasamy, Ian Greaves and David J Tremethick. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 650 – 655

Dechat T. et al. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *GENES & DEVELOPMENT* 22, 832-853.

Delpu Y., et al. (2011). Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Current Genomics*, 12: 15-24.

Diaferia GR, Balestrieri C, Prosperini E, Nicoli P, Spaggiari P, Zerbi A, Natoli G (2016) Dissection of transcriptional and cis-regulatory control of differentiation in human pancreatic cancer. *EMBO J* 35: 595 – 617

Donghui Li, et al. (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* 363; 1049–1057

Dvinge H., et al. (2013). The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature*, 497: 378-382.

Edderkaoui, M., Xu, S., Chheda, C., Morvaridi, S., Hu, R., Grippo, P., Mascariñas, E., Principe, D., Knudsen, B., Xue, J., Habtezion, A., Uyeminami, D., Pinkerton, K., & Pandol, S. (2016). HDAC3 mediates smoking-induced pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7; 7747-7760.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. (2009). Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors and patient outcome. *Cancer Res.* 69; 3802–3809.

Eser S., et al. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 111: 817-822.

Falasca M. (2012). Biomarkers, epigenetics and pancreatic cancer. *J Mol Biomark Diagn*, 3(5)

Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., et al. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37, 391-400.

Frampton A., et al. (2014). MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology*, 146(1): 268-277.

Fritsche P., et al. (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut*, 58: 1399-1409.

Fritsche P., et al. (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut*, 58: 1399-1409.

Fujii S., et al. (2008). Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *J Biol Chem*, 283: 17324-17332.

Fukushima N., et al. (2003). Aberrant methylation of suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) gene in pancreatic ductal neoplasms. *Br J Cancer*, 89: 338-343.

Guillemette B, Bataille AR, Gevry N, Adam M, Blanchette M, Robert F, Gaudreau L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol*. 2005;3:e384.

Gwen A. Lomberk and Raul Urrutia. (2015). The triple-code model for pancreatic cancer. *Surg Clin N Am* 95, 935-952

Habbe N., et al. (2009). MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther*, 8: 340-346.

Hayes J., et al. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 20(8): 460-469.

Hezel A., et al. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, 20: 1218-1249.

Holoch D. and Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *NATURE REVIEWS* 16; 71-84

Hu H. et al. (2013). Significance of Notch1 signaling pathway in human pancreatic development and carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, 21; 242–247

Hua, S., Kallen, C. B., Dhar, R., Baquero, M. T., Mason, C. E., Russell, B. A., ... White, K. P. (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone

variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology*, 4, 188.

Jiao, F., Hu, H., Yuan, C., Jin, Z., Guo, Z., Wang, L., & Wang, L. (2014). Histone deacetylase 3 promotes pancreatic cancer cell proliferation, invasion and increases drug-resistance through histone modification of P27, P53 and Bax. *International Journal of Oncology*, 45, 1523-1530.

Juliano CN., et al. (2016). H4K12 and H3K18 Acetylation Associates With Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 24, 337-334.

Juliano CN., et al. (2016). H4K12 and H3K18 Acetylation Associates With Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 24, 337-334.

Karamitopoulou E., et al. (2010). Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer. *Eur J Cancer*, 46: 1438-1444.

Karmodiya, K., Krebs, A.R., Oulad-Abdelghani M., Kimura, H., Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics*. 13:424.

Kim, K., Punj, V., Choi, J., Heo, K., Kim, J.-M., Laird, P. W., & An, W. (2013). Gene dysregulation by histone variant H2A.Z in bladder cancer. *Epigenetics & Chromatin*, 6, 34.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15:680-5.

Li C., et al. (2013). Enhancer of zeste homolog 2 silences microRNA-218 in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells by inducing formation of heterochromatin. *Gastroenterology*, 144: 1086-1097.

Li, L., Du, Y., Kong, X., Li, Z., Jia, Z., Cui, J., ... Xie, K. (2013). Lamin B1 Is a Novel Therapeutic Target of Betulinic Acid in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(17), 4651–4661.

Lim SO, Park SJ, Kim W, Park SG, Kim HJ, Kim YI, et al. (2002). Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 291:1031–7.

Lomberk G.A. and Urrutia R. (2015). The Triple-Code Model for Pancreatic Cancer: Cross Talk Among Genetics, Epigenetics, and Nuclear Structure. *Surg Clin North Am* 5; 935-952

Lu j., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834-838.

Maitra A. and Hruban R. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*, 3: 157-188.

Malik H.S. and Henikoff S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, 11; 882-891.

Manuyakorn A., et al. (2010). Cellular Histone Modification Patterns Predict Prognosis and Treatment Response in Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: Results From RTOG 9704. *Journal of Clinical oncology* 28, 1358-1365.

Manuyakorn A., et al. (2010). Cellular Histone Modification Patterns Predict Prognosis and Treatment Response in Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: Results From RTOG 9704. *Journal of Clinical oncology* 28, 1358-1365.

Martínez-Romero C., et al. (2009). The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*, 219: 205-213.

Matthaei H., et al. (2012). miRNA biomarkers in cyst fluid augment the diagnosis and management of pancreatic cyst. *Clin Cancer Res*, 18: 4713-4724.

Mehdi Ouaiïssi, Igor Sielezneff, Ricardo Silvestre, Bernard Sastre, Jean-Paul Bernard, Joelle Simony Lafontaine, Marie José Payan, Laetitia Dahan, Nicolas Pirrò, Jean François Seitz, Eric Mas, Dominique Lombardo, Ali Ouaiïssi (2008). High Histone Deacetylase 7 (HDAC7) Expression Is Significantly Associated with Adenocarcinomas of the Pancreas. *Ann Surg Oncol*. 15; 2318-2328

Metzker M. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 31-46.

Moriyama T., et al. (2009). MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferations, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther*, 8: 1067-1074.

Moss SF, Krivosheyev V, de Souza A, Chin K, Gaetz HP, Chaudhary N, et al. (1999). Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut*. 45:723-9

Neureiter D., et al. (2014). Epigenetics and pancreatic cancer: Pathophysiology and novel treatment aspects. *World J Gastroenterol*, 20 (24): 7830-7848.

Nomoto S., et al. (2008). Adverse prognosis of epigenetic inactivation in RUNX3 gene at 1p36 in human pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 98: 1690-1695.

Omura N. and Goggings M. (2009). Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2: 310-326.

Ouaiïssi M., et al. (2008). High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. *Ann Surg Oncol*, 15: 2318-2328.

Ougolkov A., et al. (2008). Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res*, 14: 6790-9796.

Ougolkov A., et al. (2008). Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res*, 14: 6790-9796.

Pai P., et al. (2013). Prospects of miRNA-based therapy for pancreatic cancer. *Curr Drug Targets*, 14(10): 1101-1109.

Pancreatic Cancer Database. (2015). miRNAs alterations. Pancreatic Cancer Database. Sitio Web: <http://pancreaticcancerdatabase.org/>

Philomena G. (2011). P53 how crucial is its role in cancer? *Int J Curr Pharm Res*, 3(2): 19-25.

Rincón-Arano H. and Recillas-Targa F. (2008). La arquitectura nuclear y su dinámica. *REB*, 27(4): 130-137.

Santos-Rosa H., et al. (2009). Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(1): 17-22.

Sato N. and Goggins M. (2006). The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancrear Surg*, 13: 286-295.

Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, et al. (2009). Global levels of histone modification predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol*, 174; 1619–1628.

Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. (2005). Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*, 435; 1262–1266.

Se-Ryeon Kim, Kee-Beom Kim, Yun-Cheol Chae, Jin Woo Park, Sang-Beom Seo. (2016). H3S10 phosphorylation-mediated transcriptional regulation by Aurora kinase A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 469: 22-28

Sherwood L. (2011). *Fisiología humana: de las células a los sistemas*. México: Cengage Learning.

Song W., et al. (2010). Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci*, 101: 1754-1760.

Sonia A. Melo, Linda B. Luecke, Christoph Kahlert, Agustin F. Fernandez, Seth T. Gammon, Judith Kaye, Valerie S. LeBleu, Elizabeth A. Mittendorf, Juergen Weitz, Nuh Rahbari, Christoph Reissfelder, Christian Pilarsky, Mario F. Fraga, David Piwnica-Worms and Raghu Kalluri. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177–182

Soto-Sedano J. and López-Carrascal C. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2): 101-113.

Stenzinger, A., Endris, V., Klauschen, F., Sinn, B., Lorenz, K., Warth, A., Weichert, W. (2013). High SIRT1 expression is a negative prognosticator in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 13, 450.

Strickler S., et al. (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing Project for a nonmodel plant species. *American Journal of Botany*, 99: 257-266.

Subirana J.A. (1973). Studies on the thermal denaturation of nucleohistones. *J Mol Biol* 5; 363-386.

Sun S, Xu MZ, Poon RT, Day PJ, Luk JM. (2010). Circulating Lamin B1 (LMNB1) biomarker detects early stages of liver cancer in patients. *J Proteome Res*. 9:70–8.

Svetelis A, Gevry N, Grondin G, Gaudreau L. (2010). H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells. *Cell Cycle*, 9; 364–370

T. Watanabe, *, S. Morinaga, M. Akaike, M. Numata, H. Tamagawa, N. Yamamoto, M. Shiozawa, S. Ohkawa, Y. Kameda, Y. Nakamura, Y. Miyagi. (2012). The cellular level of histone H3 lysine 4 dimethylation correlates with

response to adjuvant gemcitabine in Japanese pancreatic cancer patients treated with surgery. *EJSO*, 38; 1051-1057

Tasselli L, Xi Y, Zheng W, Tennen RI, Odrowaz Z, Simeoni F, Li W, Chua KF. (2016). SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nat Struct Mol Biol*, 5; 434-440.

Tjarda van Heek N., et al. (2002). Telomere shorting is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *American Journal of Pathology*, 161(5): 1541-1547.

Toll A., et al. (2010). Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum pathol*, 41: 1205-1209.

Torrisani J., et al. (2009). Let-7 microRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther*, 20: 831-844.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. (1979) *PNAS* 76:4350-4354.

Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845.

Valdés-Mora, F., Song, J. Z., Statham, A. L., Strbenac, D., Robinson, M. D., Nair, S. S., ... Clark, S. J. (2012). Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Research*, 2; 307–321

Vardabasso C, Hake SB, Bernstein E. (2015). Histone variant H2A.Z.2: A novel driver of melanoma progression. *Mol Cell Oncol*, 16;3 (2)

Vardabasso, C., Hasson, D., Ratnakumar, K., Chung, C.-Y., Duarte, L. F., & Bernstein, E. (2014). Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 3; 379–404

- Vincent A., et al. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet*, 378: 607-620.
- Wang J., et al. (2009). MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prec Res*, 2: 807-813.
- Wei Y., et al. (2008). Loss of Trimethylation at Lysine 27 of Histone H3 Is a Predictor of Poor Outcome in Breast, Ovarian, and Pancreatic Cancers. *Molecular Carcinogenesis* 47, 701-706.
- Wei Y., et al. (2008). Loss of Trimethylation at Lysine 27 of Histone H3 Is a Predictor of Poor Outcome in Breast, Ovarian, and Pancreatic Cancers. *Molecular Carcinogenesis* 47, 701-706.
- William T. Dauer and Howard J. Worman. (2009). The Nuclear Envelope as a Signaling Node in Development and Disease, *Developmental Cell*. 17: 626-638
- Wong H. and Lemoine N. (2009). Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6(7): 412-422.
- Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., & Price, B. D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Molecular Cell*, 48(5), 723–733.
- Yachida S. and Iacobuzio-Donahue C.A. (2013). Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene* 45; 5253-5260
- Yachida, S., & Iacobuzio-Donahue, C. (2013). Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene*, 32(45), 10.1038/onc.2013.29.
- Yan H., et al. (2010). MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells. *Hum Gene Ther*, 21: 1723-1734.
- Yang G. and Yang X. (2010). Smad4-mediated TGF- β signaling in tumorigenesis. *Int J Biol Sci*, 6(1): 1-8.
- Yang, H. D., Kim, P.-J., Eun, J. W., Shen, Q., Kim, H. S., Shin, W. C., ... Nam, S. W. (2016). Oncogenic potential of histone-variant H2A.Z.1 and its regulatory

role in cell cycle and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer. *Oncotarget*, 10, 11412–11423

Yan-Ming Xu, Ji-Ying Du and Andy T. Y. Lau. (2014). Posttranslational modifications of human histone H3: An update. *Proteomics* 2014, 14, 2047–2060

Zhang L., et al. (2011). Roles and mechanisms of microRNAs in pancreatic cancer. *World J Surg*, 35(8): 1725-1731.

Zhao, R., Nakamura, T., Fu, Y., Lazar, Z., and Spector, D.L. (2011). Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nat. Cell Biol.* 13, 1295-1304.