



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Caracterización Inmunológica y Contribución Funcional de la Proteína
RhoGDI3 y sus Moléculas Blanco, RhoG y RhoB, en Células Humanas
Normales y Cancerosas Pancreáticas**

TESIS

Que presenta

M. en C. Mercedes Piedad de León Bautista

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Director de tesis

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Doctor en Ciencias Miguel Ángel Vargas Mejía. Durante la realización de esta tesis, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

-A Dios por caminar siempre a mi lado.

-A Dagoberto Fidel de León Chávez y Micailina Bautista Vásquez, mis padres, por todo su amor y cariño incondicional.

-Al Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía por haberme aceptado en su grupo maravilloso de trabajo.

-A la Biol. Exp. Ma de Jesús Almaráz Barrera por sus consejos y asesoría técnica.

-Al los Drs. en C.: Nicolás Villegas Sepúlveda, Michael Schnoor, Angélica Olivo Díaz, Mauricio Salcedo Vargas, Alejandro Manuel García Carrancá, María del Carmen Cárdenas Aguayo, Leopoldo Santos Argumedo, por las sugerencias y observaciones que contribuyeron para las mejoras de este proyecto.

-Dra.en C. Rocío Thompson Bonilla, por la subvención para lograr este proyecto.

-Al Biol. Raúl Bonilla Moreno por sus consejos y asesoría técnica.

-Al Dr. en C. Hector Romero por sus consejos y asesoría técnica.

-A la QFB. María del Carmen Domínguez Robles por sus consejos y asesoría técnica.

-A la QFB. Leticia Alemán por por sus consejos y asesoría técnica.

-A María de Jesús Maqueda Villegas y Sandra Medina Dávila por su maravilloso trabajo secretarial.

A Lourdes Mónica Marrufo Olivo por su apoyo técnico en el laboratorio 2 del departamento de Biomedicina Molecular.

-A mis compañeros de laboratorio Araceli Hernández, Eva Luna, Ricardo Uribe, Fernando, Flores, Ma de Jesús Almaráz, Diana Casique, Dora Vélez, Lorena Gorgonio, Pedro Cruz, Pao y Lourdes, Monica, por consejos, apoyo y momentos divertidos.

-A todos mis amigos por toda la comprensión, cariño, amistad y paciencia. Los quiero.

-A mi familia, Bautista y de León por darme su confianza, comprensión y templanza para seguir adelante. Los amo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1. Anatomía y Fisiología Pancreática	9
1.1 Anatomía del Páncreas	9
1.2 Histología del Páncreas	10
1.3 Fisiología pancreática	13
2. ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO	14
2.1 Definición	14
2.2 Aspectos epidemiológicos	14
2.3 Factores de Riesgo	15
2.3.1. Edad	16
2.3.2 Factores Hereditarios	16
2.3.4 Fumar	17
2.3.5 Obesidad	17
2.3.6 Diabetes Mellitus	17
2.3.7 Pancreatitis crónica	18
2.3.8 Factores dietéticos	18
2.3.9 Otros factores	18
3. Fisiopatología del cáncer de páncreas	19
3.1 Microambiente tumoral	21
4. Clasificación histológica de los tumores de Páncreas	22
5. Cuadro clínico	24
6. Diagnóstico por imagen	24
7. Estadificación del carcinoma pancreático	25
8. Tratamiento	26
9. Mecanismos moleculares del adenocarcinoma pancreático PDAC	30
9.1 Mutaciones en KRas	31
9.2 TGF- β	32
9.3 Control de daño al DNA	33
9.4 Regulación de la transición de la fase G ₁ /S	33
9.5 Vía de señalización Hedgehog	33
9.6 Vía de señalización Notch	34
9.7 Apoptosis	34
9.8 Vías de señalización mediadas por GTPasas: proteínas reguladoras RhoGDI'S y sus implicaciones biológicas	35
9.8.1 El papel de las proteínas RhoGDI1	35
9.8.2 Papel de las proteínas RhoGDI2	37
9.8.3 La importancia biológica de la proteína RhoGDI3	47
10. Moléculas RhoGDI's, como reguladores negativos de las GTPasas Rho	50
10.1 Proteínas RhoGDI's Humanas	50
10.2 Estructura de las RhoGDI's	52
10.3 Funciones de las RhoGDI's humana	53
10.3.1 Regulación de las funciones de las RhoGDI's	54
11. JUSTIFICACIÓN	58
12. HIPOTESIS	59
13. OBJETIVO GENERAL	60
14. OBJETIVOS PARTICULARES	61
15. EXTRATEGÍA EXPERIMENTAL	62
16. RESULTADOS	85
17. DISCUSIÓN	128
18. CONCLUSIONES	135
19. PERSPECTIVAS	136
20. REFERENCIAS	137

21. ANEXO	145
------------------------	-----

FIGURAS

Figura 1. Localización anatómica del páncreas humano	9
Figura 2. Sistema de conductos pancreáticos	10
Figura 3. Microarquitectura pancreática	11
Figura 4. Esquema del páncreas que muestra acinos secretorios, sus tipos celulares y los islotes de Langerhans	12
Figura 5. Corte histológico de páncreas humano	12
Figura 6. Tipos de cáncer	15
Figura 7. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México.	15
Figura 8. Histología: neoplasia intraepitelial pancreática (PanINC's)	20
Figura 9. Modelo de progresión PanIN's	20
Figura 10. Imagen macroscópica de adenocarcinoma pancreático	23
Figura 11. Análisis por imagen de una neoplasia mucinosa intraepitelial ductal.	25
Figura 12. Vías de señalización alteradas en el adenocarcinoma pancreático	30
Figura 13. Principales vías de señalización de KRas	31
Figura 14. Vía de señalización del factor de crecimiento tumoral beta (TGF-β).....	33
Figura 15. Vía de señalización Hedgehog	34
Figura 16. Vía de señalización apoptótica	35
Figura 17. Inmunoblots y análisis densitométrico, demostrando la desregulación de la expresión de las proteínas KIF14 y RhoGDI2 en las línea celular T3M4	47
Figura 18. Modelo de la transferencia de las proteínas Rho a las membranas por acción de las RhoGDI's	52
Figura 19. Estructura de las proteínas RhoGDI's	53
Figura 20. Modelo de regulación de la proteína RhoGDI SUMOilada en la regulación del citoesqueleto durante la movilidad celular.....	57
Figura 21. Diagrama de flujo de la extrategia experimental.....	62

TABLAS

<i>Tabla 1. Síndromes neoplásicos hereditarios y su asociación con el adenocarcinoma pancreático</i>	16
<i>Tabla 2. Clasificación de neoplasias pancreáticas</i>	22
<i>Tabla 3. Clasificación del carcinoma pancreático, con la estadificación</i>	25
<i>Tabla 4. Clasificación del carcinoma pancreático. Estadio anatómico/grupos de pronóstico</i>	26
<i>Tabla 5. Inmunoprecipitación utilizando la proteína RhoGDI2-Flag, denotando la presencia de la cinasa Src.</i>	42
<i>Tabla 6. Líneas celulares pancreáticas humanas.</i>	63
<i>Tabla 7. Oligonucleótidos sintéticos para obtención del shRNA de RhoGDI3. Secuencias R1, R2 y R3.</i>	74
<i>Tabla 8. Oligonucleótidos sintéticos para la obtención de la secuencia "scramble", Ck.</i>	74
<i>Tabla 9. Grado de inmunorreactividad de la proteína RhoGDI3 en tejido pancreático</i>	104
<i>Tabla 10. Grado de inmunorreactividad de la GTPasa RhoG en tejidos pancreáticos</i>	105
<i>Tabla 11. Grado de inmunorreactividad de la GTPasa RhoB en tejidos pancreáticos</i>	105

ABSTRACT

RhoGDI's proteins have been implicated in several human cancers; changes in its expression levels have shown pro or anti-tumorigenic effects. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is a complex pathology, with poor prognosis, most patients die shortly after diagnosis. Efforts have been focused on understanding the role of RhoGDI's in PDAC, in particular, RhoGDI1 and RhoGDI2. However, the role of RhoGDI3 has neither been studied in relation to cancer nor to PDAC. Here, we characterized the expression and functionality of RhoGDI3 and its target GTPases, RhoG and RhoB, in pancreatic cell lines from normal pancreatic tissue, or late stages of PDAC, and compared it to human biopsies. Through immunofluorescences, pulldown assays, subcellular fractionation and immunohistochemistry, we found a reduction in RhoGDI3 expression in PDAC late stages, and this reduction correlates with tumor progression and aggressiveness. Despite the reduction in the expression of RhoGDI3 in PDAC, we found that RhoB was underexpressed while RhoG was overexpressed, suggesting that cancerous cells keep their capacity to activate this pathway, thus these cells may be eager to the stimuli needed to proliferate and become invasive unlike normal cells. Surprisingly, we found nuclear localization of RhoGDI3 in non-cancerous pancreatic cell line and normal pancreatic tissue biopsies, which could open the possibility of novel nuclear functions for this protein, impacting gene expression regulation and cellular homeostasis. To elucidate the possible functions of RhoGDI3 in cancer maintainance, performing knockdown and overexpression assays found that increased RhoGDI3 protein increases the migration rate and proliferation; nevertheless, the cells do not become anchorage-independent, suggesting and predicting that overexpression of RhoGDI3 is an important molecule to increase the migration rate. Thus, en conclusion, high levels of RhoGDI3 protein increase the malignant behaviour.

RESUMEN

Las proteínas RhoGDI's han sido implicadas en diferentes tipos de cancer; cambios en su expression han mostrado efectos pro y anti tumorigénicos. El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es una patología muy compleja, caracterizada por un pronóstico desalentador, debido a que muchos de los pacientes mueren poco tiempo después del diagnóstico. Grupos de investigación se han enfocado en el entendimiento de la implicación de las proteínas RhoGDI's en el PDAC, particularmente las proteínas RhoGDI1 y RhoGDI2; sin embargo, el involucro de la proteína RhoGDI3 en relación con cáncer, particularmente PDAC, no han sido estudiadas. En este trabajo, caracterizamos la expresión y funcionalidad de la proteína RhoGDI3 y sus moléculas blanco, RhoG y RhoB, en líneas celulares pancreáticas y en tejido pancreático humano normal y canceroso. Mediante ensayos de inmunofluorescencia, pulldown, fraccionamiento subcelular e inmunohistoquímica, encontramos una reducción de la expression de la protein RhoGDI3 en células cancerosas pancreáticas, correlacionando esta reducción con la progresión y agresividad tumoral. A pesar de la reducción de la expression de la proteína RhoGDI3, hallamos que la proteína RhoB se encuentra desregulada mientras que la GTPasa RhoG sobreexpresada, sugiriendo que las células cancerosas mantienen su capacidad de activar esta vía de señalización mediada por RhoG, por lo que las células cancerosas se encuentran ávidas de los estímulos necesarios para proliferar e invadir, a diferencia de las células normales. Un hallazgo novedoso, fue la localización nuclear de la protein RhoGDI3 en las línea celular no cancerosa y en tejido normal pancreático humano; lo cual, abre la posibilidad de nuevas funciones nucleares para esta molécula, que podrían impactar en la regulación génica y homeostasis celular. Finalmente, para elucidar las posibles implicaciones funcionales de la protein RhoGDI3 en el mantenimiento del cáncer, mediante ensayos de *knockdown* y sobreexpresión, encontramos que el incremento de los niveles de la proteína RhoGDI3 aumenta la migración celular en cultivos en una dimensión; sin embargo, la capacidad para formar colonias independientes de anclaje se vió limitada, lo cual sugiere que la sobreexpresión de la proteína RhoGDI3 es una molécula importante para mantener el comportamiento invasivo *in vivo*. En conjunto, estos datos permiten proponer que altos niveles de expresión de la proteína RhoGDI3 contribuyen a mantener un fenotipo maligno en la línea celular PANC-1.

1. INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y Fisiología Pancreática

1.1 Anatomía del Páncreas

El páncreas es un órgano glandular retroperitoneal, con una orientación transversal. Se encuentra localizado en la parte superior y media del abdomen, detrás del estómago, extendiéndose desde el asa C del duodeno hasta el hilio del bazo (Fig. 1). En promedio, la longitud de este órgano es de 20cm con un peso promedio de 90g, que produce dos tipos de secreciones, una endocrina y otra exocrina. Este órgano, está constituido por multitud de estructuras glandulares mixtas, unidas entre sí por tejido conectivo. El páncreas se distingue por tener 3 porciones: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza, se encuentra rodeada por el duodeno, siendo la parte más voluminosa de todo el órgano; mientras que el cuerpo y la cola se prolongan hacia el hipocondrio izquierdo, donde la parte terminal de la cola entra en contacto con el bazo [1, 2]

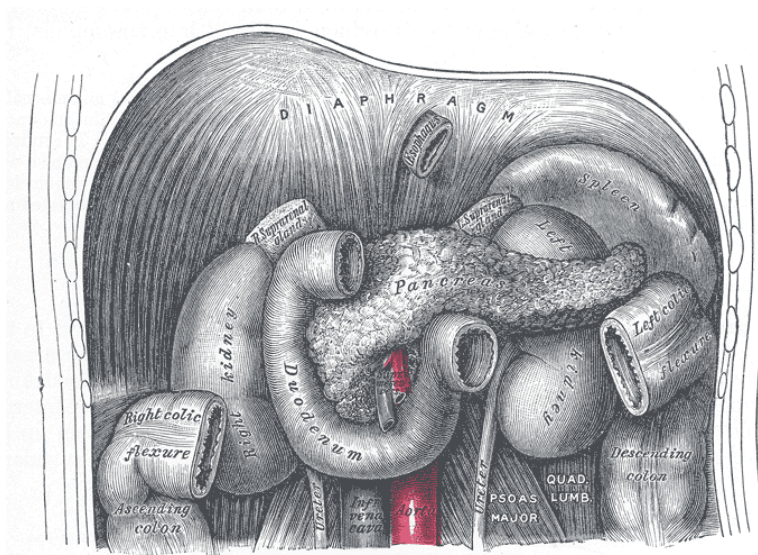


Figura 1. Localización anatómica del páncreas humano. Tomado de Gray's anatomy.

El conducto pancreático principal, ó también denominado conducto de Wirsung, se inicia en la cola del páncreas y continúa hacia la derecha entre los bordes superior e inferior del órgano, recogiendo la secreción del resto de los canalículos intrapancreáticos. En la cabeza del páncreas el conducto principal gira hacia abajo y se une al colédoco a nivel de la papila

ó ampolla de Vater. Existe otro conducto excretor, el conducto menor ó de Santorini, que se origina del conducto pancreático principal y se extiende desde la cabeza del páncreas hasta el duodeno [3] (Fig.2).

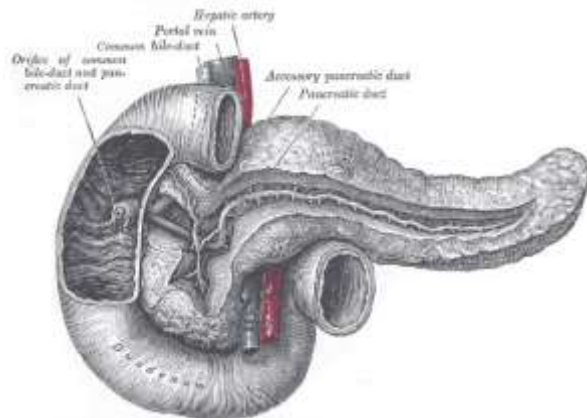


Figura 2. Sistema de conductos pancreáticos. Tomado de Gay's Anatomy [1]

La irrigación del páncreas, está constituida por los circuitos arteriales anterior y posterior, que se dirigen a la cabeza del páncreas; cada uno de estos circuitos, se derivan de la arteria gastroduodenal y la arteria mesentérica superior; mientras que las porciones del cuerpo y la cola del páncreas, son irrigados por las arterias esplénicas y gastroepiplóica izquierda. El drenaje linfático del páncreas, se encuentra constituido por los ganglios del hilio esplénico, ganglios pancreáticos superiores, gástricos superiores y hepáticos, ganglios pancreáticos inferiores, mesocólicos, mesentéricos y aórticos. La inervación del páncreas, deriva de los nervios espláncnicos mayores, menores y más bajos a través de los ganglios y el plexo celiaco [1].

1.2 Histología del Páncreas

El tejido pancreático está formado por tejido glandular exocrino y tejido glandular endocrino. El tejido glandular exocrino, está constituido por gran cantidad de células glandulares, dispuestas radialmente alrededor de un conducto excretor, formando acinos, los cuales, secretan sustancias tales como amilasas pancreáticas que drenan hacia un sistema de conductos excretores. Una característica primordial en la histología del páncreas, es la presencia de un cúmulo de células en la parte media de un acino, a estas

células se les conoce como centroacinares; este tipo celular, se define como estructuras terminales del sistema de conductos, invaginadas dentro del acino. Cada una de estas estructuras, está conformada por un grupo irregular de células secretoras que drenan hacia conductos pequeños, los cuales drenan hacia conductos de mayor calibre. Los conductos pequeños están revestidos por epitelio cúbico simple que se transforma en cúbico estratificado en los conductos de mayor calibre. Los acinos pancreáticos aparecen formados por células de forma piramidal o cuboidales que proyectan sus vértices hacia la luz de un conducto pequeño (Fig. 3). Fenotípicamente, este tipo celular presenta sus núcleos en una región basal y están rodeados por un citoplasma es rico en retículo endoplásmico rugoso; las regiones apicales de las células contienen números gránulos secretores de zimógenos [4].



Figura 3. Microarquitectura pancreática. El páncreas es un órgano glandular que consta de dos componentes, exocrino y endocrino. Los conductos pancreáticos se encuentran revestidos por células acinares, las cuales son células cuboidales rodeadas por células tipo fibroblastos, conocidas como células estelares pancreáticas. Tomado de Boland y Thayer[5].

El sistema de conductos secretores inicia con los conductos más pequeños conocidos como intercalares, revestidos por epitelio cúbico aplanado, estos conductos intersectan con la luz de los acinos, encontrándose en el centro de estos, células centroacinares, que se reconocen por un núcleo pobremente teñido con eosina y con su citoplasma; posteriormente, forman el conducto intralobulillar, el cual está constituido por varios conductos intercalares, para posteriormente, constituir el conducto interlobulillar revestido por epitelio cilíndrico, para finalmente dar lugar al conducto de Wirsung y Santorini (Fig. 4)

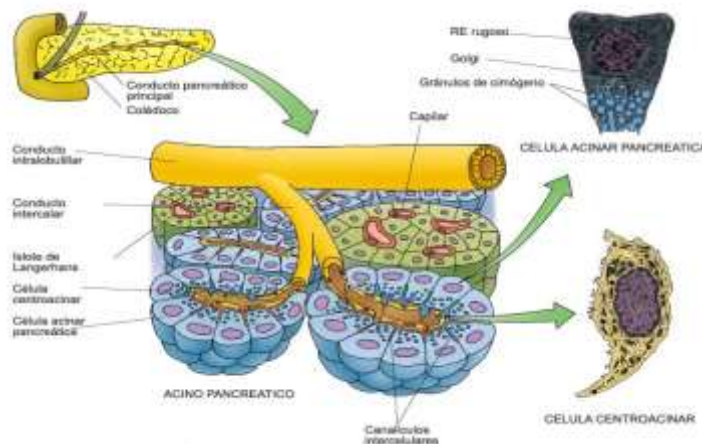


Figura 4. Esquema del páncreas que muestra acinos secretorios, sus tipos celulares y los islotes de Langerhans. Tomado de Heiken [6].

El tejido glandular endocrino pancreático, se encuentra constituido por estructuras denominadas Islotes de Langherhans, que son acúmulos de células de 3 tipos; alfa, beta y delta, que secretan glucagón, insulina y somatostatina respectivamente. Estos islotes se encuentran sostenidos por una red fina de reticulina y numerosos capilares porosos. Las células secretoras son de 3 tipos, las cuáles no son distinguibles con la tinción típica de hematoxilina y eosina, siendo una clasificación funcional más que morfólica (Fig.5)[7].

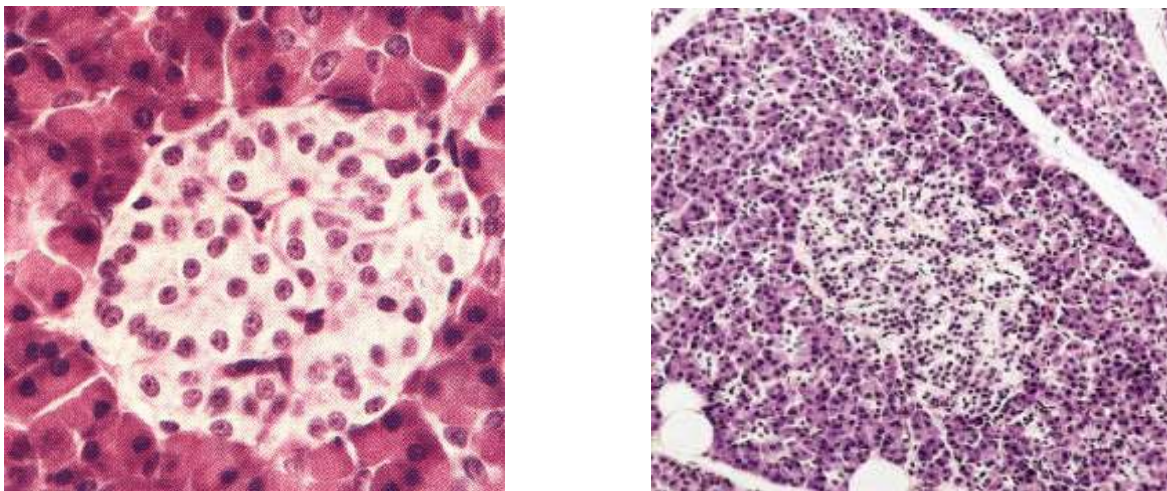


Figura 5. Corte histológico de páncreas humano, que muestra acinos secretorios y un islote de Langerhans. Tomado de Gartner [4].

1.3 Fisiología pancreática

El páncreas, tiene dos funciones, una exocrina y otra endocrina.

1.3.1 Páncreas exocrino

La función exocrina de páncreas consiste en la secreción de jugo pancreático hacia el duodeno, con el objetivo de favorecer la digestión de los alimentos que provienen del estómago. Los mecanismos reguladores de la función exocrina pancreática se activan cuando las células de la mucosa intestinal son estimuladas con el cambio de pH ácido en el estómago; estas células secretan hormonas que viajan por el torrente sanguíneo y llegan al páncreas, dando lugar a una cascada de secreción de iones bicarbonato y enzimas que intervienen en la digestión. Estas enzimas son la amilasa, lipasa, tripsina, quimiotripsina, éstas dos últimas son secretadas como zimógenos o en formas inactivas, es decir, tripsinógeno y quimiotripsinógeno, los cuales se activan al entrar en contacto con el jugo intestinal; otras enzimas son las carboxipeptidasas y nucleasas. Todas estas enzimas participan en la digestión de glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [8, 9].

1.3.2 Páncreas endocrino

La función endocrina del páncreas se lleva a cabo en los islotes de Langherhans, donde se produce insulina, glucagon y somatostatina, participando en el metabolismo y anabolismo de la glucosa en sangre o glicemia. La hormona insulina es secretada por las células beta, en respuesta a un aumento de glucosa en sangre, siendo sus dos acciones principales, estimular la captación de glucosa en diversos tipos celulares como las musculares y disminuir el nivel de glucosa en sangre. La enzima glucagon, secretada por las células alfa, tiene una respuesta contraria al de la insulina, es decir, es anabólica, ya que aumenta los niveles de glucosa en sangre, al estimular la formación de este carbohidrato a partir del glicógeno almacenado en los hepatocitos. Por último, la somatostaina es una hormona neurotransmisora secretada por las células delta, cuya característica funcional es inhibir la liberación de la hormona de crecimiento, así como, de la insulina, glucagon e incluso ella misma [2, 8].

2. ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

2.1 Definición

El páncreas es una glándula que lleva a cabo diversos procesos fisiológicos, tales como la homeostasis de la glucosa en sangre y la secreción de enzimas digestivas; sin embargo, en el área que compete a la oncología, los procesos fisiopatológicos como el cáncer de páncreas suelen también desarrollarse. El cáncer pancreático suele clasificarse en cáncer de linaje endocrino y de linaje exocrino; siendo de todos ellos, el adenocarcinoma pancreático ó también conocido como cáncer pancreático (PDAC), el tumor más común en este órgano [5].

El adenocarcinoma pancreático (PDAC) es conocido por sus características histológicas, genéticas y fenotipo celular. Histológicamente, está constituido por células neoplásicas que muestran una diferenciación glandular o ductal, así como un alto grado de desmoplasia celular; este estroma está conformado por miofibroblastos, linfocitos, proteínas de la matriz extracelular (ECM) tales como colágeno y tejido pancreático no neoplásico, como los islotes de Langerhans. La biología de esta enfermedad se distingue por su temprana diseminación incluso cuando el tumor primario es aun pequeño y la capacidad por desarrollar resistencia a los tratamientos quimioterápicos y radiológicos [10].

2.2 Aspectos epidemiológicos

Incidencia y prevalencia a nivel mundial y en México de PDAC

A nivel mundial, el carcinoma pancreático ocupa la posición 13^a de todos los tipos de cáncer. La dificultad de diagnosticar esta enfermedad en etapas tempranas coloca a este tipo de cáncer en el 8° tipo de patología con un alto grado de mortalidad (Fig. 6) [11, 12]. Para el año del 2008, la incidencia a nivel mundial de carcinoma pancreático fue del 84% y 80% para hombres y mujeres respetivamente [13]. Para el año 2015, globalmente habrían 367,411 casos nuevos y 359,335 defunciones (IARC, GLOBOCAN 2012, <http://globocan.iarc.fr>).

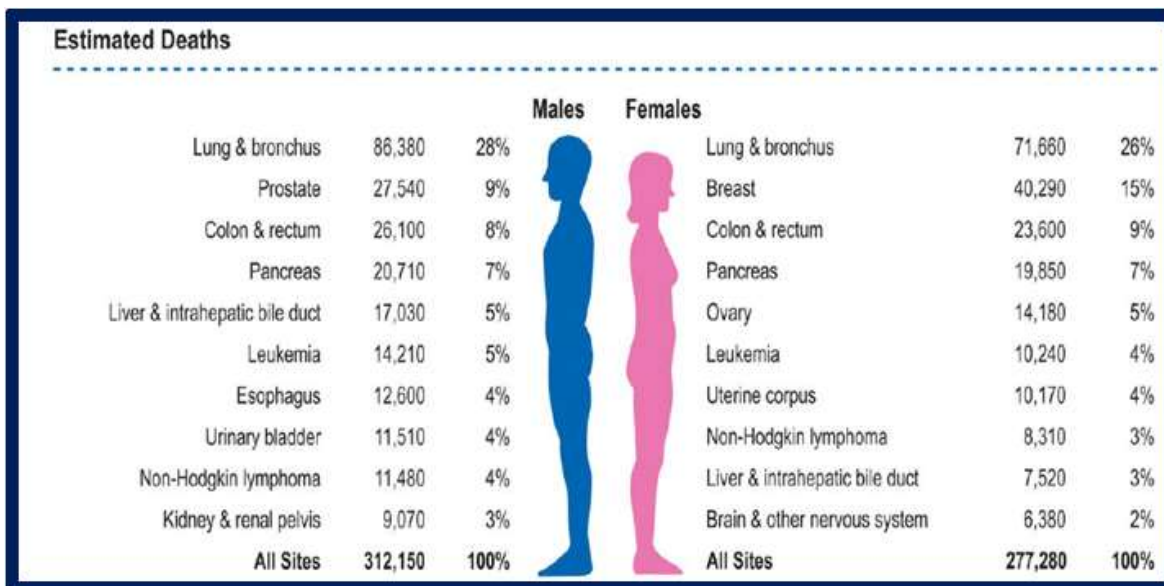


Figura 6. Tipos de cáncer estimados por sexo en los Estados Unidos para 2015 [11].

En México, la evolución de la tasa de mortalidad por tumor maligno de páncreas, ha ido a la alta, triplicando el número de muertes y representando en promedio el 4.4% del total de muertes por tumores malignos y el 0.5% de las defunciones generales; para el año 2008, las mujeres representan la mayor tasa de mortalidad por cáncer de páncreas que los hombres, donde el 22% de las defunciones se da en el grupo de 55 a 64 años de edad y el 62% se presenta en el grupo mayor de 65 años (Fig. 7). El cáncer de páncreas representa un problema de salud pública en nuestro país, principalmente en los estados de Distrito Federal, Coahuila y Baja California (SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Junio 2011).

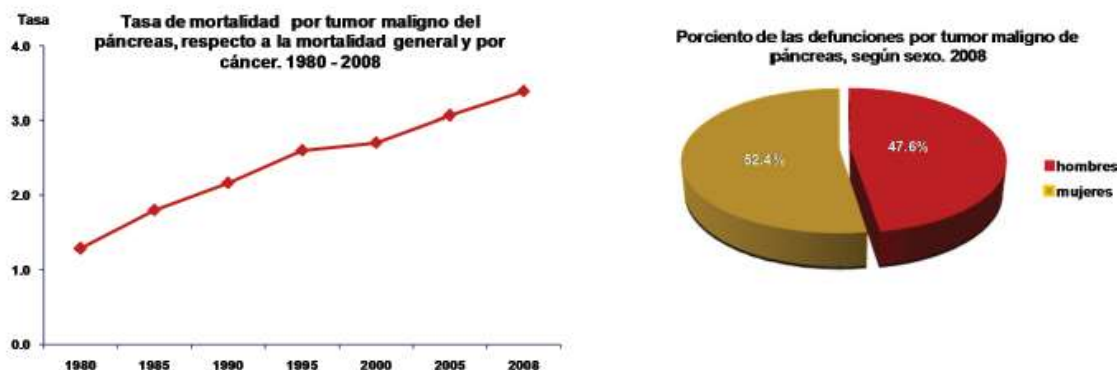


Figura 7. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Junio 2011. Tomado de SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/

2.3 Factores de Riesgo

Diversos factores de riesgo han sido relacionados con la patogénesis del PDAC, tales como la edad o diversos factores hereditarios. En muchos de los casos, los factores de riesgo no predicen ni previenen la enfermedad, lo cual hace urgente explorar la relación entre estos y el PDAC; así como, la identificación de grupos de alto riesgo.

2.3.1. Edad

La edad es el factor de riesgo mejor establecido como factor predictor de cáncer pancreático en cuanto a incidencia y mortalidad. El riesgo de cáncer pancreático es bajo durante las primeras tres décadas de la vida, sin embargo, se incrementa rápidamente después de la quinta década, alcanzando el pico máximo de entre las 6^o y 7^o década, con una edad promedio de 72 años [14, 15].

2.3.2 Factores Hereditarios

El cáncer pancreático hereditario representa aproximadamente el 7% de todos los tipos de cáncer de páncreas. El cáncer pancreático hereditario puede formar parte de síndromes neoplásicos hereditarios o bien, en asociación con pancreatitis hereditaria o fibrosis quística (Tabla 1).

Tabla 1. Síndromes neoplásicos hereditarios y su asociación con el adenocarcinoma pancreático.

Patología	Alteraciones genéticas	Asociación con Cáncer Pancreático
Mama-ovario	Mutación BRCA1/2, BRCA2 involucrado en la reparación del DNA	17% de pacientes con antecedentes de cáncer pancreático familiar y 7% de pacientes con cáncer pancreático esporádico.
Síndrome de Petz-Jeghers	Autosómico dominante. Mutaciones del gen supresor de tumor LKB1/STK11	Predisposición. No determinado
Li-Fraumeni	Mutaciones en el gen <i>p53</i>	Desarrollo de Adenocarcinoma pancreático en la adultez

Cáncer de colón hereditario no polipósico	Autosómico dominante	Predisposición. No determinado
Poliposis adenomatosa familiar	Autosómico dominante. Mutación en el gen supresor de tumor <i>APC</i>	Predisposición
Pancreatitis hereditaria	Algunos casos indeterminados. Mutación en el gen PRSS1. Mutación del gen CFRT.	Riesgo acumulado de cáncer pancreático, 50 a 60% mayor que lo esperado
Cáncer pancreático familiar	No determinado	Pacientes con historia familiar de cáncer pancreático tienen 2 veces más riesgo de cáncer pancreático

2.3.4 Fumar

Hoy día, se ha estimado que aproximadamente el 5% de los casos de cáncer pancreático son causados por el tabaquismo, ya que se ha demostrado que al administrar por vía parenteral N-nitroaminas ó N-nitroso, sustancias derivadas del tabaco, por largos periodos de tiempo en animales de experimentación, estos carcinógenos son metabolizados a elementos electrófilos, siendo capaces de interaccionar de manera inmediata con el DNA, dando lugar a una codificación y activación errónea de oncogenes; todo esto, corroborado con la detección de compuestos del tabaco en el jugo pancreático [16].

2.3.5 Obesidad

La obesidad abdominal es probablemente una causa de cáncer pancreático, debido a que la obesidad central se ha asociado con intolerancia a la glucosa y además, es un factor de riesgo para desarrollar Diabetes Mellitus; de tal manera que, los aumentos de insulina en sangre podrían fungir como mecanismos a través de los cuales, se aumenta el riesgo de padecer cáncer pancreático. En la ACSPS II Nutrition Cohort, hombres y mujeres quienes reportaron ganancia de peso a nivel central, mostraron tener un riesgo relativo de cáncer pancreático de 1.45 (95% IC, 1-02-2.07) comparados con los hombres y mujeres, quienes reportaron una ganancia de peso periférica [17].

2.3.6 Diabetes Mellitus

Una de las patologías implicadas como factor de predisposición de cáncer pancreático, es la Diabetes Mellitus, ya que la hiperglucemia inducida por cáncer pancreático puede ocurrir incluso 24 meses antes del diagnóstico de cáncer pancreático; por tal motivo, esta enfermedad se ha considerado como un marcador para la detección temprana de carcinoma pancreático [18]; sin embargo, el mecanismo de asociación se ha hipotetizado a través de la hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, niveles elevados del factor de crecimiento tipo insulina, hiperglicemia e inflamación crónica [19] ; ya que al haber una hiperinsulinemia crónica se reducen las concentración de la proteína de unión del factor de crecimiento tipo insulina dando lugar a niveles elevados de este factor de crecimiento, el cual es crucial en la desarrollo y progresión en diferentes tipos de cáncer [20].

2.3.7 Pancreatitis crónica

La ingesta crónica de alcohol representa una de las causa principales de pancreatitis crónica, la cual, ha sido implicada como un factor predisponente para desarrollar cáncer pancreático; debido a que durante el metabolismo del alcohol son producidas sustancias como acetaldehído y ésteres etílicos de ácidos grasos, los cuales inducen un tipo de pancreatitis, inflamando los sistema de conductos, obstruyendo el flujo del jugo pancreático, dando lugar a la propia digestión pancreática lo que conlleva a mayor inflamación. Por otro lado, el acetaldehído ha sido propuesto como un químico orgánico involucrado en carcinogénesis; sin embargo, no es posible concluir que el proceso inflamatorio represente consecuencias de malignidad en el tejido pancreático [21].

2.3.8 Factores dietéticos

Diversidad de factores dietéticos han sido analizados y asociados con el cáncer pancreático. De acuerdo a los reportes del 2007 de WCRF (World Cancer Research Fund) y AICR (American Institute of Cancer Research), se sugiere una relación entre la ingesta de la energía total, de grasa, consumo de proteína animal o ingesta de vegetales y el riesgo de padecer cáncer pancreático. La evidencia del papel que tienen estos productos no son concluyentes [22]

2.3.9 Otros factores

Son diversos los factores que se han asociado al cáncer pancreático, uno de ellos corresponde a los agentes infecciosos, tales como *Helicobacter pylori* o el virus de la Hepatitis B; sin embargo, la asociación de estos agentes causales con PDAC requieren de investigación más profunda debido a que la correlación entre la patología y el factor no son consistentes. Por otro lado, diversas oficios u ocupaciones se han relacionado con el cáncer pancreático, debido a que en algunas de ellas, el personal laboral se expone a diversos agentes químicos tales como formaldehídos, organochlorados, por mencionar algunos. Otro factor que se ha asociado con el cáncer pancreático son las alergias, específicamente la atopia, más no el asma; no obstante, no se puede establecer una relación entre estos factores de riesgo y el cáncer de páncreas, se necesita más investigación para dilucidar esta incógnita. Diversos fármacos se han considerado como factores importantes en la etiología del PDAC, tales como la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos (NSAID's), debido a que estos agenten bloquean a la enzimas cicloxigenasas, inhibiendo así, el crecimiento tumoral a través de una respuesta inmune incrementada, modulando la proliferación celular e inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, dando lugar así procesos apóptoticos [10, 15, 23].

3. Fisiopatología del PDAC.

El desarrollo de los tumores pancreáticos malignos como PDAC, ocurre a través de lesiones precursoras no malignas conocidas como Neoplasias Intraepiteliales Pncreáticas (PanINs), neoplasia mucionosa papilar intraductal (IPMN) o neoplasia quística mucinosa (MCN) [24] (Fig. 8).

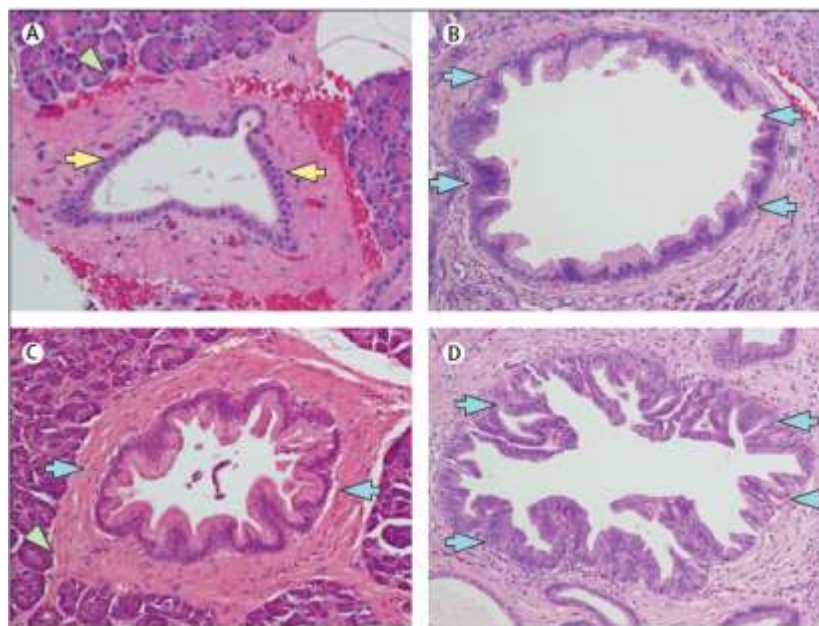


Figura 8. Histología: neoplasia intraepitelial pancreática (PanINC's). A) páncreas normal. Corte histológico de ductos pancreáticos normales. B) PanIN1. C) PanIN2. E) PanIN3. Flechas amarillas = ductos pancreáticos normales. Flechas azules = PanIN's. 40X. (Tomado de Vincent; 2011).

El precursor neoplásico más común del adenocarcinoma pancreático es conocido como PanIN; este tipo de lesiones son microscópicas, con diámetro en promedio de 5mm, siendo indetectables mediante estudios de gabinete. Las PanIN's se han dividido en PanIN de bajo, intermedio y alto grado (Fig. 6). Este tipo de lesiones, pueden alojar alteraciones genéticas, como aneuploidías, las cuales se han observado en el PDAC, mayormente encontradas conforme avanza el grado de la neoplasia intraepitelial pancreática (Fig. 9) [25].

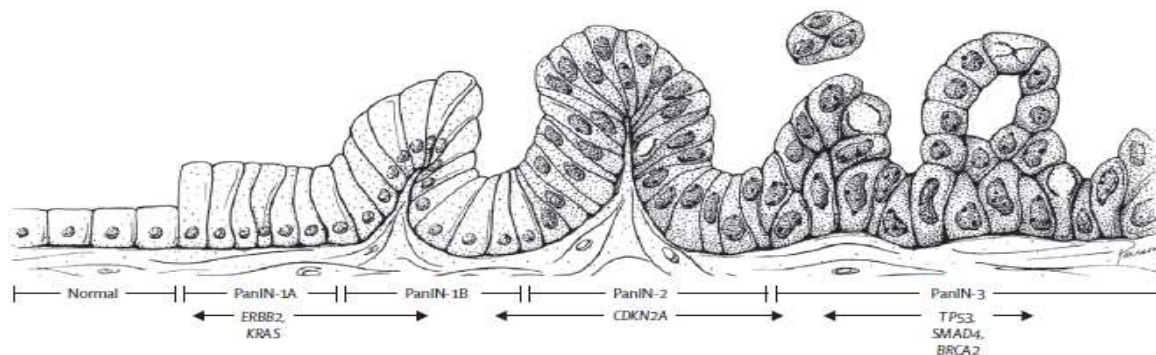


Figura 9. Modelo de progresión PanIN's, mostrando alteraciones genéticas. Tomado de Vincent 2011.

3.1 Microambiente tumoral

Las interacciones entre los diversos elementos que conforman a la desmoplasia característica de esta patología, donde predominan los fibroblastos, con las células neoplásicas pancreáticas, contribuyen al inicio tumoral, progresión y metástasis, que caracterizan a este tipo de carcinoma. El evento que dispara el desarrollo del cáncer pancreático es aún controversial, puesto que, a pesar de que se han identificado células “causantes” como iniciadoras del proceso tumorigénico a través de mutaciones adquiridas, su papel durante la carcinogénesis sigue siendo difícil de explicar [25].

4. Clasificación histológica de los tumores de Páncreas

Muchos de los tumores primarios de páncreas son malignos y la mayoría son clasificados como carcinoma ductal o adenocarcinoma pancreático (PDAC) (Fig. 10), siendo la a clasificación más común de las neoplasias pancreáticas (Tabla 2) [23]:

Tabla 2. Clasificación de neoplasias pancreáticas. Tomado de Solcia y cols; 1997.

Clasificación	...Clasificación
<p>Adenocarcinoma Ductal</p> <ul style="list-style-type: none"> Tipo tubular Tipo mucinoso Tipo en anillo de sello Carcinoma adenoescamoso De células claras Carcinoma endocrino ductal mixto 	<p>Neoplasias quístico-serosas</p> <ul style="list-style-type: none"> Cistadenoma seroso microcístico Cistadenoma sroso macrocístico
<p>Carcinoma indiferenciado</p> <ul style="list-style-type: none"> Carcinoma de células gigantes anaplásicas Carcinoma de células gigantes osteocláticas 	<p>Neoplasia quístico-mucinoso (MCNS)</p> <ul style="list-style-type: none"> Cistadenoma mucinoso MCNS. Limítrofe Cistadenocarcinoma <ul style="list-style-type: none"> No invasivo Invasivo
<p>Carcinoma Sarcomatoideo / Carcinoma celular acinar</p> <ul style="list-style-type: none"> Cistadenocarcinoma celular acinar Carcinoma endocrino-acinar mixto Carcinoma ductal-acinar mixto Carcinoma ductal encocrino acinar mixto 	<p>Neoplasia mucinosa papilar intraductal</p> <ul style="list-style-type: none"> Adenoma mucinoso papilar intraductal
	<p>Neoplasia mucinosa papilar intraductal, carcinoma mucinoso papilar intraductal limítrofe</p> <ul style="list-style-type: none"> No invasiva Invasiva

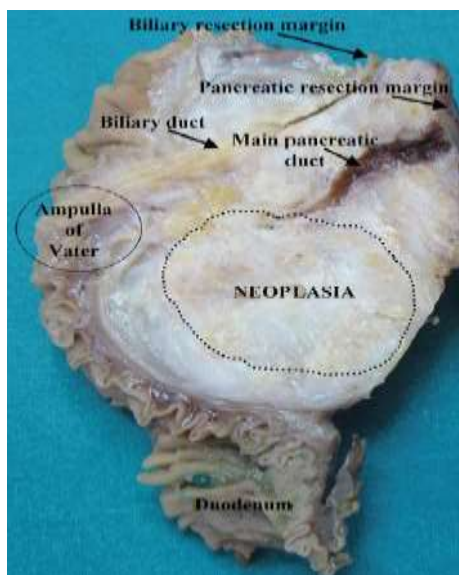


Figura 10. Imagen macroscópica de adenocarcinoma pancreático. Tomado de Corbo; 2012.

Muchos de estos tumores presentan una apariencia similar entre sí, constituida por tamaños variables de las células glandulares tubulares, embebidas en un marcado estroma desmoplásico, constituyendo este aproximadamente el 50% de la masa tumoral, tal es el ejemplo del PDAC. El carcinoma de células escamosas y el carcinoma adenoescamoso constituyen aproximadamente el 2% de los cánceres pancreáticos, teniendo un pronóstico de supervivencia pobre. Los carcinomas sarcomatoideo y carcinosarcoma son tumores que simulan a un componente del uso mitótico celular, siendo altamente parecidos a un verdadero sarcoma. Estos tipos de carcinoma indiferenciados son extremadamente raros constituyendo menos del 1% del global de los tumores pancreáticos, sin embargo, son muy agresivos, con pronóstico totalmente desalentador. El carcinoma de células acinares constituye del 1-2% de las neoplasias del páncreas. Son neoplasias las cuales se definen como carcinomas que presentan evidencia de producción de enzimas pancreáticas similar a las células acinares no neoplásicas. El pronóstico es de una supervivencia mayor a los 5 años del 6%. Los tumores cístico-serosos incluidos las neoplasias menos agresivas son clasificados de acuerdo al tamaño del quiste, siendo macro y micro cistadenomas; generalmente este tipo de tumores son benignos y no tienden a invadir a otros órganos. Los MCNS generalmente afectan a mujeres jóvenes, donde el pronóstico después de la

resección es excelente con solamente 10% de pacientes que presentan metástasis. La neoplasia mucinosa papilar intraductal, es un tumor de las papilas, originado dentro de los ductos pancreáticos, que presenta una gran capacidad de secretar mucina, y, generalmente este tipo de tumores aparecen entre 6ª y 8ª década de la vida, teniendo un pronóstico muy bueno, ya que la mayoría de los pacientes con este tipo de tumor se curan completamente después de una resección quirúrgica [23].

5. Cuadro clínico

Los estadios tempranos del cáncer pancreático son generalmente silenciosos, puesto que esta enfermedad solamente se hace aparente después de la invasión tumoral hacia los tejidos circundantes o metastatiza a órganos como el hígado, en donde la mayoría de las personas que presentan síntomas se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad. El síndrome clínico o triada característica del cáncer de páncreas incluye dolor abdominal o de espalda baja, ictericia obstructiva y pérdida de peso. La ictericia y la pérdida de peso es debida a que generalmente, los tumores de la cabeza del páncreas, los más comunes, crecen obstruyendo al duodeno y conductos biliares, impidiendo el drenaje de los ácidos biliares. Se estima que el 25% de los pacientes con cáncer pancreático tienen diabetes mellitus al momento del diagnóstico. A diferencia de los tumores que se desarrollan en el cuerpo y cola del páncreas, no presentan un síndrome característico, solo signos y síntomas aislados tales como, dolor en el epigastrio; sin embargo, son tumores menos frecuentes [26].

6. Diagnóstico por imagen

Para el diagnóstico del cáncer pancreático, se han utilizado diversos estudios de gabinete como son, el ultrasonido transcutáneo (USG), tomografía computarizada (CT), resonancia magnética (MR), colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (CPRE), ultrasonografía endoscópica (EUS) y la tomografía por emisión de positrones (PET) (Fig. 11); de todos ellos, actualmente la tomografía computarizada helicoidal es el estudio de gabinete por excelencia para diagnosticar y establecer el estadio de desarrollo del PDAC; ya que este método, permite evaluar los vasos sanguíneos adyacentes al tumor, así como, metástasis a órganos como el hígado, nódulos linfáticos y retroperitoneo. El resto de los estudios radiológicos, son generalmente adicionales a esta técnica de elección [27].

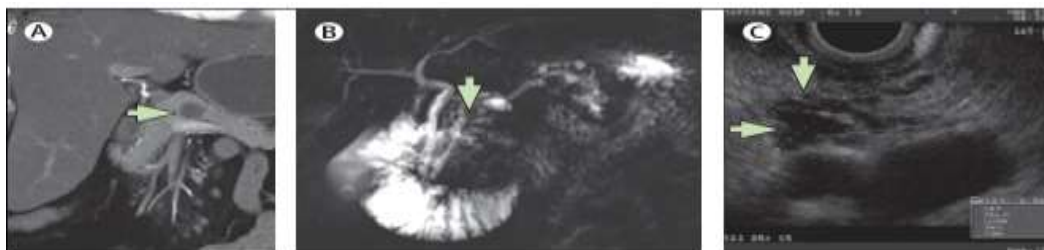


Figura 11. Análisis por imagen de una neoplasia mucinosa intrapeitelial ductal. (A) CT: Tomografía computarizada. (B) Colangiopancreatografía de Resonancia magnética; (C) USG endoscópico. Las flechas denotan el tumor pancreático, neoplasia intraductal. Tomado de Vincent 2011.

7. Estadificación del carcinoma pancreático.

El sistema de estadificación para el cáncer de páncreas exocrino continúa en constante discusión, ya que su importancia, más allá de la resecabilidad o irresecabilidad del tumor, es incierta, puesto que, los tratamientos quimioterápicos han demostrado tener poco efecto en la supervivencia. Sin embargo, para este tipo de tumores, una vez identificado la porción del páncreas afectado, se da lugar a diversos abordajes quirúrgicos del tumor [28].

La clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) designó los estadios mediante la clasificación TNM (T: tumor; N: nódulos linfáticos regionales; M: metástasis) para definir el cáncer de páncreas (Tabla 3) [27].

Tabla 3. Clasificación del carcinoma pancreático, con la estadificación. Tomado de Edge y cols; 2010

TNM	
Categoría T	
TX	no se puede evaluar el tumor principal.
T0	no hay evidencia de un tumor primario.
Tis	carcinoma in situ (muy pocos tumores se detectan en esta etapa).
T1	el cáncer no se ha propagado más allá del páncreas y mide menos de 2 cm. (aproximadamente 3/4 de pulgada) de largo.
T2	el cáncer no se ha propagado más allá del páncreas, pero mide más de 2 cm. de largo.
T3	el cáncer se ha propagado del páncreas a los tejidos que le rodean, pero no a los vasos sanguíneos.
T4	el cáncer se ha extendido más allá del páncreas hacia los grandes vasos sanguíneos cercanos.
Categoría N	
NX	no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	los ganglios linfáticos regionales (ganglios linfáticos cercanos al páncreas) no están comprometidos.
N1	el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos regionales.
Categoría M	
MX	no se puede evaluar la propagación a órganos distantes.
M0	el cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos distantes (aparte de los que están cerca del páncreas) ni a órganos distantes como el hígado, los pulmones, el cerebro, etc.
M1	hay metástasis a distancia.

8. Tratamiento

El tratamiento del carcinoma pancreático se encuentra regido por dos diferentes criterios; el primero, es la cirugía radical con quimioterapia para los pacientes que se encuentran en etapas tempranas de la enfermedad, principalmente, en los estadios I y II, en todos los demás estadios, el objetivo es el tratamiento paliativo; por lo tanto, es posible definir tratamiento y pronóstico (Tabla 4) de acuerdo al estadio tumoral en el paciente [15, 27]. Actualmente, existen quimioterápicos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) que normalmente se administran de manera conjunta a los pacientes con PDAC, Para el PDAC irresecable, la quimioterapia es la mayormente usada, como hemos mencionado, Gemcitabina/Erlotinib, Folfirinox, Gemcitabina/NAB-paclitaxel, Gemcitabina/Capecitabina, Capecitabina/Oxaliplatino (XELOX); sin embargo, el PDAC al ser caracterizado por una reacción demoplásica, promueve la resistencia a la quimioterapia.

Tabla 4. Clasificación del carcinoma pancreático. Estadio anatómico/grupos de pronóstico Tomado de Edge y cols; 2010.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0

III	T4	Cualquier N	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Estadio I. Aproximadamente, el 20% de los pacientes presentan la enfermedad circunscrita en el páncreas, siendo candidatos para la resección quirúrgica. La completa resección puede dar lugar a una sobrevida de 5 años en un aproximado del 15-20% de los pacientes, tal motivo es causado por la alta incidencia de la enfermedad en tejidos distantes al carcinoma primario, tales como hígado o retroperitoneo. En la práctica clínica, la enfermedad en este estadio, el tratamiento standard por elección es la resección pancreática radical de Whipple o la pancreatometomía de tipo C [29, 30].

Estadio II

Estadio IIa. Muchos de los pacientes que se encuentran en este estadio de la enfermedad, han desarrollado tumores que no son técnicamente resecables; por lo tanto, estos pacientes pueden verse beneficiados con tratamientos quirúrgicos como el bypass paliativo para aliviar la obstrucción de las vías biliares (carcinoma de cabeza del páncreas), así como, el bypass intestinal cuando existe obstrucción intestinal. Otros tratamientos estándares incluyen la pancreatometomía en tipo C. Para estos pacientes, el papel de la quimio y radioterapia con 5FU (fluoracilo) continúa siendo controversial debido a la baja sobrevivencia que muestran los pacientes [29, 30].

Estadio IIb. Un número muy limitado de pacientes que se encuentran en este estadio de la enfermedad pueden sufrir una pancreatometomía radical. Para estos pacientes, la combinación de radio y quimioterapia con 5FU aunado con el bypass paliativo biliar e intestinal son considerados como un tratamiento básico estándar tipo C. La quimio y radioterapia (400 cGY y bolos de 5FU) han demostrado tener mejores resultados juntos que ambas terapias aisladas. Es importante destacar, que la radioterapia por si sola solo mejora los síntomas del paciente mas no mejora su sobrevida [27]

Estadio II y III

La mayoría de los pacientes en estos estadios, presentan tumores técnicamente irresecables, debido a la invasión local de los vasos sanguíneos; no obstante, el tratamiento con radioterapia y 5FU puede dar una pequeña pero significativa sobrevida a los pacientes; pero, el pronóstico continúa siendo fatal [27].

Estadio IV. Los pacientes que presentan diseminación tienen un pronóstico eminentemente fatal. El tratamiento con gemcitabina o 5 FU puede ser una propuesta de tratamiento para mejorar los síntomas característicos de la enfermedad, sin embargo, la muerte es inminente [25].

Otras estrategias terapéuticas están en proceso de desarrollo con el objetivo de beneficiar los tratamientos convencionales, como la quimioterapia. Actualmente la terapia génica en PDAC no es utilizada en la clínica a pesar de ser exitosa “in vivo” e “in vitro”. Este tipo de estrategia molecular se enfoca en el reemplazo, bloqueo y modificación de distintos genes como *CKDN2A*, *K-ras*, *HER-2/EerB-2*, *VEGF* [31]. Terapias con vacunas, tales como *Listeria*, para el año 2012 estaban por iniciar la primera fase clínica [32]. El reposicionamiento de fármacos ha tomado lugar en el campo del PDAC, tales como la Metformina y la Aspirina, que de manera sinérgica inhiben el crecimiento celular a través de moléculas como mTOR, S6K, 4E-BP1, NF-κB, and STAT3 [33]. Además, se ha demostrado que la metformina sensibiliza a las células cancerosas pancreáticas a través de la inhibición de la vía de señalización de ERK/p70S6K [34].

8.1 Tratamiento paliativo

Debido a la alta mortalidad del PDAC y a las etapas avanzadas en las que los pacientes son diagnosticados, se han desarrollados terapias paliativas que permiten dar un beneficio mayor al paciente hasta su descenso. Como hemos mencionado anteriormente, existe una triada característica de esta enfermedad, dolor abdominal o de espalda baja, ictericia obstructiva y pérdida de peso; por lo tanto, uno de los objetivos es paliarlos. La ictericia es resultado de la obstrucción de los conductos biliares, teniendo como alternativa, el drenaje percutáneo, sobre todo para los pacientes de avanzada edad o que no son candidatos a resección quirúrgica, como en los estadios avanzados. El alivio de los síntomas como

vómito y falta de apetito pueden mejorar con la succión nasogástrica o la gastroenterostomía. Con respecto al dolor, los pacientes deben ser tratados con opioides, tales como la morfina; este fármaco es generalmente el de elección. También el bloqueo percutáneo plexoceliaco puede ser considerado, primordialmente en aquellos pacientes con pobre tolerancia a los opiodes [26, 35].

9. Mecanismos moleculares del adenocarcinoma pancreático PDAC

Para el año 2008, a nivel mundial, se hubo estimado que 213,000 pacientes desarrollarán carcinoma pancreático, de los cuales, todos ellos fallecerán a causa de esta entidad patológica [36]. Se han reportado diferentes tipos de alteraciones genéticas en este tipo de carcinoma, tales como *CDKN2A*, *SMAD4*, *p53* y *KRas*. Aunque el descubrimiento de estos genes han aportado un amplio conocimiento sobre la historia natural de la enfermedad, así como avances importantes en los tópicos de diagnóstico y tratamiento, la gran mayoría de estos genes, no han sido analizados en el adenocarcinoma pancreático, siendo entonces, urgente conocer y comprender la patogénesis de esta letal enfermedad; por ello, Jones y colaboradores, realizaron ensayos genéticos de 24 tipos diferentes de adenocarcinoma pancreático, teniendo que, primeramente, determinaron 23,219 transcritos, representando 20,661 genes codificantes de proteínas; posteriormente, mediante ensayos de microarreglos, Jones y cols, encontraron que el adenocarcinoma pancreático, contiene un promedio de 63 alteraciones genéticas, siendo la mayoría mutaciones puntuales. Estas alteraciones, fueron agrupadas en 12 vías de señalización distintas y convergentes (Fig. 12) que han sido reportadas en otros tipos de cáncer en aproximadamente de 67 a 100% [37]



Figura 12. Vías de señalización alteradas en el adenocarcinoma pancreático. Estas vías de señalización se encuentran alteradas de un 69 a 100% de los adenocarcinoma pancreáticos (Tomado de Jones y cols; 2008).

La heterogeneidad entre las diferentes vías de señalización y la amplia variedad de mutaciones, permite entender la complejidad de esta patología[37].

9.1 Mutaciones en KRas

La proteína KRas es un miembro de la familia de las GTPasas Ras y participa en una amplia variedad de funciones celulares, tales como proliferación, diferenciación y sobrevivencia celular [38]. Las mutaciones en kRas pueden ser encontradas en un 30% en las PanIN's, sin embargo, se encuentran en un 100% en el adenocarcinoma pancreático avanzado o metastásico, proponiendo una participación crítica de esta molécula en el proceso tumorigénico. Mutaciones en la proteína K-Ras, principalmente la mutación en el codón 12 de una glicina por un ácido aspártico (K-Ras^{G12D}), se encuentran localizadas muy cerca del sitio catalítico de la molécula, dando lugar así, a una reducción en su actividad hidrolítica de GTP, no obstante, el resultado es lo opuesto, ya que la molécula se convierte en una molécula de actividad constitutiva, es decir, K-Ras se encuentra unida a GTP de manera perene perene [39]. La proteína KRas participa principalmente en 3 vías de señalización, siendo estas implicadas en el proceso de tumorigenesis, tales como, la vía RAF/ERK; la vía PI3K y la vía RalGDS (Fig. 13).

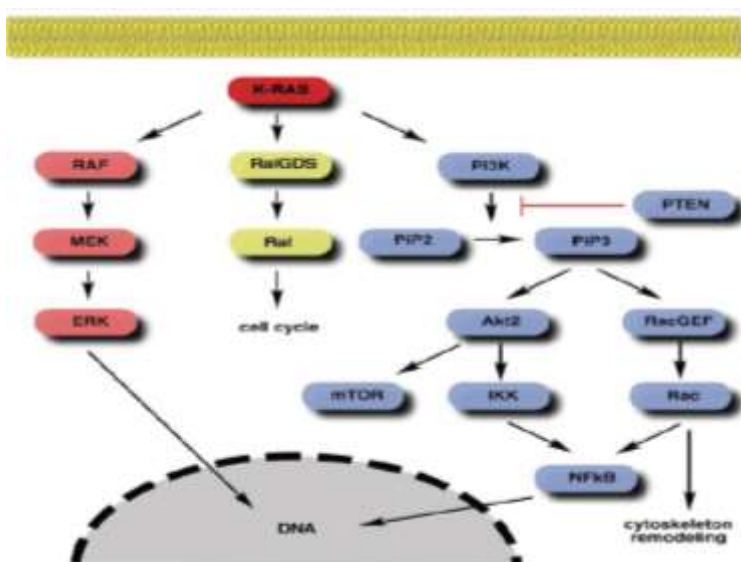


Figura 13. Principales vías de señalización de KRas. (Tomado de Mihaljevic y cols; 2010).

Las proteínas RAF son una familia de cinasas serina/treonina las cuales son activadas por las GTPasas Ras dando lugar a procesos de fosforilación que culminan en la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos, ERK, dando lugar a la progresión del ciclo celular/ división celular y aun fenotipo proliferativo [40]. La vía de señalización PI3K también es activada por la GTPasa K-Ras, regulando múltiples procesos, como proliferación y sobrevivencia celular [41]. Por otro lado, la vía de señalización RalGDS, también han sido involucradas en el desarrollo de PDAC debido al hecho de que la GTPasa K-Ras puede activar al factor intercambiador Ral incrementando el grado de transformación celular [42].

9.2 TGF- β

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una proteína secretada encargada de diversas funciones biológicas como proliferación, diferenciación, angiogénesis e invasión [43, 44]. El mecanismo de activación de este factor, se lleva a cabo mediante su unión con su receptor, el receptor de TGF- β tipo 2, permitiendo la oligomerización con el receptor de TGF- β tipo 1 y la activación del dominio serina-treonina cinasa del TGF- β , este dominio una vez activado, fosforila a las proteínas SMADS reguladas por el receptor (R-SMADS) que forman un complejo heterotrimérico con la proteína SMAD4. El complejo receptor-SMAD's y SMAD4 puede translocarse al núcleo y estimular así una amplia variedad de genes blanco (Fig.14).

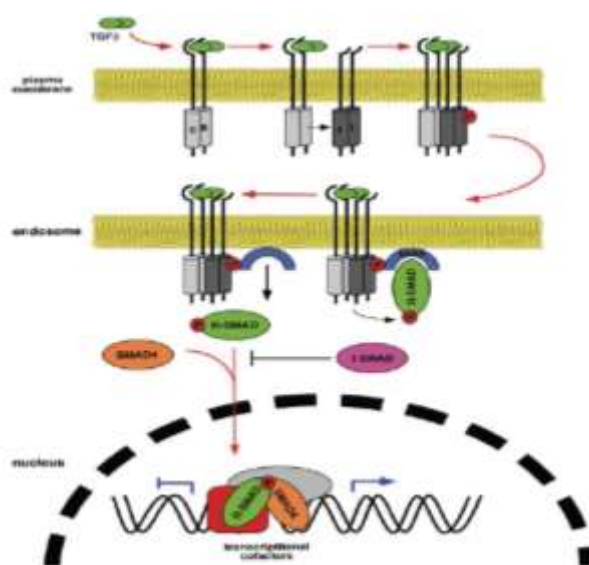


Figura 14. Vía de señalización del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β). Tomado de Mihaljevic y cols; 2010.

El 90% de los adenocarcinomas pancreáticos presentan pérdida de la heterozigocidad en el locus de SMAD4 [45]. La proteína SMAD4 parecer ser necesaria en la progresión y mantenimiento del CaPan por su presencia en etapas tardías de las PanIN's [46, 47].

9.3 Control de daño al DNA

El gene *p53*, ha sido el mejor estudiado en este tópico, ya que se encuentra mutado en un porcentaje mayor al 50 de todos los casos de PDAC [48-50]. Al ser un gene supresor del tumor, las mutaciones de *p53* suelen aparecer en los estadios avanzados de las lesiones precursoras, es decir, en PanIN II y III.

9.4 Regulación de la transición de la fase G₁/S

La proteína mejor descrita en esta categoría es CDKN2A ó Ink4, la cual se encuentra codificada en el cromosoma 9p21, donde el locus de esta molécula se sobrelapa con otro gen supresor de tumor, *ARF*. La proximidad de ambos locus da lugar a que estos supresores de tumores se encuentren afectados a la vez. CDKN2A fue primeramente detectado en pacientes con melanoma múltiple atípico familiar (FAMMM), el cual aumenta el riesgo de desarrollar PDAC. El mecanismo de CDKN2A se debe a la inhibición de la fosforilación de el Rb (Retinoblastoma) inhibiendo a la cinasa dependiente de ciclina 4/6, bloqueando la entrada a la fase S del ciclo celular; mientras que ARF estabiliza a *p53* inhibiendo su proteólisis dependiente de MDM2, además, de la función inhibitoria del procesamiento del RNA ribosomal [51]. La contribución de ambos supresores de tumores en el desarrollo del PDAC es debida a que mutaciones en la molécula CDKN2A coadyuva con K-Ras acelerando la progresión tumoral [52].

9.5 Vía de señalización *Hedgehog*

Esta vía de señalización es indispensable durante el desarrollo del páncreas y dispensable en el tejido pancreático adulto; sin embargo, esta vía puede ser encendida nuevamente durante el proceso tumorigénico del PDAC[41, 53]. La familia de las proteínas *Hedgehog* está constituida por 3 miembros: *sonic hedgehog*, *Indian hedgehog* y *desert hedgehog*. El

mecanismo de acción de estas proteínas Hedgehog da lugar a una cascada de señalización, que permite activar a un número de genes gracias a la interacción con los activadores transcripcionales de la familia GLI [54] (Figura 15).

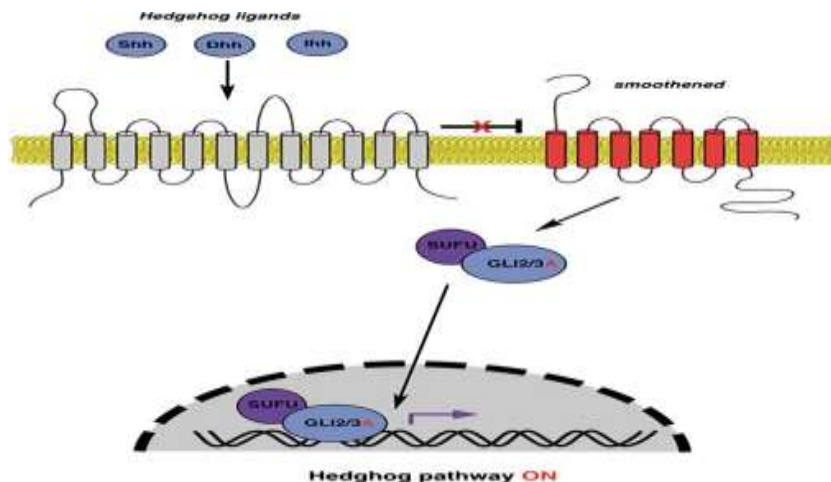


Figura 15. Vía de señalización Hedgehog. Tomado de Mihaljevic y cols; 2010.

Las proteínas Hedgehog, se encuentran frecuentemente mutadas en el PDAC y se ha reportado que la inhibición de esta vía con el fármaco ciclopamina aumenta la sobrevivencia en un modelo de ratón de PDAC [55].

9.6 Vía de señalización Notch

Esta vía de señalización es activada una vez que los ligando de Notch interaccionan con uno de sus cuatro receptores para Notch, permitiendo la degradación del receptor y su subsecuente translocación de su dominio intracelular al núcleo, donde participa activando diversos genes blanco [56]. Actualmente, no existe una correlación directa entre esta vía de señalización con el desarrollo de PDAC *per se*; sin embargo, existe evidencia de que Notch interacciona con K-Ras para iniciar y perpetuar el PDAC [57].

9.7 Apoptosis

Jones y colaboradores en el 2008, encontraron que el 100% de los casos de PDAC tienen mutaciones en las vías de señalización apoptóticas, dando de esta manera la antesala de la importancia de conocer la implicación de estas en esta entidad patológica [37]. El proceso apoptótico puede iniciarse en dos niveles (Fig.16), ya sea por la vía del receptor de muerte (a través de la unión del receptor de muerte a sus ligandos como FASL, TRAIL ó TNF) ó

dos, por la vía de señalización mediada por la mitocondria [58]. Ambas vías se encuentran alteradas en PDAC, permitiendo una mayor susceptibilidad ante el estímulo proapoptótico, tal como sucede en la vía de receptor de muerte, el cual puede ser inhibido por la sobreexpresión de los inhibidores de la apoptosis, IAP's, como cIAP2 y survivina, las cuales se encuentran sobreexpresadas en un en las PanIN's tardías [59]. Por otro lado, en el PDAC se puede expresar el receptor señuelo 3 sin un dominio de muerte, compitiendo por la unión con FASL, bloqueando la inducción de la apoptosis [60]. Por el lado de la vía de señalización mitocondrial, la desregulación de la expresión de miembros de BCL2 ocasiona resistencia a la apoptosis en PDAC [61].

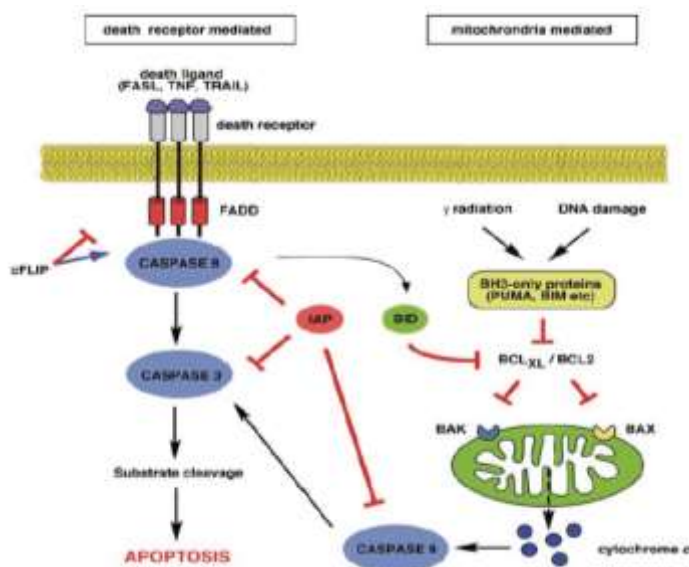


Figura 16. Vía de señalización apoptótica. (Tomado de Mihaljevic y cols; 2010)

9.8 Vías de señalización mediadas por GTPasas: proteínas reguladoras RhoGDI'S y sus implicaciones biológicas

9.8.1 El papel de las proteínas RhoGDI1

El patrón de expresión de las proteínas RhoGDI's en cada uno de los diferentes tipos de cáncer, así como, las diferentes funciones biológicas a través de proteínas GTPasas Rho particulares, es altamente divergente. Esto sugiere fuertemente que, las funciones de las proteínas RhoGDI's no son totalmente redundantes, dando cabida a la participación de diversos mecanismos que regulan a este tipo de proteínas RhoGDI's. Diversos estudios apoyan la propuesta que las proteínas RhoGDI's tienen funciones específicas, ya que

ratones transgénicos donde se eliminaron los genes de las proteínas RhoGDI's 1 y 2, presentaron características clínicas variadas, es decir, los ratones *knockout* RhoGDI 1 murieron de insuficiencia renal 6 meses después de su nacimiento, y los ratones machos fueron infértiles [62]. En contraste, los defectos observados en los ratones RhoGDI-2 *knock-out* fueron sutiles, con alguna disminución en el metabolismo de la oxidación en células fagocíticas [63].

Por otro lado, diversidad de grupos han investigado el papel de la expresión de las proteínas RhoGDI1 y la correlación con el carcinoma mamario; sin embargo, no se ha logrado encontrar un panorama claro. Fritz y colaboradores en el año 2002, reportaron una sobreexpresión de las proteínas RhoGDI en tumores mamarios a diferencia de lo observado en las muestras de una cohorte pequeña de pacientes [64]. En un contexto similar, Jiang y colaboradores a través de ensayos de RT-PCR cuantitativa e inmunohistoquímica, examinaron a las proteínas RhoGDI1 y RhoGDI2 en cáncer mamario de una cohorte grande de pacientes que habían sufrido mastectomía radical (un total de 120 cáncer y 32 de tejido normal), encontrando una reducción significativa de la expresión de la proteína RhoGDI1 en tumores mamarios comparado con tejido sano mamario [65]. Zhang y colaboradores, observaron que la sobreexpresión de la proteína RhoGDI1 en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer mamario, disminuye la apoptosis inducida por los agente quimioterápicos etopósido y doxorubicina[66]. La habilidad de evadir los procesos apoptóticos representa una de las características del cáncer; de tal manera que, evidencias recientes mediante ensayos de iRNA en carcinoma de mama, demostraron que la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI1, en la línea celular de cáncer mamario MDA-MB-231, da lugar a una mayor sensibilización al tratamiento con el quimioterápico etopósido, lo que conlleva a una disminución de la población de células malignas [67].

En cuanto al tratamiento de los tumores linfoides, como la leucemia mieloide crónica, la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI1 a través de ensayos por RNA de interferencia, demostraron un aumento de la sensibilidad al ser tratadas con el fármaco busulfan, reflejado en un mayor número de células apoptóticas comparadas con el control, concluyendo que existen un [68] aumento en la citotoxicidad en las células deficientes de la proteína RhoGDI1 [69].

En el campo referente al adenocarcinoma pancreático, se han realizado diversos estudios para tratar de dilucidar el porqué este tipo de cáncer es altamente mortal, ya que representa un panorama complejo de abordar, entender y analizar. En el año 2009, Li y colaboradores, demostraron que un miembro de la familia de receptores trk neurotrofina, TrkBT1, una variante de la tropomiosina relacionada con la cinasa B, se encuentra sobrepresada en el citoplasma de los cánceres pancreáticos que han invadido el tejido hepático; además, demostraron que esta proteína TrkBT,1 promueve la proliferación celular y el potencial invasivo, ocasionado por el secuestro de las proteínas RhoGDI-1, lo que permite llevar a cabo una cascada de señalización gracias a la activación de la proteína RhoA [68].

9.8.2 Papel de las proteínas RhoGDI2

El grupo de Sherle y colaboradores en el año 1993, encontraron un segundo tipo de proteínas RhoGDI, denominándola RhoGDI2 [70], la cual participa inhibiendo la disociación del GDP unido a las GTPAses RhoA, Rac 1, Rac 2 y Cdc42. Además de estas funciones celulares, desde principios de la década de los 2000, las proteínas RhoGDI2 también se han descrito en una amplia variedad de tumores humanos, donde, los niveles de expresión de estas proteínas, han permitido adjudicarle otras funciones celulares, tales como, proteínas pro ó antitumorogénicas, variando esta función de un tipo tumoral a otro. En el año 2002, Gildea y colaboradores, utilizando líneas celulares de carcinoma de vejiga (T24 y T24T), a través de ensayos de microarreglos de RNA, identificaron genes con una disminución en su expresión, comprobando estos hallazgos analizando 105 muestras de distintos carcinomas primarios, anatomopatológicamente bien caracterizados, próstata, vejiga, mama, colon-recto, riñón y pulmón; determinando que el gene codificante para la proteína RhoGDI2 presentaba una disminución en su expresión; posteriormente, los ensayos de reconstitución de la proteína RhoGDI2, demostraron que los eventos celulares de invasión y tumorogénesis se bloqueaban, concluyendo que la proteína RhoGDI2 funciona como una proteína implicada en la supresión de la metástasis en diversos cánceres humanos, sugiriendo un papel fundamental en la patogénesis de la progresión tumoral en este tipo de patologías [71].

Consecutivamente, en el año 2004, Ota y colaboradores, reportaron, a través de ensayos de transfección utilizando una secuencia truncada del gene codificante para la proteína

RhoGDI2 en líneas celulares derivadas de ratones BALB/c T-A31-1-1 y SW480, que la expresión de la proteína truncada en el extremo carboxilo terminal, RhoGDI2 (166-201 deleted), induce metástasis pulmonar, no así la expresión de la proteína RhoGDI2 completa; así también, la proteína truncada RhoGDI2 (166-201 eliminada) fue copurificada con diferentes proteínas, tales como, radixina, moesina, RhoA, Cdc42 y Rac1; por lo tanto, la proteína RhoGDI2, muy probablemente se encuentra participando en la activación de distintas vías de señalización que promueven metástasis, a través del anclaje de las GTPasas Rho a sus sitios efectores [72].

En ese mismo año, Theodorescu y colaboradores con el afán de conocer la importancia de la proteína RhoGDI2 en el cáncer de vejiga, investigaron el grado de expresión a nivel de mRNA y de proteína en tejidos y órganos adultos sanos; así como el potencial pronóstico de los niveles de esta proteína en pacientes con cáncer de vejiga; sus resultados permitieron determinar que la expresión de la proteína RhoGDI2 en tejido normal no solo se limita a un solo tejido, el hematopoyético, sino que se expresa en una amplia variedad de tejido sano, como páncreas y cerebro; y que además, la pérdida ó ganancia de la expresión de la proteína RhoGDI2 en tumores de vejiga, es un predictor independiente para desarrollar metástasis, apoyando así, su papel como gene supresor de la metástasis y como un probable marcador pronóstico [73]. Danley y colaboradores demostraron que la proteína RhoGDI2, puede ser cortada por la enzima caspasa 3, en el extremo carboxilo terminal, en los residuos Asp19 y Asp55, generados a partir de estados de estrés como, la radiación ionizante y inflamación, respectivamente [74]. Es bien conocido que el fragmento RhoGDI2 (1-19) es translocado al núcleo, donde se propone una participación en procesos apoptóticos [74]; sin embargo, la funcionalidad del otro fragmento, RhoGDI2 (1-55), se reportó hasta el año 2006 por el grupo de Ota, quienes encontraron que este fragmento, suprime la metástasis en fibroblastos transformados mediante la muerte celular programada por Anoikis; a su vez, utilizando ensayos de pulldown demostraron que al haber una ausencia del extremo carboxilo terminal, no inhiben la función de las GTPasas Rho, es decir, no inhiben la liberación del GDP de las GTPasas; por lo tanto, con base en estos resultados, Ota y colaboradores sugieren que la proteína RhoGDI2 participa en los procesos metastásicos a través de una función diferente aún no reportada para otro tipo de GTPasa [75].

Un aspecto importante de las células cancerosas, es la capacidad de invasión y metástasis, traducido en un mal pronóstico para los pacientes; y un esfuerzo por comprender estos mecanismos fue publicado por Zhang y Zhang en el año 2006 en líneas celulares de carcinoma mamario, donde reportan que la proteína RhoGDI2 promueve la invasión *in vitro* de células de cáncer mamario; es decir, demuestran que la proteína RhoGDI2 se expresa en una amplia variedad de líneas celulares de carcinoma mamario, entre estas líneas celulares MDA-MB-231 y BT59, en donde al disminuir la presencia de la proteína a través de ensayos de iRNA, los procesos de invasión y crecimiento celulares se redujeron; por otro lado, el fenotipo celular invasivo se revirtió, al observar mediante ensayos de invasión de matrigel, que las células conformaron estructuras similares a un acino glandular mamario; estos eventos impactantes fueron reproducidos con los ensayos de reconstitución de la proteína RhoGDI2, donde la invasividad y movilidad se restauraron, evidenciando que estos eventos son resultado de la actividad específica de la proteína RhoGDI2. Com base en estos resultados, Zhang y Zhang, concluyen que la proteína RhoGDI2, es un promotor de la invasión de células cancerosas, proponiendo a esta proteína como un biomarcador pronóstico del cáncer mamario y quizás como un blanco terapéutico [76].

Siguiendo con la línea de estudio de las proteínas RhoGDI2 en cáncer mamario, Hu y colaboradores en el año 2007, analizaron el patrón de expresión de la proteína RhoGDI2 en 71 casos de pacientes con cáncer mamario, mediante las técnicas de inmunohistoquímica y la correlación de esta proteína con distintos parámetros clinicopatológicos; posteriormente, analizaron el grado de expresión del gene *RhoGDI2* en 4 líneas celulares de carcinoma mamario (MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MDA-MB-435) con diferente capacidad de metastásis; encontrando que un decremento de la proteína RhoGDI2 es inversamente proporcional al grado de invasión del carcinoma mamario, ya que de la fase de epitelio normal a hiperplasia demostró un marcado incremento de la proteína, mientras que en el estadio *in situ* a invasivo, el patrón de expresión de la proteína disminuyó; este fenómeno puede ser debido a que el incremento en la expresión de la proteína RhoGDI2 podría inhibir la progresión del cáncer mamario en etapas tempranas mientras que la expresión disminuida de la proteína contribuiría al desarrollo del carcinoma invasivo; por lo tanto, Hu y colaboradores, apoyados en los hallazgos de Zhang y Zhang en el 2006, propone nuevamente que la proteína RhoGDI2 es un biomarcador en potencia para ser

utilizado como indicador de metástasis en pacientes con carcinoma mamario *in situ* [77]. En ese mismo año, Schunke y colaboradores, reportaron al gene *RhoGDI2*, como un blanco para el factor de transcripción Ets2, conocido como un oncogen, en líneas celulares y en tumores primarios de mama, así también, la expresión de la proteína RhoGDI2 es coexpresada con este mismo factor de transcripción Ets1, sugiriendo que este evento es un posible mecanismo de regulación de la expresión de RhoGDI2 en células de carcinoma mamario. Además, encontraron que Cox-2, una proteína ligada con la disminución de la sobrevivencia en pacientes con carcinoma de mama, es un blanco de la proteína RhoGDI2, sugiriendo que este evento podría estimular la progresión tumoral, al menos en cáncer de mama [78].

Como se ha reportando por Scherle en 1993 [70], la proteína RhoGDI2 se expresa de manera abundante en células hematopoyéticas, donde posiblemente tenga un papel importante en procesos apoptóticos; un ejemplo de la expresión de estas proteínas es el perfil de expresión génica en líneas celulares de linfoma Hodgkin, donde la expresión de la molécula RhoGDI2 se encuentra disminuida; sin embargo, no se ha podido correlacionar la falta o ausencia de la expresión de esta proteína con procesos de crecimiento y sobrevivencia celular en estas líneas celulares de linfoma tipo Hodgkin [79].

La proteína RhoGDI2 se ha propuesto como supresora de metástasis en líneas celulares de carcinoma de vejiga [71]; así que para determinar cómo es que la proteína RhoGDI2 podría tener un papel supresor de la metástasis, Wu y colaboradores, realizaron ensayos de microarreglos de líneas celulares de cáncer de vejiga (T24T), presentando una disminución de la proteína RhoGDI2 y de Neuromedina U, una proteína asociada a la regulación del peso corporal, esto fue corroborado por ensayos de iRNA para la RhoGDI2, demostrando que los niveles de RNA de Neuromedina endógena se incrementan; por otro lado, la sobreexpresión de la proteína neuromedina U, promueve la formación de tumores en ratones desnudos. Aunque la relación entre RhoGDI2 y Neuromedina no ha sido elucidada hasta el momento, se propone que la Neuromedina U es un gen regulado por la proteína RhoGDI2, proceso que podría ser importante en procesos tumorigénicos como la metástasis pulmonar, considerándolo así, un blanco quimioterapéutico [80].

No fue hasta el año 2008, que Nakata y colaboradores, reportaron dos mutaciones puntuales en la proteína RhoGDI2, en líneas celulares de linfoma de células B, en donde la región que contenía estas dos mutaciones puntuales, V68L y V69L, se encontraban en una región parcialmente conservada también presente en la proteína RhoGDI1, y mediante modelos de predicción de estructura secundaria, se observó que podrían, ambas mutaciones, influenciar la región beta plegada de la proteína RhoGDI2; por otro lado, los resultados de los ensayos *in vitro* de disociación de GDP se vieron alterados, es decir, las proteínas RhoGDI2 con ambas mutaciones, no inhibieron la liberación del GDP marcado radioactivamente de las GTPasas; estos datos permitieron sugerir que, la proteína RhoGDI2 con ambas mutaciones funciona como una dominante negativa en las líneas celulares de linfoma de células B; tales resultados fueron reproducidos en los ensayos de invasión *in vivo*, en donde la sobreexpresión de las proteínas RhoGDI2 con ambas mutaciones aceleraron el proceso de invasión de las células cancerosas [81].

A través de un estudio de proteómica, Cho y colaboradores observaron que la proteína RhoGDI2 se encontraba sobreexpresada en tejidos de cáncer gástrico por lo que para corroborar estos datos, llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica en 26 cortes de carcinoma gástrico, demostrando que los cánceres gástricos avanzados tenían un patrón de inmunorreactividad fuerte de la proteína RhoGDI2, contrario a la débil señal de la proteína en carcinomas gástricos en estadios tempranos o en tejidos gástricos normales; conjuntamente, ensayos de invasión *in vivo e in vitro*, demostraron que la sobreexpresión de la proteína RhoGDI2 en líneas celulares de carcinoma gástrico, aumentaba el grado de invasión de células gástricas cancerosas y que el crecimiento tumoral, angiogénico y metastásico aumentaron de manera significativa; estas evidencias experimentales permitieron reiterar que esta proteína RhoGDI2 podría ser utilizada como un marcador de progresión tumoral en el carcinoma gástrico [82].

Hasta el año 2009, los grupos de estudios proponían que las proteínas RhoGDI2 podrían fungir como supresora de tumores, particularmente en el carcinoma de vejiga, así que Moissoglu y colaboradores en este mismo año, compararon el comportamiento de las proteínas RhoGDI1 y 2 en líneas celulares de carcinoma de vejiga, para comprender el mecanismo supresor de tumores; a través de ensayos de transfección y microscopía

demonstraron que el enriquecimiento de la GTPasa Rac en la membrana celular disminuye significativamente (80%) al sobreexpresarse la proteína RhoGDI1, mientras que la sobreexpresión de la proteína RhoGDI2 tiene menor efecto, 40%; este resultado permitió concluir que existe una menor interacción de las proteínas RhoGDI2 con las GTPasas, específicamente Rac1; sin embargo, decidieron analizar si a pesar de este hallazgo, el potencial supresor de metástasis era similar entre ambas GDI's, encontrando en los ensayos de *spreading*, el cual es una función celular altamente dependiente de las GTPasas Rac y Cdc42, en las transfectantes RhoGDI2 fue poco significativo comparado con las transfectantes RhoGDI1; por lo tanto, ni la disminución ni la sobreexpresión de la proteína RhoGDI2 denotó algún tipo de inhibición en las funciones de las GTPasas, entonces, cuáles son las GTPasas con las que interaccionan las proteínas RhoGDI2; respondiendo la incógnita con proteínas de recombinación mutantes RhoGDI2 (N174L) y (D182R), aumentando y disminuyendo su afinidad por las GTPasas respectivamente, encontrando que la GTPasa blanco principal fue Rac1. Por lo tanto, se propone que la interacción de RhoGDI2 con la GTPasa Rac1 promueve la inhibición de la metástasis solo que a través de mecanismos distintos a los ya reportados por las RhoGDI1 [83]. Posteriormente, mediante análisis de proteómica de líneas celulares de carcinoma de vejiga, se identificaron diferentes proteínas que interaccionan con las moléculas RhoGDI2, encontrando que una Src (Tabla 5) fue coimmunoprecipitada. Posteriormente, los ensayos de mutagénesis sitio-dirigida en el residuo Tyr-153 de RhoGDI2, demostraron una disminución en el grado de fosforilación de la RhoGDI2, así también, la formación de complejos Rac1-RhoGDI2 incrementándose la asociación de la RhoGDI2 a las membranas y aumentando el grado de invasión, sugiriendo que, el utilizar fármacos inhibidores de cinasas, como Src, deben de ser administrados con precaución, con la esperanza de retardar la muerte en pacientes con carcinoma de vejiga [84].

Tabla 5. Inmunoprecipitación utilizando la proteína RhoGDI2-Flag, denotando la presencia de la cinasa Src. Tomado de Wu y cols; 2009.

Protein	ACC	# expts	total peptides
P09493-4	P09493	2	11
Q8N274 Hypothetical protein FL	Q8N274	2	11
GDIS_HUMAN Rho GDP-dissociatio	P52566	2	9
TMO3_HUMAN Ubiquitous tropomod	Q9NYL9	2	6
SQRD_HUMAN Sulfide:quinone oxi	Q9Y6N5	2	2
SRC_HUMAN, [Schmidt-Ruppin A-2	P12931	2	2
SSB_HUMAN Single-stranded DNA-	Q04837	2	2
TBA4_HUMAN Tubulin alpha-4 cha	P05215	2	2

El grupo de Zhang y colaboradores, había detectado que los niveles de las proteínas RhoGDI2 se sobreexpresaban en algunas líneas celulares de carcinoma de mama [76], datos corroborados con la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI2 al abatirse el crecimiento tumoral como la metástasis en líneas celulares MDA-MB-231; demostrando que la asociación de las proteínas RhoGDI2 es específica de las GTPasas Rac1 y Rac3. Sumado a estos datos, la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI2 da lugar a la activación constitutiva de la GTPasa Rac1 que ha sido translocada del citosol a la membrana plasmática, activando a p38 y a la cinasa JNK. Consecuentemente, se sugiere que la proteína RhoGDI2 regula la función celular a través de la interacción, primordialmente con las GTPasas Rac, reiterando que la molécula RhoGDI2 es un potencial terapéutico [85].

En el año 2010 Niu y colaboradores, analizaron el papel de las moléculas RhoGDI2 en muestras de diversos tipos histopatológicos y líneas celulares de carcinoma pulmonar, tanto a nivel RNA y proteína, encontrando una fuerte correlación con la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI2 y el alto grado de malignidad tumoral, sugiriendo que esta molécula podría estar involucrada en el desarrollo del carcinoma pulmonar; a su vez, la expresión de las proteínas RhoGDI2 en las diferentes líneas celulares fue variable en cada una de ellas. Posteriormente, se enfocaron en el estudio de algunos eventos de señalización donde podría estar involucrada la proteína RhoGDI2, considerando entonces a la vía de señalización Akt, la cual se encuentra activada en varios tipos de cáncer pulmonar, proponiendo una posible interacción PI3K/Akt con la molécula RhoGDI2 activando o inhibiendo esta vía de señalización; por lo tanto, la proteína RhoGDI2 probablemente está involucrada en metástasis y comportamiento maligno en este tipo de cáncer [86].

Para el grupo de Stevens y colaboradores en el año 2011, se contaban con estudios de expresión de las proteínas RhoGDI2 limitados y ningún análisis funcional en carcinoma de ovario; por lo que analizaron los niveles de expresión de las proteínas RhoGDI2 en diferentes líneas celulares de carcinoma de ovario, encontrando que variaban significativamente de una línea celular a otra, con base en estos datos, determinaron

mediante ensayos de inmunohistoquímica la expresión de la molécula RhoGDI2 en muestras de pacientes con enfermedad quística de ovario y carcinoma de ovario, observando que se sobreexpresaba mayormente en aquellas muestras de pacientes con un carcinoma de ovario poco diferenciado contrario a los carcinomas mayormente diferenciados o en tejidos con enfermedad quística de ovario. Aunado a esta información, los ensayos de iRNA RhoGDI2, demostraron que las líneas celulares incrementaron el grado de invasión *in vitro* y crecimiento *in vivo*, apoyando el papel supresor de metástasis e invasión de las proteínas RhoGDI2 [87]. En el mismo año, el grupo de Rivera-Rosado, reveló mediante ensayos de inmunohistoquímica de tumores primarios de carcinoma mamario (n=165), el nivel de expresión de la proteína RhoGDI2, observando que esta proteína se expresa predominantemente en cánceres mamarios en etapas temprana, revirtiéndose el efecto en lesiones malignas y metastásicas. Estos datos sugieren que la molécula RhoGDI2 tiene una función dual en regular la progresión del cáncer mamario [88].

El panorama de la participación de la proteína RhoGDI2 en diferentes tipos de carcinoma, es ambiguo, ya que no se ha llegado a un consenso que permita, de manera contundente, clasificarlo como una proteína supresora de tumores, por tal motivo, diferentes investigadores han realizado esfuerzos por conocer cuáles son los mecanismos que regulan los procesos invasivos y/o metastásicos. Para el año 2012, Agarwal y colaboradores, valiéndose de ensayos de proteómica, encontraron que la proteína RhoGDI2 interacciona con la proteína Rictor, que forma parte del complejo mTOR, el cual participa en proceso reguladores de la metástasis, demostrando que la sobreexpresión de la molécula RhoGDI2, captura de manera más eficiente a las proteínas Rictor, lo cual da lugar a una bajar actividad de las GTPasas Rac1 y Cdc42, traducándose en una deficiencia en la migración celular [89].

La relación entre carcinoma de colon y las proteínas RhoGDI2 también ha sido motivo de enfoque y estudio; Li y colaboradores detectaron que el patrón de expresión de las proteínas RhoGDI2 en tejido canceroso de colon: 6 líneas celulares, 20 cortes frescos de y 120 piezas parafinadas, se encuentra aumentado en carcinomas de colon altamente

metastásicos, comparado con el bajo nivel de expresión en tumores con bajo grado de metástasis; además, los ensayos de sobreexpresión de la proteína demostraron una mayor movilidad, invasión y proliferación *in vitro*; probablemente activando la vía de señalización PI3K/Akt. Esta información propone que esta proteína RhoGDI2 podría ser de utilidad como un blanco molecular para tratamiento clínico en pacientes con carcinoma de colon [90, 91]. En la búsqueda de las posibles vías de regulación de las proteínas RhoGDI2 en el cáncer de pulmón, se ha demostrado una baja expresión de RhoGDI2 y una alta expresión de Versican, una molécula de la matriz extracelular. La participación de ambas moléculas en la progresión tumoral fue corroborada al demostrar que las proteínas RhoGDI2 suprimen la metástasis pulmonar en modelos de ratones mediante la reducción del proteoglicano Versican, sugiriendo que el microambiente inflamatorio tumoral disminuye, traducándose en una supresión de la metástasis [92].

Otro de los tópicos de gran preocupación por los científicos es la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos. Zheng y colaboradores en el año 2013, abordaron el tema de resistencia al tratamiento con 5-fluoracilo (5-FU) en pacientes con carcinoma gástrico, valiéndose de que RhoGDI2 es un marcador de mal pronóstico para el tratamiento con este fármaco en paciente con colcarcinoma. Para demostrar esto, los niveles endógenos de la proteína RhoGDI2 se lograron correlacionar con la resistencia con el fármaco 5-fluoracilo, adicionalmente, las células de carcinoma gástrico aisladas de pacientes con altos niveles de expresión de la proteína RhoGDI2 fueron mucho más resistentes al tratamiento con 5-FU. Esta información sugiere que esta proteína podría utilizarse como un blanco molecular para la sensibilización de las células cancerosas gásticas y también como un marcador pronóstico para el tratamiento quimioterápico en estos pacientes [93].

Las proteínas RhoGDI2, se expresan en tejidos, primordialmente, cerebro, pulmón, testículos y páncreas; sin embargo, se ha encontrado, por ensayos de microRNA's y proteómica [76, 94, 95], que se expresa en diferentes tejidos pero en condiciones fisiopatológicas, tales como diversos tipos de cáncer, como son mama y ovario. Sin embargo, el tema de la regulación de estas proteínas en condiciones fisiopatológicas, como el cáncer pancreático, en donde los estudios son escasos, no ha dilucidado el porqué este

tipo de cáncer tiene un alto grado de mortalidad, por lo que el grupo de Abiatari y colaboradores para conocer cómo es que el carcinoma pancreático invade el tejido neurológico implicando una alta mortalidad; encontró por ensayos de microarreglos, utilizando líneas celulares de carcinoma pancreático y un modelo *ex vivo* de invasión neuronal de tejido de rata [96] (Panc-1, Colo357 y T3M4), 680 transcritos, entre ellos, al transcrito de la proteína KIF14 y RhoGDI2. La proteína KIF14 es un miembro de la familia de las proteínas kinesinas, las cuales se encuentran involucradas en eventos biológicos como el transporte vesicular, formación del huso mitótico, segregación cromosómica y citocinesis. Este grupo de investigadores, identificó a la proteína KIF14 como una molécula supresora de la metástasis, además, el análisis de la expresión de esta proteína en tejidos de carcinoma pancreático, reveló una pérdida de la expresión de la proteína KIF14, mientras que se observó una disminución de esta en líneas celulares con un alto grado de invasión perineural (Fig. 17); este dato, permitió proponer a esta proteína como “anti-invasiva”. Respecto a la proteína RhoGDI2, Abiatari y colaboradores, demostraron *in vivo*, una sobre regulación de esta en las líneas celulares con alto grado de invasión perineural; aunado a esto, el silenciamiento de esta proteína RhoGDI2, disminuyó el grado de invasión perineural (Fig. 17). Abiatari y su grupo, apoyándose en estos hallazgos, sugieren que la sobrerregulación de la proteína RhoGDI2 en el carcinoma pancreático incrementa su capacidad de invasión perineural; sin embargo, el mecanismo por el cual ambas proteínas, KIF14 y RhoGDI2 inducen cambios en la invasión perineural, así como su asociación subcelular de ambas proteínas en esta patología, son desconocidos [97].

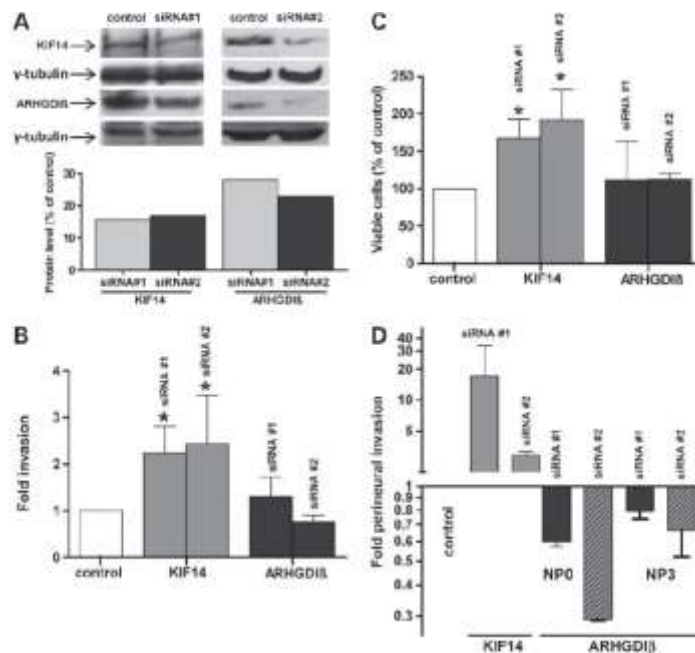


Figura 17. Inmunoblots y análisis densitométrico, demostrando la desregulación de la expresión de las proteínas KIF14 y RhoGDI2 en las línea celular T3M4, utilizando dos siRNA específicos distintos. A) Ensayos de invasión de matrigel; B) Ensayo de anoikis; C) invasión neural. NP= pasaje por tejido neurológico de rata, 0 a 3= el número de veces que pasaron por el tejido ex vivo neuronal de rata. Tomado de Abiatari y cols; 2009.

9.8.3 La importancia biológica de la proteína RhoGDI3

En el año de 1996, Zalzman y colaboradores, caracterizaron un tercer grupo de molécula reguladora de las GTPasas Rho, denominada RhoGDI3; mediante ensayos de doble híbrido, demostraron que las proteínas RhoGDI3 interaccionan con las GTPasas RhoG y RhoB; asu vez, demostraron que esta proteína es funcional y que estimula la liberación de las GTPasas RhoB unidas a GDP de las membranas en células HeLa; así como, es una proteína que inhibe el intercambio del GDP por el GTP en las GTPasas RhoB. Otro hallazgo fue que esta RhoGDI3 muestra una distribución específica de tejido, puesto que solo fue demostrada la expresión de esta molécula en tejido cerebral, pulmonar y testicular de ratón. Otro dato, fue la asociación de esta proteína proteína con las fracciones membranales, lo cual es opuesto a lo ya reportado en las proteína RhoGDI1 y RhoGDI2; esta característica es debido a que en su extremo amino terminal posee una estructura helicoidal altamente anfipática, con la secuencia LDXCEL [98]. En los año 97, Adra y colaboradores, demostraron que la proteína RhoGDI3, la cual comparte una identidad de aprox. del 50% con RhoGDI2 y RhoGDI1, podría interaccionar *in vitro* con las GTPasas RhoA y Cdc42; a

su vez, demostraron mediante estudios de sobreexpresión de RhoGDI3 en células de riñón de Hamster, un redondeamiento celular junto con la pérdida de la formación de fibras de estrés; estos hallazgos permitió a estos científicos, proponer a la molécula RhoGDI3 como una ventana importante de regulación sobre las GTPasas Rho [99]. Este mismo grupo de investigadores analizó la expresión del mRNA RhoGDI3 mediante ensayos de dot blot en diferentes tejidos, donde observaron altos niveles de expresión en cerebro, con variaciones de una región anatómica a otra; además, de altos niveles de mRNA en tejido renal y pancreático. Por otro lado, mediante ensayos de RT-PCR demostraron la expresión del gene RhoGDI3 en tejido exocrino y endocrino pancreático [100]. Otro hallazgo importante fue la estructura genómica de RhoGDI3; el gene se extiende 4Kb y se encuentra organizado en 6 exones y 5 intrones; las regiones “upstream” carecen de las regiones canónicas TATA box y contiene una amplia variedad de sitios de unión para factores ubicuos y factores presentes durante el desarrollo del sistema neurológico; por otro lado, utilizando la técnica FISH, mapearon el gene en el cromosoma 16p13.3, donde denota que esta banda es rica en deleciones de genes que han sido involucrados en diversas enfermedades como talasemia, esclerosis tuberosa, retraso mental y cáncer. Basados en estos hallazgos, se sugería que esta proteína RhoGDI3 era importante para investigaciones futuras en diversas patologías [100].

En el año 2002, Brunet y colaboradores investigaron la localización subcelular así como la actividad de la proteína RhoGDI3, donde a través de ensayos de transfección e inmunofluorescencia, demostraron que esta se encuentra tanto en citosol como en la fracción insoluble; específicamente en Golgi, donde observaron que la proteína RhoGDI3 actúa sobre la proteína RhoG pero no con la GTPasa RhoB *in vivo*. A su vez, determinaron que la GTPasa RhoG se encuentra asociada en el retículo endoplásmico y en el aparato de golgi en células HeLa, y que la proteína RhoGDI3 dirige a la proteína RhoG al aparato de Golgi; no obstante, establecieron que el extremo amino terminal alfa hélice es indispensable no solo para interactuar con el aparato de Golgi, sino también, para la estabilización de la interacción con la proteína RhoG; concluyendo que esta molécula sería la primera proteína GDI que se encuentra directamente involucrada en la entrega de una GTPasa Rho a un compartimento subcelular específico [101]. En el año 2005 Dansart y colaboradores identificaron dos sitios en la proteína RhoGDI3, As-66 y Asp 206, las cuales son

aminoácidos conservados e indispensables para la interacción con su GTPasa blanco, en donde las mutaciones impiden la inhibición de la extracción de la GTPasa RhoG mas no la interacción con ella [102, 103].

Hasta el año 2005, se sabía que la proteína RhoGDI3 era de expresión de tejido específico en cerebro; sin embargo, Ferland y colaboradores determinaron el patrón de expresión de las proteínas RhoGDI1 y 3 y el involucro de estas en el proceso de maduración neuronal en ratones, donde demostraron que ambas proteínas RhoGDI's tienen patrones de expresión que pueden sobrelaparse, ya que la delección de la proteína RhoGDI3 no provoca anomalías en el desarrollo neuronal, sugiriendo que no es una proteína esencial en este proceso y que probablemente, la proteína RhoGDI1 tiene un papel compensador sobre la RhoGDI3 [104]. Continuando con el estudio del proceso de diferenciación y desarrollo neuronal, Lu y su grupo de trabajo, determinaron que la proteína RhoGDI3 es un factor clave en la vía de señalización G13, basados en análisis de microarreglos; donde además, demostraron mediante la técnica de RNA de interferencia que la disminución de la expresión de la proteína modificaba la morfología de la línea celular neuronal troncal C17.2; además, determinaron que esta “desregulación” de la molécula RhoGDI3 podría regular a distintos genes como RhoA, Cdc42, Link y N-WASP; por lo tanto, estos hallazgos sugieren que las proteínas RhoGDI3 participan en el proceso de diferenciación neuronal [105]. En el año 2010, Morin y colaboradores con afán de conocer estructuras o moléculas que participan en el tráfico vesicular en conjunto con las proteínas RhoGDI3, mediando el ir y venir de la GTPasa RhoG entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática, identificaron a la molécula Exocyst subunidad Sec3 como una molécula candidata de interacción con la proteína RhoGDI3, donde solo pudieron demostrar que los niveles de la GTPasa RhoG-GDP aumentaron, induciendo formación de ondulaciones membranales así como la formación intercelular de tubulos que protruyen de la célula; por lo tanto, la proteína Exocyst subunidad Sec3 podría estar involucrada en las funciones de la GTPasa RhoG, posiblemente regulada por la proteína RhoGDI3 [106].

10. Moléculas RhoGDI's, como reguladores negativos de las GTPasas Rho

En el año de 1989, Ohga y colaboradores, encontraron un tipo de regulador para las proteínas RhoB aislada del intestino de conejo. Este grupo de investigadores observó que esta proteína contaba con propiedades bioquímicas diferentes a las moléculas ya conocidas GEF's y GAP's; particularmente, esta nueva proteína inhibía el intercambio de GDP por GTP; por tal motivo, se le consideró una molécula reguladora denominándola como una molécula inhibidora de la disociación de GDP de RhoB (RhoBGDI) [107]. Estudios subsiguientes demostraron que la actividad de esta nueva molécula no solo se reducía a RhoB, sino también, a todos los miembros de la familia Rho, concluyendo que es una molécula inhibidora de la disociación de GDP de diversas GTPasas Rho (RhoGDI) [108].

10.1 Proteínas RhoGDI's Humanas

Actualmente, en células humanas, se han descrito tres tipos de RhoGDI's denominadas RhoGDI- α , RhoGDI- β y RhoGDI- γ . La proteína RhoGDI- α ó RhoGDI-1, es de localización ubicua y de las tres RhoGDI's, la más abundante; RhoGDI- β también conocida como RhoLyGDI, RhoD4GDI ó RhoGDI2, la cual es específica de células hematopoyéticas, mientras que RhoGDI- γ ó RhoGDI3, se localiza de manera exclusiva en aparato de Golgi [98, 99].

La proteína **RhoGDI-1** ó RhoGDI- α , fue la primera proteína del grupo de las GDI en identificarse. Se encuentra codificada por el locus 17q25. [109]. Esta GDI es una proteína constituida por 204 aminoácidos y contiene 2 dominios, un dominio C terminal de 16 KDa, con la facultad de unirse a las GTPasas Rho y un dominio amino terminal, responsable de la unión a GDP e inhibición del intercambio de nucleótidos. La RhoGDI-1 tiene un amplio campo de acción capaz de formar complejos 1:1 con las GTPasa RhoA, RhoB, Cdc42, Rac1 y Rac2 isopreniladas [110]. Reportes concernientes a la afinidad de GDI-1 por las formas unidas de GTPasas unidas a GDP o las formas unidas a GTP, han mostrado que GDI-1 se une *in vitro* a estas proteínas cuando se encuentran unidas a GDP con una afinidad 10 veces mayor que para las formas unidas a GTP [111]. La proteína **RhoGDI-2** también denominada D4/Lys-GDI o RhoGDI- β fue encontrada primeramente como una proteína humana por Leffers en 1993; posteriormente fue caracterizada como RhoGDI

específicamente expresada en tejido hematopoyético murino y humano [70]. Esta proteína RhoGDI-2, está constituida por 201 aminoácidos y se encuentra expresada en tejido hematopoyético, predominantemente en líneas celulares de linfocitos B y T [112]; sin embargo, Adra y colaboradores en 1996, demostraron que es una proteína que se expresa también en tejido cerebral, proStático y pancreático. En cuanto a su función, la proteína RhoGDI-2, fue inicialmente descrita como inhibidora de la disociación de GDP de GTPasa RhoA; no obstante, se halló que es menos eficiente que la proteína RhoGDI-1 en un factor de 10 a 20; por lo tanto, RhoGDI-2, es una proteína incapaz de formar complejos estables con las GTPasas Rho [113]. La tercera proteína, **RhoGDI-3** conocida como RhoGDI γ , fue identificada por el grupo de Olofsson en 1997, como una proteína expresada en tejido cerebral murino. Subsecuentemente, se identificó en tejido humano, específicamente cerebro y páncreas. Es una molécula constituida por 225 aminoácidos y su locus se encuentra en la banda 16p13. Esta proteína RhoGDI-3, a diferencia de las otras dos proteínas RhoGDI's, contiene en su extremo amino terminal, 21 aminoácidos adicionales donde se encuentra el motivo LDXCEL, a través del cual se asocia a proteínas residentes en las membranas de las vesículas del aparato de Golgi. Estudios de inmunohistoquímica han revelado la presencia de esta proteína en citoplasma con una mayor concentración alrededor del núcleo y aparato de Golgi (Adra y cols., 1997) [99].

Se han atribuido diversas funciones a las proteínas RhoGDI's, una de ellas la transferencia o extracción de las proteínas GTPasas Rho de las membranas. Estudios bioquímicos y estructurales han dejado puntualizar que la modulación estructural, permite lograr una disrupción secuencial, dando lugar a la entrega de Rho a las membranas o la formación de complejos Rho-RhoGDI. Por otro lado, también se ha observado que, las cargas electrostáticas, también tienen un papel importante en estos mecanismos, ya que el extremo carbono terminal de las proteínas Rho se encuentra cargado positivamente, mientras que el extremo amino terminal de la proteína RhoGDI tiene carga negativa, encontrándose ambos extremos muy cerca durante la formación del complejo Rho-RhoGDI; de esta manera, la competencia por la unión con el extremo carbono terminal de las proteínas Rho entre las cabezas de lípidos cargados negativamente y las RhoGDI, permiten la entrega de las proteínas Rho a las membranas (Fig. 18) [114].

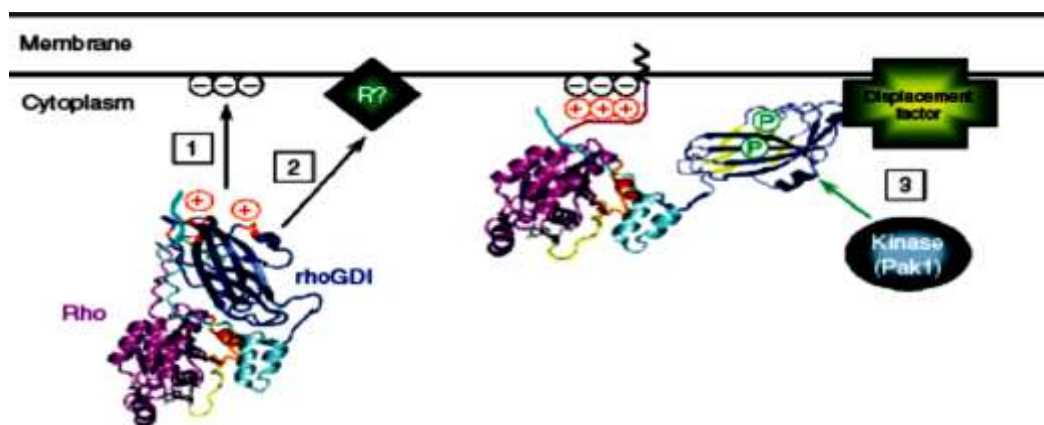


Figura 18. Modelo de la transferencia de las proteínas Rho a las membranas por acción de las RhoGDI's. 1) Atracción electrostática RhoGDI's; 2) reclutamiento de los complejos Rho-RhoGDI con sus receptores acoplados a membranas; 3) desestabilización de los complejos por factores de desplazamiento o por procesos de fosforilación (Dransart y cols., 2005).

10.2 Estructura de las RhoGDI's

Las proteínas RhoGDI's tienen diferentes actividades en el citosol, donde actúan como chaperonas para solubilizar a las proteínas Rho isopreniladas y como mediadores, monitoreando el intercambio de las proteínas Rho entre complejos protéicos y las membranas celulares. Estudios de NMR y cristalografía de rayos X, han permitido obtener las estructuras de las proteínas RhoGDI en sus formas unidas y no unidas a proteínas Rho, los resultados de estos estudios permitieron determinar que el extremo amino terminal no se encuentra plegado, adquiriendo una estructura diferente tras la unión a las GTPasas Rho. Este dominio se encuentra asociado con el dominio carbono terminal plegado, el cual presenta una hendidura o bolsillo de unión geranilgeranilado. Esta estructura permite a las RhoGDI's establecer una interacción bipartita con sus GTPasas blanco, donde el dominio carboxilo terminal se une al carbono terminal geranilgeranilado de la proteína Rho, reconociendo su región switch 2, y una región hélice-asa-hélice que reconoce a la región switch 1 [115]. El dominio carboxilo terminal tiene un plegamiento tipo inmunoglobulina, con un "pocket" de unión a lípidos unido entre dos hojas beta plegada. Esencialmente, no existe un "pocket" en las GDI's no unidas, sin embargo, desplazamientos mayores de 2.5 Å en la parte superior del "pocket" abren la cavidad cuando el lípido se une. Estos movimientos se encuentran articulados en bisagras de glicina, cerca del sitio de unión a las proteínas Rho y en residuos de serina, justo en el lado opuesto del dominio, que también se

ha descrito como un sitio para ser fosforilado. El dominio amino terminal, se cree que media el efecto GDI a través del motivo hélice-asa-hélice, el cual estabiliza la conformación del switch 1, cuya treonina (Thr35) es desplazada del ión Mg^{2+} por un puente de hidrógeno (Fig. 19) [114, 116].

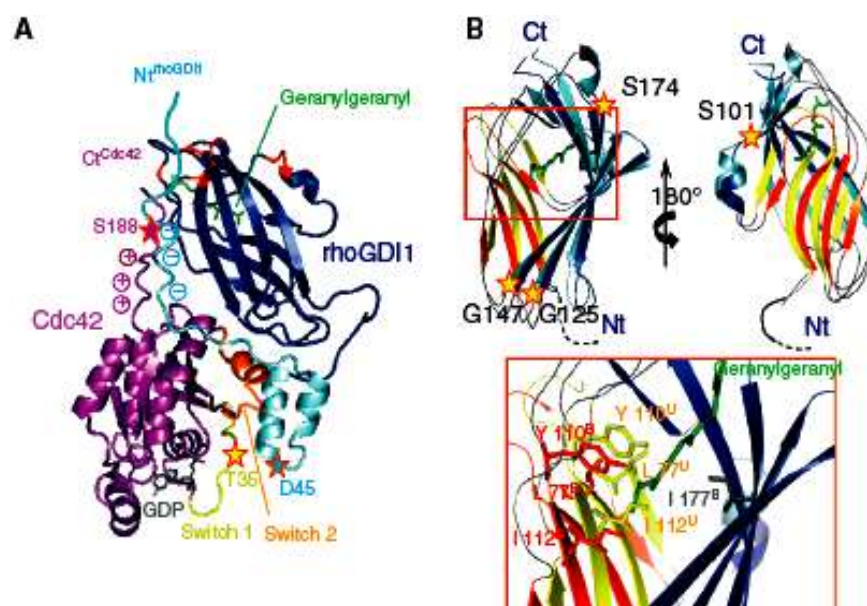


Figura 19. Estructura de las proteínas RhoGDI's. A) Estructura del complejo Cdc42/RhoGDI-1. RhoGDI-1: Dominio N-terminal, azul claro; dominio C terminal, azul y sus cargas positivas, rojo. Cdc42, violeta; regiones switch I y II, amarillo y naranja respectivamente. GDP, gris; grupo geranylgeranilo, verde. Residuos conservados (D)Asp45, (T)Thr35 y (S)Ser188, estrellas. B) Rearreglos del sitio de unión a lípidos de las RhoGDI's. El dominio C-terminal no unido, azul claro y amarillo ; complejo Cdc42-RhoGDI, azul y rojo, se superponen a una hoja β plegada. Las bisagras de la glicina y los sitios de serina, estrellas. Acercamiento de sitio de unión a lípidos de RhoGDI's, mostrando un impedimento estérico de los residuos con el grupo geranylgeranilo de las GTPasas Rho. Los exponentes B y U, refieren a las formas unidas y no unidas de las RhoGDI's-1 con las GTPasas Rho, respectivamente. Tomado de Dransart y cols., 2005.

10.3 Funciones de las RhoGDI's humana

Se han descrito tres actividades bioquímicas para las Rho GDI's (Olofsson, 1999); tales como la **inhibición de la disociación de GDP de las proteínas Rho**, manteniendo así a la GTPasa en su forma inactiva y previniendo la activación de las GTPasas por las GEF's; **Interaccionan con la forma de Rho unida a GTP**, impidiendo la función de las GAP's,

previniendo así la interacción con sus efectores [116] y **Modulan el ciclo de las GTPasas Rho** entre el citosol y la membrana, es decir, las RhoGDI's mantienen a GTPasas Rho como proteínas solubles en el citosol [117].

10.3.1 Regulación de las funciones de las RhoGDI's

Actualmente, se han descrito mecanismo básico que regulan las proteínas RhoGDI's, como, factores de desplazamiento y lípidos, así también, modificaciones postraduccionales en las proteínas RhoGDI's, como son la fosforilación y recientemente descrita la modificación postraduccional por SUMOilación [118-120].

Receptores y factores de desplazamiento

Los factores de desplazamiento son definidos como, un conjunto de proteínas que tienen la capacidad de interactuar con las proteína RhoGDI's, estimulando la disociación de las proteínas Rho del complejo Rho-GDI y/o la entrega de estas proteínas a la membrana. La primera familia propuesta como factores de desplazamiento, son las proteínas ezrina, radizina, moesina (ERM) [111], las cuales, entrecruzan la maquinaria del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática, el mecanismo de regulación por las proteínas RhoGDI's, se lleva a cabo a través del extremo amino terminal de la Radixina, el cuál, interactúa con la proteína RhoGDI *in vivo* e *in vitro*, llevándose a cabo, la activación de gran cantidad de proteínas Rho *in vitro* y la disociación del complejo RhoA-RhoGDI y la activación de RhoA *in vivo* [121]. Otro candidato como factor de desplazamiento de GDI, es el receptor de neurotrofina p75NTR en axones. Este receptor transmembranal funciona, tanto para estimular como para inhibir el crecimiento neurítico, dependiendo de sus ligandos, si son neurotrofina o proteínas derivadas de mielina tales como MAG y NOGO respectivamente. Una proteína descrita por Yamashita en el 2003, es el receptor P75 NTR, demostrando que, la sobreexpresión de este receptor P75 NTR, incrementa la liberación de la forma prenilada RhoA de RhoGDI [122]. Se han descrito otros receptores como factores de desplazamiento, como es el caso del receptor B de la cinasa relacionada con tropomisina truncada (T1), el cual, es una proteína expresada predominantemente en sistema neurológico central de mamíferos; esta proteína T1 se une a RhoGDI-1 y lo secuestra en la membrana plasmática, consecuentemente incrementando la actividad de RhoA. T1 libera RhoGDI-1 tras la unión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), permitiendo

el remodelamiento de citoesqueleto de actina en los astrocitos hipocampales y la inactivación de RhoA, Cdc42 y Rac1 [123].

También se ha reportado que las proteína RhoGEF's, las cuales son moléculas que promueven el intercambio de GDP por GTP, activando así a las proteínas GTPasas Rho, actúen como factores potenciales de desplazamiento, estando involucrados en la coordinación del alternamiento de las GTPasas Rho del citosol a la membrana y del intercambio de GDP por GTP. En este sentido, la proteína Vav1 ha sido reportado para unirse a RhoGDI-2 *in vivo*, mediada por su extremo amino terminal, permitiendo el desplazamiento de RhoGDI-2 de las proteínas Rho [114].

Lípidos

Además de los factores de desplazamiento y demás moléculas reguladoras de la activación de las RhoGDI's, se ha reportado a los lípidos, como moléculas involucradas en estos procesos de regulación; el mecanismo de acción de los lípidos, recae en la habilidad de disminuir la afinidad de las proteínas RhoGDI's por las GTPasas Rho y Rac *in vitro*; tales son el ácido araquidónico, ácido fosfatídico y PtdIns (4,5) P2 [124, 125]. Sin embargo, a pesar de los hallazgos, es un tema que se encuentra escueto y por dilucidar.

Fosforilación de las proteínas RhoGDI's

Una alternativa a las interacciones proteína-proteína como un medio para modular la actividad RhoGDI es la fosforilación, tanto de las GTPasa Rho como de las RhoGDI's. La fosforilación de las proteínas RhoA tiene como resultado la liberación de las GTPasas de la membrana, en contraste, la fosforilación de las RhoGDI's incrementa la entrega/activación de las GTPasas Rho [126]. Las proteínas RhoGDI's-1 también son fosforiladas específicamente en los residuos de serina101 y serina 174 por otra cinasa, PAK1; este proceso induce la liberación de Rac1 pero no de RhoA de las membranas; de esta manera, las proteínas RhoGDI's tienen una participación muy importante, dictaminando la especificidad de la entrega de las GTPasas Rho a su sitio de acción [127]. Recientemente, se demostró que la proteína RhoGDI-1 puede ser fosforilada por una Src Tirosina cinasa en la tirosina 156 tanto *in vivo* como *in vitro*, disminuyendo dramáticamente la interacción de las proteínas RhoGDI con las GTPasas tipo Rho, Rac y Cdc42 [128]. En el 2009, Wu y colaboradores describieron que la fosforilación de las proteína RhoGDI-2 en el residuo Tyr

153, permitiendo la liberación de Rac1 incrementando así, sus funciones supresoras de metástasis así como, una mayor localización subcelular a nivel de membrana (Wu y cols; 2009). Recientemente, Griner y colaboradores, identificaron a la serina 31 como un sitio de fosforilación en la proteína RhoGDI2, así también, demostraron que la PKC α es la cinasa encargada de fosforilarla, dando lugar a la disociación del complejo Rac-1-RhoGDI2, incrementando la activación de la GTPasa Rac-1 e imposibilitando a la RhoGDI2 para extraer a la GTPasa Rac1 de las membranas; estos hallazgos, permitió a este grupo de investigadores sugerir que la fosforilación por PKC α es un mecanismo potencial para inactivar a la proteína supresora de la metástasis RhoGDI2 [129].

SUMOilación de las RhoGDI- α

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas RhoGDI para interaccionar con las GTPasas, dependen de modificaciones postraduccionales, tales como las fosforilaciones; sin embargo, un reciente hallazgo de Yu y colaboradores en el año 2012, demostraron que la modificación postraducciona por SUMOilación es indispensable para que la proteína RhoGD- α ejerza su función de molécula reguladora negativa, es decir, inhibiendo las vías de señalización para reorganizar el citoesqueleto. De la proteína RhoGD- α de human, un análisis *in silico*, permitió determinar la existencia hipotética de tres sitios aceptores de grupos SUMO, en los residuos de lisina 199, 138 y 105, los cuales decidieron mutar, encontrando que, de los tres sitios mutados, solo la K138A, era el residuo susceptible de SUMOilarse [119]. A su vez, evaluaron a nivel de alteraciones morfológicas y en la polimerización de actina, observando pues que la expresion de la RhoGDI K138 inducía significativamente la formación de fibras de estrés. Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que la SUMOilación de la proteína RhoGD- α en la lisina 138 es crucial para que esta molécula lleve a cabo su efecto inhibitorio en la polimerización de actina (Fig.20) [119]. Además, la molécula RhoGDI1-1 SUMOilada permite la activación de la vía de señalización MEK1/2-Erk-AP-1 cascade, aumentando la transcripción de ciclina D1, impidiendo el arresto [120]

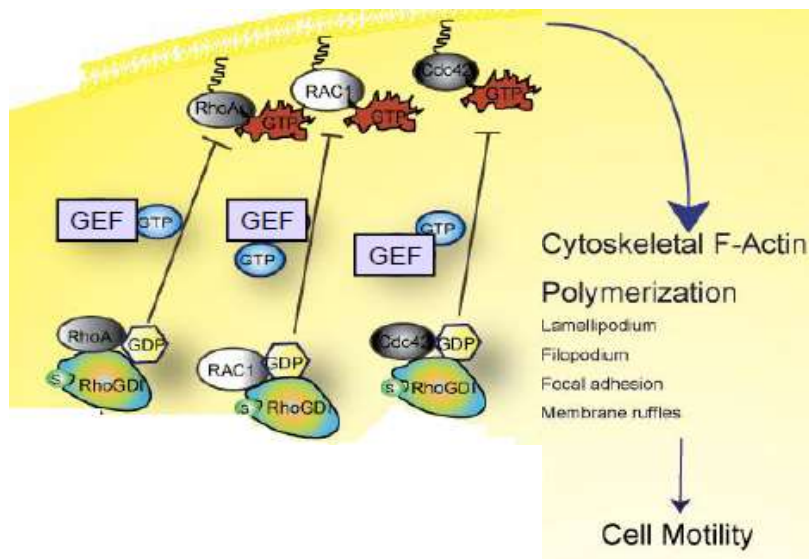


Figura 20. Modelo de regulación de la proteína RhoGDI SUMOilada en la regulación del citoesqueleto durante la movilidad celular. La proteína RhoGDI SUMOilada regula negativamente la actividad de las GTPasas de la subfamilia Rho (RhoA, Rac1, and Cdc42) dando lugar a la inactivación de las GTPasas Rho, impidiendo se lleve a cabo la polimerización de actina y por lo tanto, la migración celular, invasión y metástasis. Tomado y modificado de Yu y cols, 2012.

11. JUSTIFICACIÓN

Grupos de investigación se han enfocado en entender la implicación de las proteínas RhoGDI's en el PDAC, particularmente las proteínas RhoGDI1 y RhoGDI2; sin embargo, la participación de la proteína RhoGDI3 en relación con cáncer y particularmente con PDAC, no ha sido estudiado.

Actualmente, solo se ha reportado que la proteína RhoGDI3, es una molécula que participa en la regulación de las GTPasas de la familia Rho, tales como RhoG y RhoB, moléculas clave en eventos celulares como movimiento y migración celular, así como, actividad anti-tumorigénica; por lo que el estudio de esta proteína y sus blancos moleculares nos permitirá entender su contribución en esta entidad patológica.

12. HIPOTESIS

- **Si la proteína RhoGDI3, es una molécula importante en la regulación de la GTPasa RhoG y RhoB, involucradas en movimiento y migración celular; así como, actividad anti-tumorigénica, entonces, el aumento del nivel de la proteína RhoGDI3 en las líneas celulares de carcinoma pancreático promueve un mayor grado tumoral ocasionado por estas.**

13. OBJETIVO GENERAL

- **Caracterizar molecular y funcionalmente las proteínas RhoGDI3 y sus GTPasas blanco, RhoG y RhoB en las líneas celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático y en tejido de biopsias y autopsias humanas.**

14. OBJETIVOS PARTICULARES

In vitro

- **Conocer la presencia y los niveles de la proteína RhoGDI3, así como sus GTPasas blanco RhoG y RhoB en las líneas celulares hTERT-HPNE, BXPC 3, PANC-1,**
- **Determinar la localización subcelular de la proteína RhoGDI3, así como sus GTPasas blanco RhoG y RhoB en las líneas celulares hTERT-HPNE, BXPC 3, PANC-1.**
- **Medir los nivel de activación de las GTPasas RhoG, Rac-1 y RhoB en las líneas celulares hTERT-HPNE, BXPC 3, PANC-1.**
- **Determinar la contribución funcional de la proteína RhoGDI3 la línea celular PANC-1**

En tejido

- **Analizar el patrón de inmunoreactividad de las proteína RhoGDI3 y sus GTPasas blanco RhoG y RhoB en muestras de tejido pancreático sano y PDAC derivado de autopsias**

15. EXTRATEGÍA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental seguida fue la siguiente (Fig. 21)

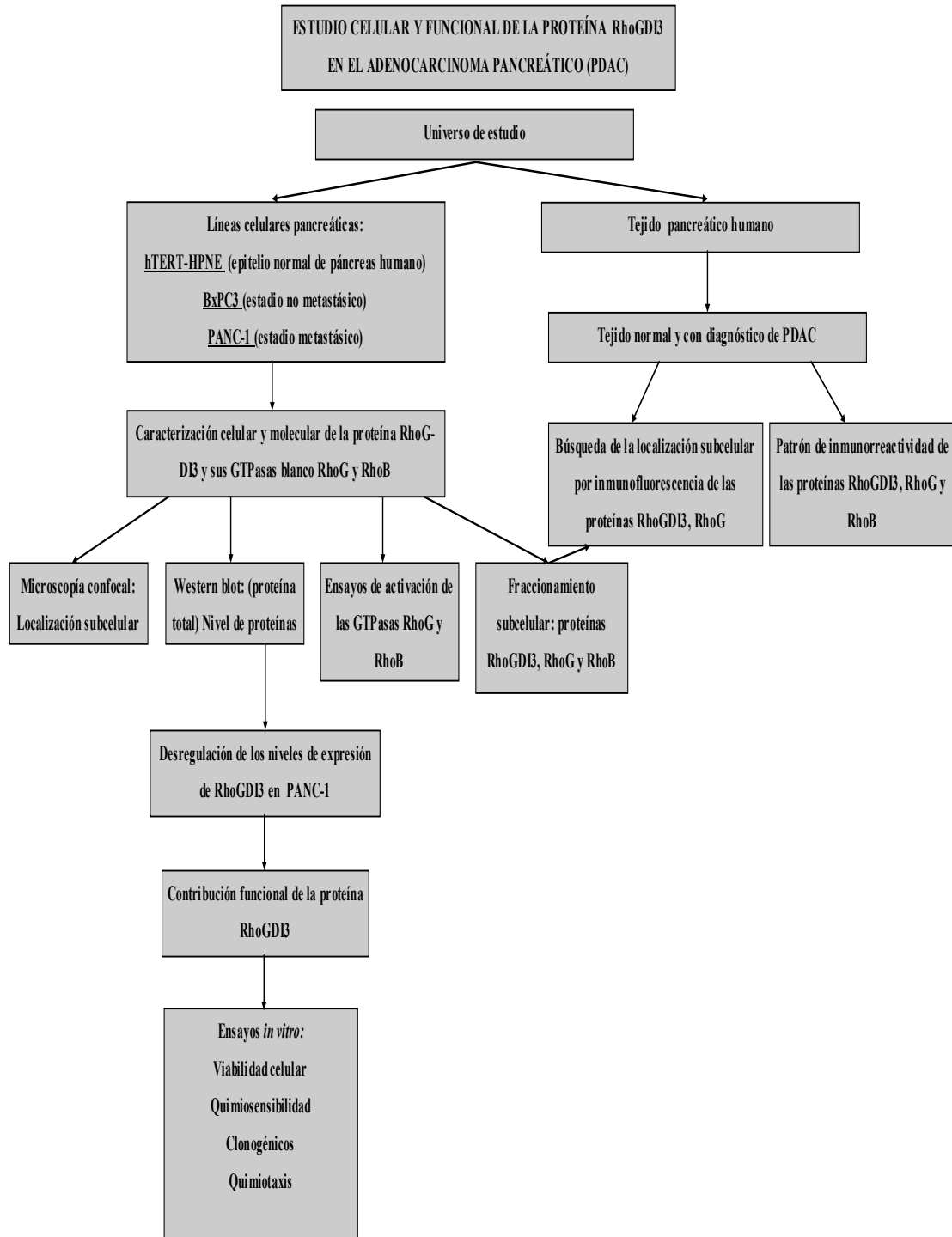


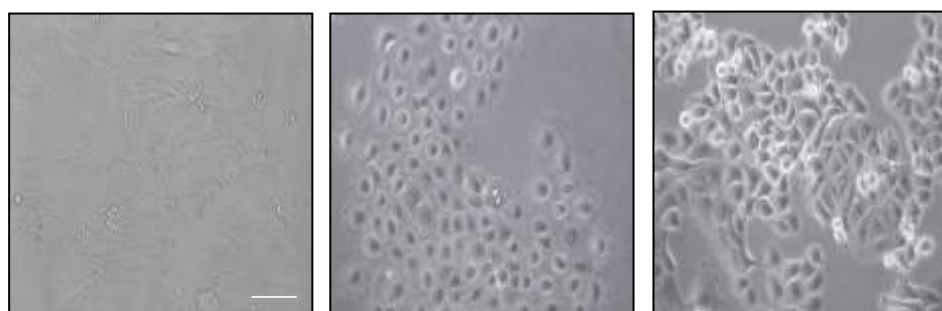
Figura 21. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

Líneas celulares de adenocarcinoma pancreático

Las líneas celulares de PDAC fueron seleccionadas bajo los siguientes criterios: especie humana, tejido ductal, capacidad tumorigénica alta y baja. La línea celular PANC-1 (ATCC® CRL-1469™, Manassas, VA) fue descrita como una línea celular altamente metastásica debido a que esta fue aislada de un adenocarcinoma en la cabeza del páncreas, el cual ya presentaba invasión en la pared duodenal evidenciando además la metástasis en un nódulo linfático peripancreático. [130]. La línea celular BxPC3 (ATCC® CRL-1687™, Manassas, VA), fue obtenida de un tumor circunscrito en el cuerpo del páncreas, el cual no evidenció presencia de metástasis [131] así como resistencia a gemcitabine, medicamento quimioterápico de primera elección para el tratamiento del PDAC. La línea celular control utilizada fue una línea celular derivada de tejido normal ductal de adenocarcinoma pancreático, llamada hTERT-HPNE (ATCC® CRL-4023™, Manassas, VA) (Tabla 6, Fig. 22).

Tabla 6. Líneas celulares pancreáticas humanas.

Línea celular	Organismo	Tejido	Mutaciones genéticas	Tumorigénico	Sensibilidad a Gemcitabine
Panc-1 (CRL-1469)	<i>Homo sapiens</i> (human)	carcinoma epitelioide (ductal) Aislado de cabeza de páncreas, metástasis a duodeno	K-ras, p53, p16	Desarrollo tumoral en 48 horas	Resistente
BxPC-3 (CRL-1687)	<i>Homo sapiens</i> (human)	Adenocarcinoma pancreático in situ	p53, p16, DPC4	Sí, desarrollo de tumor en 21 días al 100% en ratones desnudos. Frecuencia 5/5	Sensible
hTERT-HPNE (CRL-4023)	<i>Homo sapiens</i> (human)	Pancreas, ductal	+ telomerasa, fallo para envejecimiento	No	No determinado



hTERT-HPNE

BxPC3

PANC-1

Figura 22. Micrografías representativas de las líneas celulares derivadas de tejido pancreático. A) hTER-HPNE, línea celular derivado epitelio normal pancreático humano. B) BxPC3, línea celular derivada de adenocarcinoma pancreático sin evidencia de metástasis. C) PANC-1, línea celular derivada de adenocarcinoma pancreático con evidencia de invasión a pared duodenal y ganglios peripancreáticos. Micrografías en contraste de fases. Escala 100 µm.

Cultivo de las líneas celulares de PDAC

El cultivo de cada una de las líneas celulares, se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Brevemente, la línea celular hTERT-HPNE, se cultivó en un medio constituido por 75% de DMEM sin glucosa, 25% de medio M3 base, 5% de suero bovino fetal, 5.5mM de D-Glucosa, 750ng/mL de puomicina y 10ng/uL de Factor de crecimiento epidermal. La línea celular BxPC3, se cultivó en un medio constituido por medio RPMI 1640 modificado por ATCC y 10% de suero bovino fetal. La línea celular PANC-1 fue cultivada con el medio constituido por medio DMEM y suero bovino fetal al 10%. Las líneas celulares fueron sembradas en cajas petri de 100 y 60 mm de diámetro.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en las técnicas celulares y moleculares fueron los siguientes: anticuerpos monoclonales anti-ratón: anti-RhoGDI3 (H95, sc-367757, Santa Cruz, CA), RhoGDI2 (sc-365663, Santa Cruz, CA), RhoGDI3 (E10, sc-365663, Santa Cruz, CA), RhoG (1F B3 E5, sc-80015, Santa Cruz, CA) and RhoB (sc-8048, Santa Cruz, CA), 58K Golgi protein (Ab27043, Cambridge, MA), anti-GFP (cell signaling, USA); anticuerpos policlonales anti-conejo: anti-RhoGDIgamma (MBS710991, San Diego, CA), Rac1 (Cytoskeleton GL07, Denver, CO), Histone H3 (Ab1791, Cambridge, MA), Aldolasa B (ab75751, Cambridge, MA), anti-Flag (8146, Cell signaling, USA). Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa anti-conejo (Invitrogen 626520); anti-ratón, (656120, Waltham, MA) a acoplados a Alexa Fluor 488 (anti-conejo y anti-ratón, Molecular probes A21057, A11034, Waltham, MA) o acoplados a Alexa Fluor 680 (anti-ratón, Molecular probes A21057, Waltham, MA).

Obtención RNA total de líneas celulares derivadas de PDAC

El RNA total de de las líneas celulares hTERT,-HPNE, BxPC3 y PANC-1 fue obtenido utilizando el kit comercial TRIzol (LIFE TECHNOLOGIES, USA), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Brevemente, 1×10^8 células fueron lisadas con 1 mL de TRIzol a temperatura ambiente durante una incubación de 5 min. Posteriormente se les adicionó 6 μ l de cloroformo y se mezclará utilizando vortex durante 30 segundos. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm / 4°C / 15 min. La fase acuosa conteniendo el RNA se recuperó y precipitó al adicionar 500 μ l de isopropanol a temperatura ambiente durante 10 min. La muestra se centrifugará a 14 000 rpm / 4°C / 15 min, y la pastilla de RNA total se lavó con etanol al 70 %. El RNA fue resuspendido en 50 μ l de agua tratada con DEPC para ser digerida posteriormente con DNAsa para eliminar el DNA genómico contaminante. Se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa al 1%.

Ensayo RT-PCR

Para la síntesis del cDNA, se utilizó el kit comercial AffinityScript Multiple Temperature cDNA Síntesis kit de Stratagene®. Brevemente; se utilizó 1 μ g de ARN total, agua libre de RNAasas (tratada con DEPC) a un volumen total de 15.7 μ l, 1.0 μ l (0.1 μ g / μ l) del oligonucleótido específico antisentido diseñado hacia el extremo 3' del gen RhoGDI3: 5' tcagtccttccagtcctggcagat3'. La reacción se incubó a 65°C durante 5 min, posteriormente 10 minutos a temperatura ambiente, después, se adicionó la enzima RT StrataScript dejando incubar durante 1 hora a 42 grados. Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo una reacción de PCR anidada utilizando oligonucleótidos específicos: sentido 5' ATGCTGGGCTGGACGCGTG3' y antisentido 5' TCAGTCCTTCCAGTCCTGGCAGAT 3'. La concentración de los oligonucleótidos y la temperatura de alineamiento fueron calculados de acuerdo a las fórmulas siguientes: Concentración de los oligos: $D.O. \times 100 / [(A + G) \cdot 14] + [(C + T) \cdot 7]$ y para la temperatura de alineamiento $T_m = [(A + T) \times 2] + [(C + G) \times 4] - 5$. Posteriormente, se verificó en un gel de agarosa al 1% la presencia del amplicón en el tamaño esperado de 678bp.

Clonación del inserto RhoGDI3 en el vector de clonación PCR 2.1

La secuencia codificante para la proteína RhoGDI3 amplificada utilizando cDNA como cadena molde, se migró en un gel de agarosa al 1% y el amplicón fue cortado del gel y purificado. Posteriormente, el fragmento purificado se clonó en el vector

pCR 2.1 (Invitrogen, USA). La construcción fue empleada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α y obtener las colonias candidatas a contener el vector analizándolas mediante la técnica de PCR.

Transformación de bacterias *E. coli* DH5- α con el plásmido pCR2.1-RhoGDI3

Para la transformación se utilizaron 200 μ l de células de *E. coli* DH5 α a los que se le añadieron 10 μ l (500 ng) del plásmido pCR2.1-RhoGDI3, mezcla que se dejó incubar en hielo por 30 min para después incubar por 2 min a 42°C. Posteriormente se colocó nuevamente en hielo por 2 min y se le adicionó 1ml de LB para dejarlo incubar a 180 rpm /1 hr / 37°C. Se centrifugó a 3000 rpm / 5min / temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, se le adicionó al pellet 100 μ l de LB y homogeneizó. Después la muestra fue plaqueada sobre cajas de LB/ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Para seleccionar las colonias con el inserto de interés se realizó PCR de colonia y posteriormente se eligió una de las colonias positivas para la obtención del DNA plasmídico y confirmar la secuencia del inserto contenida en el plásmido mediante secuenciación automática

Western Blotting de proteínas totales obtenidas de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1

Los western blots fueron llevados acabo utilizando extractos totales de las monocapas de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3, and PANC-1. Las células fueron lisadas con el buffer RIPA conteniendo un cocktail inhibidor de proteases 1X (Roche 11873580001, Indianapolis, IN) y cocktail inhibidor de fosfatasas 1X (Roche 49068450001, Indianapolis, IN). Las muestras de proteínas fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C; al sobrenadante se le agregó buffer de Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos. La concentración de protein fue determinada utilizando el método de Lowry (DC Protein assay, BioRad 500-0114, Hercules, CA). Posteriormente, 20 μ g de protein fueron separados en un gel SDS-PAGE a una concentración del 12% y transferido a membranas de PVDF (Millipore IPVH00010, Billerica, MA) con un amperaje de 200 mA durante 2 horas a 4°C. Después de bloquear las membranas con TBS con tween 20 al 0.1% con 5% de leche descremada, las membranas fueron incubadas toda la noche 4°C en el mismo

buffer adicionando los anticuerpos primarios anti-RhoGDIgamma (1:1000), anti-RhoGDIbeta (1:500), anti-RhoGDI3 (1:200), anti-RhoG (1:200), anti-RhoB (1:200), anti-Rac1 (1:500), anti-Histone H3 (1:15,000), o anti-Aldolase B (1:5000). Después, las membranas fueron lavadas 4 veces con el buffer TBS-0.1% Tween 20 e incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (anti-rabbit, 1:6000; anti-mouse, 1:1000) por una hora a 37°C. Las membranas fueron lavadas con TBS en tres ocasiones a 37°C. Las membranas fueron visualizadas con el sistema de imagen ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West_Pico (Thermo Scientific 34079, Waltham, MA).

Localización subcelular de la proteínas RhoGDI3, RhoG y RhoB por microscopía confocal

Las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1 fueron sembradas sobre cubreobjetos (Tedpela 26020, Redding, CA) recubierto con poly-D-Lysine, lavadas dos veces con PBS pH 7.3 y después fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con 0.1% de Tritón X-100 por 3 minutos a una temperatura de 37 minutos a 37°C. Para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo, se usó un buffer bloqueador conteniendo PBS-BSA 1% (BSA was fraction V, IgG free, SIGMA, St. Louis, MO). Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios (anti-RhoGDIgamma (1:120), anti-RhoG (1:100), anti-RhoB (1:100), anti-58k (1:500) durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al siguiente día, las células fueron lavadas dos veces con PBS-BSA 1% e incubadas con los anticuerpos secundarios (anti-rabbit conjugado con Alexa Fluor 488 (1:500) y un anti-mouse conjugado con Alexa Fluor 680 (1:300)). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Una vez terminado el tiempo de incubación, se enjuagó cada cubreobjeto con agua MilliQ filtrada y se montaron sobre portaobjetos utilizando de 6µL de Vectashield sellándolos con barniz transparente. Las imágenes fueron capturadas usando el microscopio confocal Olympus FV-300 (Melville, NY) con los objetivos 60X y 100X.

Inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1 estimuladas con factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (rhEGF)

Los ensayos de inmunofluorescencia de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1 estimuladas con rhEGF, fueron obtenidos acorde a la metodología descrita por Samson con algunas modificaciones [132]. Brevemente, las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 and PANC-1 fueron plaqueadas sobre cubreobjetos a una densidad 1×10^4 cells por cubreobjetos. Después de 24 horas, las células fueron sometidas a un ayuno de 6 horas utilizando el medio DMEM conteniendo 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA). Una vez concluidas las 6 horas, el medio fue reemplazado con DMEM-0.5% de BSA al cual se le adicionó rhEGF (G502A, SIGMA, St. Louis, MO) a una concentración final de 100 ng/ml durante diferentes periodos de tiempo, 0, 2 y 10 minutos. Posteriormente, las células fueron tratadas tal y como se describió en la sección anterior. Para teñir las estructuras de F-Actina, las células fueron confrontadas con faloidina rodaminada (Invitrogen R415, Carlsbad, CA) durante una hora. Las imágenes fueron capturadas usando el microscopio confocal Olympus FV-300 (Melville, NY) con los objetivos 60X y 100X.

Fraccionamiento subcelular de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1 estimuladas rhEGF

La separación de las fracciones nucleares y citosólicas de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 and PANC-1 se realizó de acuerdo al método descrito previamente por Paulo y colaboradores [133]. Brevemente, las células fueron sembradas en cajas petri de 100 mm, después de 24 horas, las células fueron sometidas a un ayuno de 6 horas utilizando el medio DMEM conteniendo 0.5% de BSA. Una vez concluidas las 6 horas, el medio fue reemplazado con DMEM-0.5% de BSA al cual se le adicionó rhEGF (G502A, SIGMA, St. Louis, MO) a una concentración final de 100 ng/ml durante diferentes periodos de tiempo, 0, 2 y 10 minutos. Una vez concluidos los tiempos, las células fueron lavadas con PBS pH 7.3, seguido de la adición de 500 μ l de buffer de fraccionamiento (250 mM sacarosa, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X). Las células fueron colectadas con raspadores y lisadas utilizando una jeringa de calibre 25 G homogeneizándolas

durante 10 pases e incubadas sobre hielo durante 30 minutos. La pastilla que contuvo la fracción nuclear fue extraída por centrifugación a 720 ×g durante cinco minutos. Los sobrenadantes que contenían la fracción citosólica fueron colocados en un tubo eppendor nuevo y rotulado. Las pastillas nucleares fueron lavadas con 500 µl del buffer de fraccionamiento y disgregados con la pipeta. Los nucleos fueron lisados utilizando una jeringa de calibre 25 G homogeneizándolas durante 10 pases y centrifugados a 720 ×g durante cinco minutos. Se colocaron 50 µl de buffer de fraccionamiento y se sonicaron brevemente durante tres segundos sobre hielo. Las concentraciones de proteínas fueron determinadas utilizando el método de Lowry. Ambas fracciones, nuclear y citosólica fueron resuspendidas en buffer de Laemmly 2X. Aproximadamente 20 µg de los lisados celulares fueron migrados en un gel SDS-PAGE al 15%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y analizadas mediante western blot. Para demostrar la pureza de la fracción nuclear, se utilizó el anticuerpo anti-histona H3; para la pureza de la fracción citosólica se utilizó anti-Aldolasa B.

Ensayos de activación tipo pulldown de las GTPAsas RhoG y RhoB

La actividad de la GTPasa RhoB fue evaluada usando ensayos tipo pulldown utilizando como proteína carnada ELMO1-GST expresada en la cepa bacteriana *DH5-α* como una proteína fusionada a la bandera GST (plásmido donado amablemente por el Dr. Michael Schnoor). Brevemente, para la expresión y traducción de la proteína, la cepa bacteriana *DH5-α* transformada con el vector, fue crecida en medio LB durante toda la noche a 37°C, posteriormente, las bacterias fueron resuspendidas en PBS y DTT para su ruptura por sonicación. Subsecuentemente, fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, a los sobrenadantes se les agregó Tritón-X 100 al 10%. La proteína GST-ELMO1 fue purificada mediante la incubación con perlas de Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) durante un período de una hora seguido de 3 lavados con PBS pH 7.3. Las perlas se dejaron resuspendidas en 200 µl a 4°C para su posterior uso.

Para medir la actividad de las GTPasas RhoG y RhoB, las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 and PANC-1 fueron tratadas con el rhEGF. En breve, las células fueron sembradas en cajas petri de 100 mm, una vez que alcanzaron una

confluencia de aproximadamente 70%, las células fueron sometidas a un ayuno de 6 horas utilizando el medio DMEM conteniendo 0.5% de BSA. Una vez cumplidas las 6 horas, el medio fue reemplazado con DMEM-0.5% de BSA al cual se le adicionó rhEGF (G502A, SIGMA, St. Louis, MO) a una concentración final de 100 ng/ml durante diferentes períodos de tiempo, 0, 2 y 10 minutos. Una vez concluidos, las células fueron lavadas con PBS pH 7.3, seguido de la adición de 500 µl de buffer de lisis frío (1% Triton, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas 1X). Los lisados fueron clarificados mediante centrifugación a 10,000 x g a 4 °C durante diez minutos, posteriormente colectados y colocados sobre hielo para su cuantificación. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Lowry.

Para medir la carga de nucleótidos de GTP en las GTPasas RhoG y RhoB, se utilizaron 400 µg de proteínas, las cuales fueron incubadas con 10 mM de EDTA y 10 mM GTPγS durante 15 minutos a 30°C con agitación constante a 200 rpm. Para detener la reacción, MgCl₂ fue adicionado a una concentración final de 60 mM. La reacción fue incubada con las perlas de glutation sefarosa acopladas con la protein GST-ELMO (50 µg) previamente purificadas; y con las perlas comerciales Rhotekin-RBD (50 µg) (Cytoskeleton RT02, Denver Co) durante una hora a 4°C en rotación constante. Una vez terminada la incubación, las perlas fueron lavadas tres veces con el buffer de lysis de cada extracción. Posteriormente, las muestras fueron eluidas en buffer de Laemmli 2x, separadas en un gel SDS-PAGE a una concentración del 15%, transferidas a una membrana de PVDF y analizadas mediante western blot usando los anticuerpos anti-RhoG, anti-RhoB, anti-Rac-1 y anti-GAPDH.

Estatutos bioéticos

Este trabajo cumple con las leyes de salud mexicanas y fue abrobado por los comités de Investigación y del Comité de Ética en Investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez, con el número de protocolo 12-36-2014.

Como universo de estudio fueron considerados bloques parafinados de muestras de tejido pancreático histológicamente normal derivado de autopsias y bloques parafinados de muestras transquirúrgicas con el diagnóstico histológico de PDAC, patologías crónicas y otro tipo de patologías. El tamaño de la muestra fue considerado en un número no menor a 15 muestras de tejido pancreático

histológicamente normal derivado de autopsias y a conveniencia aquellas muestras que fuera posible localizar en la histoteca del departamento de Patología del Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez. Como criterios de inclusión, se utilizaron aquellos parafinados de tejido pancreático histológicamente normal derivado de autopsias y muestras transquirúrgicas con el diagnóstico histológico de PDAC; todos los bloques parafinados no mostraron evidencia histológica de displasia, validado por un anatomopatólogo y con expediente clínico existente y completo. El criterio de eliminación considerado fue la muestra insuficiente o muestra no localizable.

Inmunodetección de las proteínas RhoGDI3 y RhoG mediante inmunofluorescencia (IF) en tejidos humanos pancreáticos

Se analizaron muestras de tejido pancreático humano embebidos en parafina derivado de autopsias: 3 biopsias de tejido normal de páncreas y 3 biopsias con el diagnóstico histológico y clínico de PDAC los cuales fueron obtenidos en el servicio de patología del Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez. Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: se obtuvieron cortes de las muestras parafinadas con un grosor 5 μ m, las cuales fueron montadas sobre laminillas precargadas (Am-Labs-1500, Boulder, CO). Los cortes fueron desparafinados y rehidratados utilizando alcoholes a diferentes concentraciones: Xileno-etanol 1:1 (3 min), 100% etanol (3 min), 95% etanol (3 min), 70% etanol (3 min), 50 % etanol (3 min). La recuperación antigénica se llevó a cabo por el método de olla de presión/microondas utilizando citrato de sodio pH 6.0 como solución de desenmascaramiento e hirviendo en la olla de presión, la cual fue colocada en el horno de microondas a una potencia de 1000 watts, durante cinco minutos. Las laminillas fueron retiradas de la olla y colocadas en un baño de agua a temperatura ambiente, hasta que alcanzaron una temperatura de 24 °C. Las laminillas fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con 0.1% de Tritón X-100 por 3 minutos a una temperatura de 37 minutos a 37°C. Para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo, se usó un buffer bloqueador conteniendo PBS-BSA 1% (BSA was fraction V, IgG free, SIGMA, St. Louis, MO). Las células se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-RhoGDI γ (1:120) y anti-RhoG (1:100) durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al siguiente día, las células fueron lavadas dos veces con PBS-BSA 1% e incubadas con los anticuerpos secundarios (anti-

conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:500) y un anti-mouse conjugado con Alexa Fluor 680 (1:300). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Una vez terminado el tiempo de incubación, se enjuagó cada cubreobjeto con agua MilliQ filtrada y se montó sobre portaobjetos utilizando 6µL de Vectashield sellándolos con barniz transparente. Las imágenes fueron capturadas usando el microscopio confocal Olympus FV-300 (Melville, NY) con los objetivos 60X y 20X.

Inmunodetección de las proteínas RhoGDI3, RhoG y RhoB mediante inmunohistoquímica (IHQ)

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: se obtuvieron cortes de las muestras parafinadas con un grosor 5 µm, las cuales fueron montadas sobre laminillas precargadas (Am-Labs-1500, Boulder, CO). Los cortes fueron desparafinados y rehidratados utilizando alcoholes a diferentes concentraciones: Xileno-etanol 1:1 (3 min), 100% etanol (3 min), 95% etanol (3 min), 70% etanol (3 min), 50 % etanol (3 min). La recuperación antigénica se llevó a cabo por el método de olla de presión/microondas utilizando citrato de sodio pH 6.0 como solución de desenmascaramiento e hirviendo en la olla de presión, la cual fue colocada en el horno de microondas a una potencia de 1000 watts, durante cinco minutos. Las laminillas fueron retiradas de la olla y colocadas en un baño de agua a temperatura ambiente, hasta que alcanzaron la temperatura de 24 °C. Se decantó el agua destilada y se agregó solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% e incubó por 5 minutos, una vez terminada la inhibición de la peroxidasa endógena se realizaron 3 lavados con agua destilada. Para bloquear el reconocimiento inespecífico, se colocó una solución conteniendo PBS-BSA al 1% e incubó durante 5 minutos. Se permeabilizó la muestra utilizando TBS-Triton X-100 al 0.5% durante 10 minutos. El proceso de inmunotinción fue por el sistema de biotina-Estreptavidina/Peroxidasa (SBEP). Se lavaron las muestras tres veces con PBS y posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios diluidos en PBS-BSA al 1%, anti-RhoGDI3 (1:200), anti-RhoG (1:100) y anti RhoB (1:100) en cortes secuenciales durante 45 minutos. Las muestras se lavaron cinco veces con PBS. Se agregó el anticuerpo secundario biotinilado, incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Concluida la incubación, se agregó la solución del complejo estreptavidina-peroxidasa e incubó por 30 minutos. Se lavó en tres ocasiones con PBS. El revelado se llevó a cabo utilizando la

solución con 3,3 deaminobencidina (DAB) en un lapso de tiempo no mayor a los 5 minutos, monitoreando bajo el microscopio de luz la inmunorreactividad. Las Muestras se contrastaron con hematoxilina de Harris durante medio minuto. Se lavaron las laminillas con PBS y se procedió a la deshidratación, empezando con etanol 50%, etanol 70% etanol 80%, etanol 95%, etanol absoluto 100%. Una vez secas las laminillas, se cubrió el corte histológico con un portaobjetos adecuado (24 x 24 mm) y resina sintética. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de campo claro Nikon.

Silenciamiento de la proteína RhoGDI3 mediante RNA de interferencia, shRNA (short hairpin RNA)

Con el objetivo de silenciar al gen *RhoGDI3* y consecuentemente dar lugar a una disminución en la traducción de la proteína, se optó por el sistema de RNA de interferencia utilizando un vector de expresión mamario pSUPER-GFP-Neo, el cual nos permite un sistema estable de expresión, dando lugar a una supresión constante de la expresión del gen, permitiendo un análisis del fenotipo celular durante períodos prolongados de tiempo. Inicialmente, el vector pSUPER-GFP-Neo es utilizado en concierto con un par de oligonucleótidos que contienen una secuencia de 19 nucleótidos derivados del transcrito de mRNA de RhoGDI3.

Diseño de los oligonucleótidos sintéticos para la generación de los shRNA

Utilizando la plataforma de Invitrogen (<https://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/design.do>) se introdujo la secuencia del mRNA codificante para la proteína RhoGDI3, iniciando con el codón de inicio AUG, se hizo la detección de secuencias dinucleotídica AA con un contenido de G/C entre el 30 al 50%, evitando secuencias mayores de Timinas o Adeninas en la secuencia blanco. Una vez seleccionadas las secuencias potenciales blanco, estas se introdujeron en la plataforma www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST con el objetivo de eliminar secuencias de 16 a 17 pares de base contiguas homólogas que pudieran alterar otros mRNA mensajeros diferentes al de nuestro interés y de esta manera eliminarlas como posibles candidatos. Una vez seleccionadas las secuencias con mayor puntaje, se agregó una secuencia horquilla de 9 pares de base y posteriormente la secuencia antisentido de la secuencia original. Se seleccionaron 3

secuencias, denominadas R1, R2 y R3 (Tabla 7). Por lo tanto, los oligonucleótidos sintéticos seleccionados fueron los siguientes:

Tabla 7. Oligonucleótidos sintéticos para obtención del shRNA de RhoGDI3. Secuencias R1, R2 y R3.

Tallo 1	Horquilla	Tallo 2
R1 (mitad del gene RhoGDI3)		
5-ACCAGGTGTTTGTCTGAA	TTCAAGAGA	TTCAGGACAAACACCT GGTTT TTTT-3 (60 bp)
5-AATTAAAAAACCAGGTGTTG TCTGAA	TCTCTTGAA	TTCAGGACAAACACCT GGT GGCC-3 (60 bp)
R2 (extremo 3' de RhoGDI3)		
5-ATGCTGCATCACACCTAT	TTCAAGAGA	ATAGGTGTGATGCAGA CATTI TTTT-3 (60 bp)
5-AATTAAAAAATGCTGCATCA CACCTAT	TCTCTTGAA	ATAGGTGTGATGCAGA CAT GGCC-3 (60 bp)
R3 (mitad del gene RhoGDI3)		
5-GATCCCCGAGTGAAGATCCTCTCAAGGTCCA	TTCAAGAGA	TGGACCTTGAAGGAGAT CTTCACTCTTTTAA-3 (72 bp)
5- AGCTTAAAAAGAGTGAAGATCCTCTCAAGGTCCA	TCTCTTGAA	TGGACCTTGAAGGAGA TCTTCACTCGGG-3 (72 bp)

Diseño del control negativo, shRNA scramble: pSR-GFP-Neo-Ck

Para validar los datos del RNA de interferencia, se incluyó un control negativo, el cual fue conformado con la misma secuencia nucleotídica del oligonucleótido R1 pero organizada de manera aleatoria, denominada “Ck” (Tabla 8) la cual fue verificada utilizando la plataforma computacional www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST con el objetivo de evitar que esta secuencia aleatoria pudiera tener como blancos otros mensajeros. Como resultado de este diseño y análisis, se obtuvieron las siguientes secuencias nucleotídicas:

Tabla 8. Oligonucleótidos sintéticos para la obtención de la secuencia “scramble”, Ck.

Tallo 1	Horquilla	Tallo 2
Ck (Scramble de R1)		
5-GTGCTACAGTACTGGTCTA	TTCAAGAGA	TAGACCAGTACTGTAG CACTT TTTT-3 (60 bp)
5-AATTAAAAAAGTGTACAGTAC TGGTCTA	TCTCTTGAA	TAGACCAGTACTGTAGCA CG-GCC-3 (60 bp)

Técnicas de Biología Molecular para la construcción de los short hairpin RNA (ShRNA) dirigidos contra la secuencia RhoGDI3

Los oligonucleótidos sintéticos fueron disueltos en agua estéril libre de nucleasas, dejándolos a una concentración final de 1 µg/ml. Para el alineamiento de los oligonucleótidos, se llevó a cabo una reacción con 3 µl de cada uno (pSR-GFP/Neo R1 a + pSR-GFP/Neo R1 b) con 44 µl de buffer de alineamiento, el cual contiene 100 mM NaCl and 50 mM HEPES pH 7.4. La reacción fue incubada 4 minutos a 94 °C, seguido de incubaciones paulatinas de 4 minutos a temperaturas de 80, 75 y 70 °C. Los oligonucleótidos alineados que ahora constituyen un DNA de doble cadena, fueron lentamente llevados a la temperatura de 10 °C, iniciando con una incubación de 20 minutos a 37 °C, luego una incubación de 2 minutos a 20 °C y finalmente colocadas en hielo para su posterior corrimiento en un gel de agarosa al 2%. Una vez migrados, los DNA de doble cadena fueron purificados por miniprep utilizando el kit QIAEX II (Qiagen, Alemania) para su posterior ligación en el vector pSR-GFP-Neo.

Linearización del vector pSR-GFP-Neo

Para la linearización del vector pSR-GFP-Neo (VEC-PRT-0005/0006, OligEngine, UK) se utilizó 1 µl, el cual fue digerido con 1 µl (10 U) de la enzima de restricción HindIII durante 60 minutos, posteriormente, se adicionó 1 µl (10 U) de la enzima de restricción BglII continuando la reacción durante dos horas más. La temperatura de digestión utilizada fue de 65 °C. El producto de digestión fue migrado en un gel de agarosa al 1% y posteriormente purificado utilizando el kit QIAEX II (Qiagen, Alemania).

Ligación del DNA de doble cadena en el vector pSR-GFP-Neo linearizado

La reacción de ligación de los DNA de doble cadena, se llevó a cabo utilizando 200 µg del vector pSR-GFP-Neo linearizado en una reacción con 2 µl del DNA de doble cadena más 1 µl de buffer T4 DNA ligasa más 1 µl de T4 DNA ligasa. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente toda la noche. Como control negativo, el mismo vector linearizado fue religado. Al día siguiente, los plásmidos fueron tratados con la enzima 1 µl de la enzima restricción BglII, ya que este sitio fue destruido una vez se clonaron los DNA de doble cadena, por lo tanto, aquellos vectores que se corten con esta enzima no contendrán el inserto deseado. La muestra se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

Transformación de los plásmidos shRNA en bacterias *E. coli DH5-α*

Para la transformación de los plásmidos pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3, pSR-GFP-NEO-Ck (Scramble) y pSR-GFP-NEO (Mock) se utilizaron 200 µl de células de *E. coli DH5α* a los que se le añadieron 10 µl (500 ng) de los plásmidos antes mencionados, mezcla que se dejó incubar en hielo por 30 min para después incubar por 2 min a 42 °C. Posteriormente se colocó nuevamente en hielo por dos minutos y se le adicionó 1ml de LB para dejarlo incubar a 180 rpm durante una hora a 37 °C. Se centrifugó a 3000 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, adicionándole a la pastilla 100 µl de LB. Posteriormente, la muestra fue plaqueada sobre cajas de LB/ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, varias colonias fueron picadas y sembradas en otras cajas durante un ciclo adicional. Posteriormente, de las colonias candidatas, se obtuvieron los plásmidos pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3, pSR-GFP-NEO-Ck (Scramble) y pSR-GFP-NEO (Mock) utilizando lisis alcalina. Una vez obtenidas estos, se determinaron aquellas clonas positivas a través de un ensayo de restricción utilizando las enzimas EcoRI y HindIIIa; aquellas clonas positivas liberaron un inserto de 281 pares de bases. Adicionalmente, la correcta inserción dentro del vector pSR-GFP-Neo fue confirmado por secuenciación automática utilizando los oligonucleótidos 5'-GGAAGCCTTGGCTTTTG-3' y 5'-CGAACGTGACGTCATC-3'.

Expresión Exógena de la proteína RhoGDI3-Flag en la línea celular PANC-1

Clonación del inserto RhoGDI3-Flag en el vector de clonación pCR 2.1.

La secuencia codificante para la proteína RhoGDI3 completa fue amplificada a través de la metodología de retrotranscripción y PCR, utilizando el RNA total de la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE tal y como se describió en los apartados superiores, utilizando los oligonucleótidos sentido 5' CGCGGATCCGCGATGCTGGGCCTGGACGCGTGC 3' y antisentido 5' CCGCTCGAGCGGTCACCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGTCCTTCCAGTC CTGGCAGATGCA 3', este último introduce la secuencia FLAG (DYKDDDDK) en

el extremo 3'. Se utilizó 0.5µl de la enzima Taq polimerasa (Roche, USA), llevando a cabo el proceso durante 35 ciclos. El fragmento amplificado de 726 pb se clonó en el vector pCR 2.1 (Invitrogen, USA) utilizando 200 µg en una reacción con 2 µl del inserto más 1 µl de buffer T4 DNA ligasa más 1 µl de T4 DNA ligasa. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente toda la noche. Como control negativo, el mismo vector linearizado fue religado. Para la transformación de los plásmidos pCR2.1-RhoGDI3/Flag y pCR2.1 (Mock) se utilizaron 200 µl de células de *E. coli DH5a* a los que se le añadieron 10 µl (500 ng) de los plásmidos antes mencionados, mezcla que se dejó incubar en hielo por 30 min para después incubar por 2 min a 42 °C. Posteriormente se colocó nuevamente en hielo por dos minutos y se le adicionó un ml de LB para dejarlo incubar a 180 rpm durante una hora a 37 °C. Se centrifugó a 3000 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, adicionándole a la pastilla 100 µl de LB. Posteriormente, la muestra fue plaqueada sobre cajas de LB/ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, varias colonias fueron picadas y sembradas en otras cajas durante un ciclo adicional. Posteriormente, de las colonias candidatas, se obtuvo el plásmido pCR2.1-RhoGDI3/Flag utilizando el kit Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Una vez obtenidas estas, se determinaron aquellas clonas positivas a través de un ensayo de restricción utilizando las enzimas BamHI y XhoI; aquellas clonas positivas liberaron un inserto de 726 pares de bases. Adicionalmente, la correcta inserción de la secuencia para RhoGDI3/Flag dentro del vector pCR2.1 fue confirmada por secuenciación automática utilizando los oligonucleótidos M13 Fw y Rv.

Clonación de las secuencias codificantes para la proteína RhoGDI3/Flag en el vector de expresión eucarionte pCDNA3

Una vez verificado que el marco de lectura del plásmido pCR2.1-RhoGDI3/Flag se encontraba correcto, se liberó el inserto de 726 pares de bases a través de un ensayo de restricción utilizando las enzimas BamHI y XhoI. El producto de restricción se migró en un gel al 1% y la banda correspondiente al tamaño esperado fue purificado mediante el kit QIAEX II (Qiagen, Alemania). El producto purificado fue clonado en el vector pCDNA3 linearizado con las enzimas BamHI y XhoI, utilizando 200 µg del linearizado en una reacción con 2 µl del inserto más 1 µl de buffer T4 DNA ligasa

más 1 μ l de T4 DNA ligasa. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente toda la noche. Como control negativo, el vector pCDNA3 linearizado fue religado. Para la transformación de los plásmidos pCDNA3-RhoGDI3/Flag y pCDNA3 (Mock) se utilizaron 200 μ l de células de *E. coli DH5 α* . Adicionalmente, la correcta inserción dentro del vector pCDNA3 fue confirmado por secuenciación automática utilizando los oligonucleótidos del promotor T7. Los plásmidos pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3/Flag fueron purificados utilizando el kit Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Transfección de los plásmidos para la obtención del *knockdown* y la sobreexpresión en la línea celular PANC-1

Determinación de la concentración del agente selector G418 en la línea celular PANC-1

Para la selección de clonas positivas, se determinó la dosis óptima para eliminar aquellas células que no adquirieron el plásmido. Para ello, se sembraron 20,000 células PANC-1 sin transfectar en una caja de cultivo de 12 pozos, se dejaron llegar a una confluencia del 80%, posteriormente, se aspiró el medio completo de cultivo y se adicionó el medio completo con dosis crecientes de G418: 100, 250, 500, 1000 y 1500 μ g/ml. Se hizo recambio del medio cada tercer día. La muerte celular se monitoreó diariamente durante 14 días. La viabilidad celular fue visualizada tiñiendo con cristal violeta al 0.1% en ácido cítrico 1M. La concentración utilizada de G418 fue de 1000 μ g/ml observándose el pozo completamente traslúcido, contrario a lo observado en concentraciones inferiores de 400 μ g/ml. Con esta curva de G418, determinamos la dosis de 1000 μ g/ml.

Transfección de la línea celular PANC-1

Para la transfección de los plásmidos pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3, pSR-GFP-NEO-Ck, pSR-GFP-NEO, pCDNA3-RhoGDI3/Flag, pCDNA3 y el vector pEGFP-N1 se sembraron células de PANC-1 (pasaje 3) dejándolas llegar a una confluencia del 70% en una caja de 6 pozos. El medio completo fue retirado y se colocó medio DMEM sin suero bovino fetal ni antibiótico. Se obtuvieron los plásmidos mediante el kit Spin Miniprep (Qiagen, Alemania) y se cuantificó la concentración de estos usando una absorción de 260 nm. Para el proceso

de transfección se utilizó el reactivo Fugene 6 Transfection Reagent (Roche, USA) utilizando 2 μg de DNA. La reacción fue incubada durante 45 minutos a 15 °C. Después, la mezcla fue adicionada a las monocapas dejándola caer gota por gota, intentando cubrir la monocapa. Las células se incubaron en un ambiente con el 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, se colocó medio completo suplementado con 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418. Las transfectantes fueron monitoreadas durante 7 días hasta que el control, células sin transfectar, murieron. Se continuó con el esquema de selección 2 pases más, durante aproximadamente 3 semanas, con el objetivo de obtener líneas celulares estables.

Eficiencia de transfección

Debido a que los vectores pSR-GFP-NEO y pEGFP-N1 contiene un cassette que codifica para la proteína verde fluorescente, fue posible conocer la eficiencia de transfección en la línea celular PANC-1 transfectada utilizando un microscopio invertido de fluorescencia. Una vez que las células fueron despegadas, una gota de ellas fue fijada sobre un cubreobjetos, se tiñeron los núcleos y se montó sellando con barniz transparente. Se tomaron imágenes de distintos campos utilizando el microscopio Olympus FV-300 (Melville, NY) con los objetivos 60X.

Obtención de proteína total de las transfectantes estables del *knockdown* y de la sobreexpresión de la línea celular PANC-1

Los western blots fueron llevados a cabo utilizando extractos totales de las monocapas de las transfectantes de PANC-1. Las células fueron lisadas con el buffer RIPA conteniendo un cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa 1X (Roche 11873580001, 49068450001 Indianapolis, IN). Las muestras de proteínas fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C; al sobrenadante se le agregó buffer de Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos. La concentración de proteína fue determinada utilizando el método de Lowry (DC Protein assay, BioRad 500-0114, Hercules, CA). Posteriormente, 20 μg de proteínas fueron separados en un gel SDS-PAGE a una concentración del 12% y transferido a membranas de PVDF (Millipore IPVH00010, Billerica, MA) con un amperaje de 200 mA durante 2 horas a 4°C. Después de bloquear las membranas con TBS-tween 20 al 0.1% con 5% de leche descremada, las membranas transferidas con los extractos de las transfectantes

pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3, pSR-GFP-NEO-Ck y pSR-GFP-NEO fueron incubadas toda la noche 4°C en el mismo buffer adicionando los anticuerpos primarios anti-RhoGDIgamma (1:1000), anti-GFP (1:1000) y anti-GAPDH (1:12000), mientras que las transferidas con pCDNA3-RhoGDI3-Flag (ambas clonas) y pCDNA3 con anti-Flag (1:1000). Después, las membranas fueron lavadas 4 veces con el buffer TBS-0.1% Tween 20 e incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (anti-conejo, 1:6000; anti-ratón, 1:1000) por una hora a 37°C. Las membranas fueron lavadas con TBS en tres ocasiones a 37°C. Las membranas fueron visualizadas con el sistema de imagen ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West_Pico (Thermo Scientific 34079, Waltham, MA).

Localización subcelular de la proteínas RhoGDI3 y de la bandera FLAG por microscopía confocal

Las transfectantes estables de la sobreexpresión, es decir, pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (clona 1 y 2) y las del knockdown pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3, pSR-GFP-NEO-Ck y pSR-GFP-NEO de la línea celular PANC-1 fueron sembradas sobre cubreobjetos (Tedpela 26020, Redding, CA) recubierto con poly-D-Lysine, lavadas dos veces con PBS pH 7.3 y fijadas con paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con 0.1% de Tritón X-100 por 3 minutos a una temperatura de 37 °C. Para prevenir la unión inespecífica del anticuerpo, se usó un buffer bloqueador conteniendo PBS-BSA 1%. Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-RhoGDIgamma (1:120) y anti-Flag (1:1000), durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al siguiente día, las células fueron lavadas dos veces con PBS-BSA 1% e incubadas con los anticuerpos secundarios (anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:500). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Una vez terminado el tiempo de incubación, se enjuagó cada cubreobjeto con agua MilliQ filtrada y se montó sobre portaobjetos utilizando de 6 µL de Vectashield sellándolos con barniz transparente. Las imágenes fueron capturadas usando el microscopio confocal Olympus FV-300 (Melville, NY) con los objetivos 60X y 100X.

Ensayos “in vitro” con las transfectantes del *knockdown* y sobreexpresión de la proteína RhoGDI3 en la línea celular PANC-1

Formación de colonias dependientes de anclaje

Las transfectantes estables de *knockdown* pSR-GFP-Neo, pSR-GFP-Neo-Ck y pSR-GFP-Neo-R3 y de la sobreexpresión pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3/Flag fueron sembradas en una caja de 24 pozos, a una densidad de 10,000 células por pozo, las cuales fueron crecidas con el medio base y el agente selector G418 a una concentración de 1000 µg/mL. Las células se dejaron crecer durante 10 días, con cambio de medio cada tres. Posterior a los 10 días. Las células fueron teñidas con cristal violeta al 0.1% en ácido cítrico 1M y 0.2% de etanol, seguido de la lisis celular con SDS al 1%. La absorbancia fue leída a 570 nm.

Formación de colonias en agar suave

Las transfectantes estables de knock-down pSR-GFP-Neo, pSR-GFP-Neo-Ck y pSR-GFP-Neo-R3 y de la sobreexpresión pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3/Flag fueron sembradas y cosechadas dejándolas a una densidad de 1 millón de células en un ml de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, 1% de antibiótico-antimicótico y 500 µg/mL. Se preparó agarosa al 4% en agua Milli Q y se esterilizó por autoclave. En una caja de 12 pozos para cultivo, se preparó una capa con 750 µl cada pozo conteniendo el medio completo para el cultivo celular adicionado con 0.75% de agarosa al 4%. Una vez que esta solución gelificó, se preparó la capa superior, conteniendo el medio completo para el cultivo celular adicionado con 0.36% de agarosa al 4% y las células a una densidad de 10,000 células por pozo; de esta solución se colocaron 750 µl sobre la capa inferior y se esperó a que gelificara. Posteriormente se adicionaron 500 µl del medio completo sobre las capas para evitar que la agarosa se secase. El cambio de medio fue cada tercer día. Las células se dejaron crecer hasta el día 23. Las colonias en el agar fueron teñidas utilizando cristal violeta al 0.05% en etanol al 2% en PBS. Se documentó la imagen utilizando el fotodocumentador (AlphaInnotech, USA). Las colonias fueron contadas con la herramienta de *colony count* del programa Alpha viewer (AlphaInnotech, USA). El análisis estadístico se realizó con una prueba de Anova y Turkey con el programa GraphPad Prism versión 6.01.

Ensayos de quimiosensibilidad

La quimiosensibilidad a Gemcitabina y 5-Fluoracilo de las transfectantes de knock-down pSR-GFP-Neo, pSR-GFP-Neo-Ck y pSR-GFP-Neo-R3 y de la sobreexpresión pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3/Flag se determinó mediante el método de cuantificación de ATP por luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega, Madison) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 5×10^3 células por pozo en placas costar blancas de 96 pozos Corning® (3603-48EA) con 100 μ L de medio de cultivo y se incubaron a 37°C durante 24 horas para permitir su adherencia. Transcurrido este tiempo se adicionaron los quimioterapéuticos 5-Fluoracilo y gemcitabina en las dosis indicadas por Tsujie y cols. [134]. Después de 72 horas de incubación se añadió a cada pozo 100 μ L del reactivo CellTiter-Glo®. Posteriormente las células fueron lisadas con ayuda de un agitador orbital a 400 rpm y la señal luminiscente se estabilizó incubando la placa a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente se registró la luminiscencia con el equipo TECAN infinite 500 para cuantificar el ATP liberado por las células viables. Estos ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba de múltiples comparaciones Dunnet con el programa GraphPad Prism versión 6.01.

Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular de las transfectantes de knock-down pSR-GFP-Neo, pSR-GFP-Neo-Ck y pSR-GFP-Neo-R3 y de la sobreexpresión pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3-Flag se determinó de la siguiente manera: se sembraron 5×10^3 células por pozo en placas costar blancas de 96 pozos con 100 μ L de medio de cultivo. La luminiscencia que es directamente proporcional al número células viables se midió a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas mediante el método de cuantificación de ATP por luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega, Madison), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba de múltiples comparaciones Dunnet con el programa GraphPad Prism versión 6.01.

Ensayo de quimiotaxis

Para evaluar el efecto de los niveles de la proteína RhoGDI3 en eventos de migración, llevamos a cabo un ensayo de quimiotaxis; el cual, fue ejecutado utilizando cámaras tipo transwell modificadas (Cultrex 96 well Cell migration Assay, USA3465-096-K), con una membrana de tereftalato-polietileno (PET), sobre la cual fueron colocadas 50,000 células de cada transfectante de sobreexpresión y *knockdown* de RhoGDI3. Estas células fueron sometidas a un ayuno de 24 horas y posteriormente utilizadas para el ensayo. Las células una vez colocadas en la cámara superior, se dejaron mirar a través de la membrana, durante 48 horas. En la cámara inferior, se colocó medio DMEM suplementado con 20% de suero bovino fetal y 20 µg de rhEGF por ml como quimioatrayentes. Una vez concluidas las 48 horas, las células que migraron fueron cuantificadas con calceína AM, la cual es internalizada por las células, donde es cortada por las esterasas intracelulares emitiendo fluorescencia, la cual fue cuantificada a 485nm. El análisis estadístico se realizó con una prueba de Anova y Turkey con el programa GraphPad Prism versión 6.01.

16. RESULTADOS

Determinar si el mRNA codificante para la proteína RhoGDI3 en las líneas celulares pancreáticas hTERT-HPNE, BxPC3, PANC-1 se encuentra conservado

En las líneas celulares pancreáticas hTERT-HPNE, BxPC3, PANC-1, no se cuenta con el antecedente de que el mRNA se encuentre sin alguna alteración en su secuencia; por lo que decidimos realizar un ensayo de RT-PCR en punto final, tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Una vez se obtuvo el RNA total de las tres líneas celulares, se realizaron los ensayos de RT-PCR lo cual nos permitieron amplificar un producto de aproximadamente 678 bp (Fig. 23), correspondiente al tamaño esperado para el mRNA codificante para la proteína RhoGDI3 en las líneas celulares pancreáticas. Este producto fue purificado y clonado en el vector de clonación pCR-2.1, para la posterior obtención del plásmido pCR2.1-RhoGDI3 y secuenciación automática. Por lo que, con este resultado, confirmamos que en la línea celular hTERT-HPNE el marco de lectura se encuentra conservado; no así en las líneas celulares pancreáticas BxPC3, PANC-1, dónde es importante destacar el cambio de una valina (V) por una alanina (A), considerándose esta una mutación sin sentido (Fig. 24).

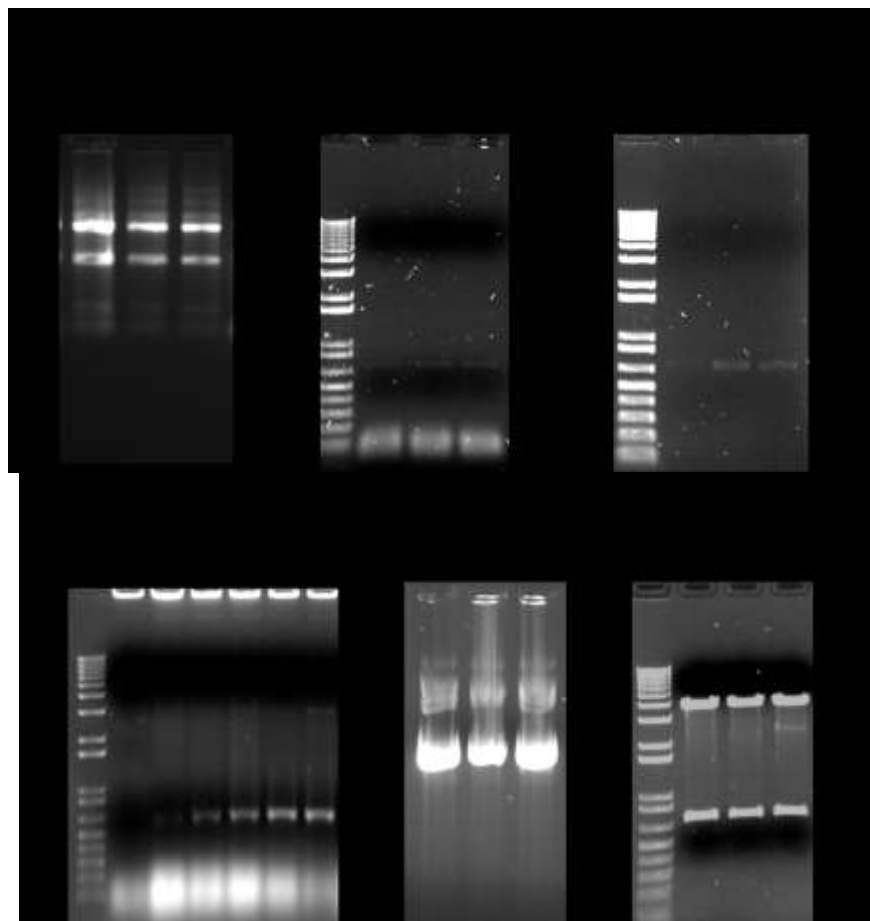


Figura 23 . Clonación de la secuencia codificante para la proteína RhoGDI3 de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPCE y PANC-1 en el vector de clonación pCR2.1. A) Extracción de RNA total de las líneas celulares hTER-HPNE, BxPC3 y PANC-1. **B)** RT-PCR en punto final para la obtención del amplicón RhoGDI3. **C)** Purificación del amplicón RhoGDI3. **D)** PCR de colonia de la clonación del amplicón RhoGDI3 en el vector de clonación pCR2.1. **D)** Obtención del DNA plasmídico pCR2.1-RhoGDI3 de colonias de bacterias positivas. **E)** Digestión del DNA plasmídico pCR2.1-RhoGDI3 de las tres líneas celulares y la obtención del inserto RhoGDI3.



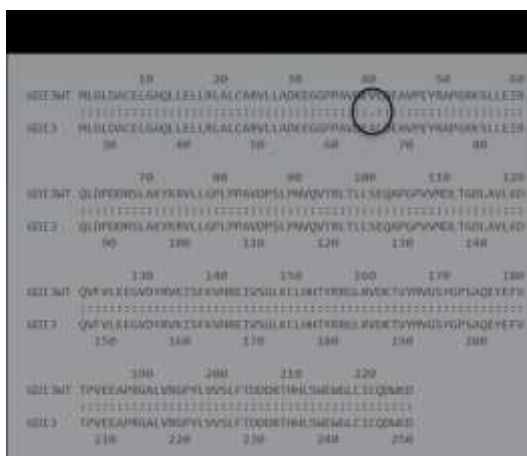


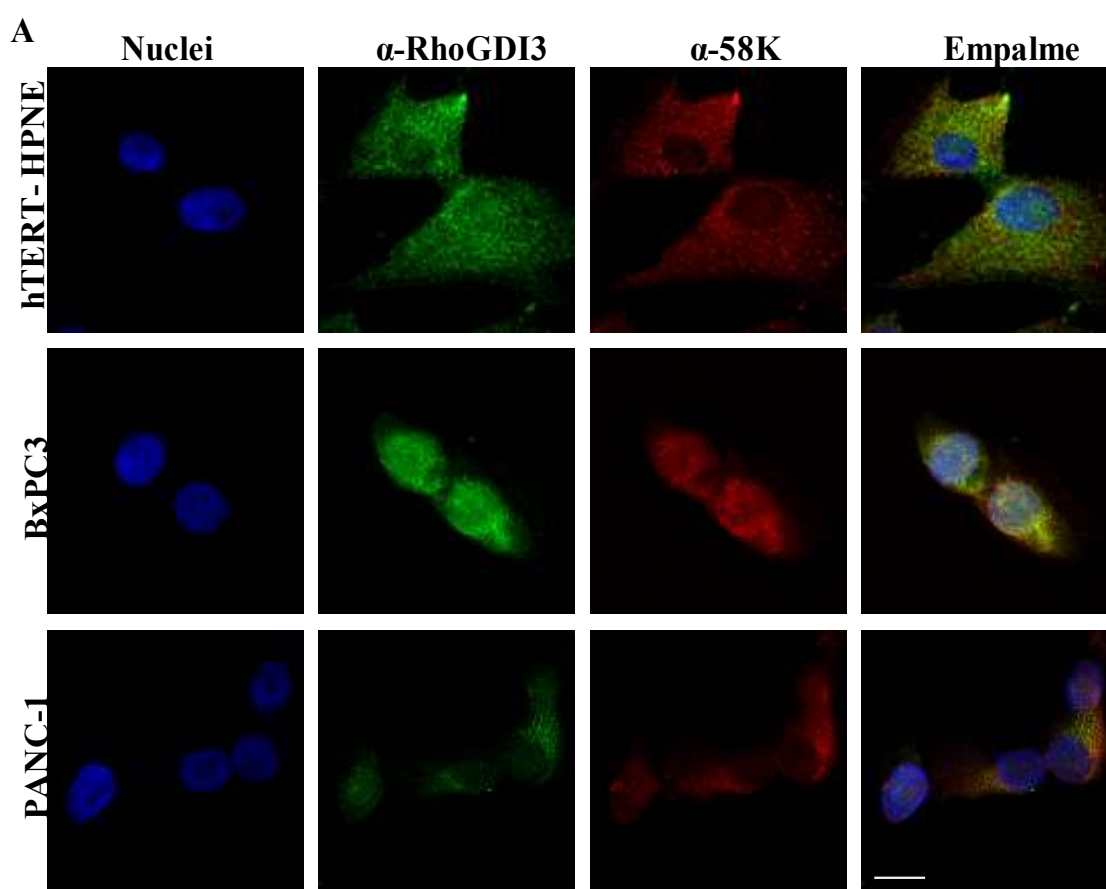
Figura 24. Secuenciación de la clonación de RhoGDI3 en el vector de clonación pCR2.1. La secuenciación fue llevada cabo utilizando el oligonucleótido M13 forward. Marco de lectura de la secuencia codificante para la proteína RhoGDI3 de las líneas celulares **A) hTERT-HPNE, B) BxPC3 y C) PANC-1.** El círculo negro remarca el cambio de una Valina por Alanina. El alineamiento fue llevado a cabo con la herramienta computacional Clustal W.

Las líneas celulares cancerosas y no cancerosas pancreáticas expresan un fenotipo diferente de expression de la protein RhoGDI3

La proteína RhoGDI3 es el único miembro de la familia RhoGDI conocida por ser particularmente asociada con una fracción subcelular muy particular, además de formar parte del citosol, se ha encontrado que esta se encuentra asociada al aparato de Golgi [101]. Nosotros analizamos mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal el patron de expresion subcelular de la protein RhoGDI3 en las líneas celulares no cancerosa (hTERT-HPNE) y en (BxPC3 and PANC-1), ambas líneas celulares pancreáticas cancerosas; donde la línea celular BxPC3 representa un estadio temprano del PDAC y la línea celular PANC-1 corresponde a un estadio más agresivo de la enfermedad. Nosotros observamos que la protein RhoGDI3 colocaliza con una proteína denominada 58K, reportado como un marcador Golgi, en las tres líneas celulares, demostrando un patrón puntiforme, sugiriendo su localización vesicular. Es de notarse que el patron de expresión de la protein RhoGDI3 es difuso en la línea celular hTERT-HPNE cells, contrastando con las líneas celulares BxPC3 y PANC-1, donde la proteína fue mayormente localizada rodeando los núcleos y colocalizando con el marcador de Golgi 58K (Fig. 25A).

Existen reportes acerca de la sobreexpresión o desregulación de las proteínas RhoGDI1 y RhoGDI2 y su papel en diversos tipos de cancer con

resultados contrastantes [64, 65, 69, 76, 84, 85, 93]; por lo que, para complementar los análisis de inmunofluorescencia de la expresión de la proteína RhoGDI en las líneas celulares pancreáticas, llevamos a cabo ensayos de inmunoblot utilizando extractos totales de estas y el anticuerpo contra la proteína RhoGDI3, detectando una banda de aproximadamente 25 kDa correspondiente al tamaño predicho para la proteína RhoGDI3 (Fig. 25B). Nosotros encontramos una baja expresión significativa de la molécula RhoGDI3 (aproximadamente el 50%) en los extractos de las líneas celulares BxPC3 and PANC-1 en comparación con los extractos totales de la línea celular no cancerosa hTERT-HPNE (Fig. 25B, C). Un hallazgo importante fue la presencia de una segunda banda de aproximadamente 23 kDa detectada por el anticuerpo anti-RhoGDI3 en los extractos totales de BxPC3, por lo tanto, decidimos indagar si el anticuerpo anti-RhoGDI3 podría tener una reacción cruzada y reconocer a la proteína RhoGDI2, por lo que la misma membrana fue incubada con el anticuerpo anti-RhoGDI2, observando un reconocimiento de una banda detectada en 23 kDa, lo cual indica que no reconoce al unísono ambas proteínas. Además, encontramos que la proteína RhoGDI2 no se expresa en la línea celular (Fig. 25B).



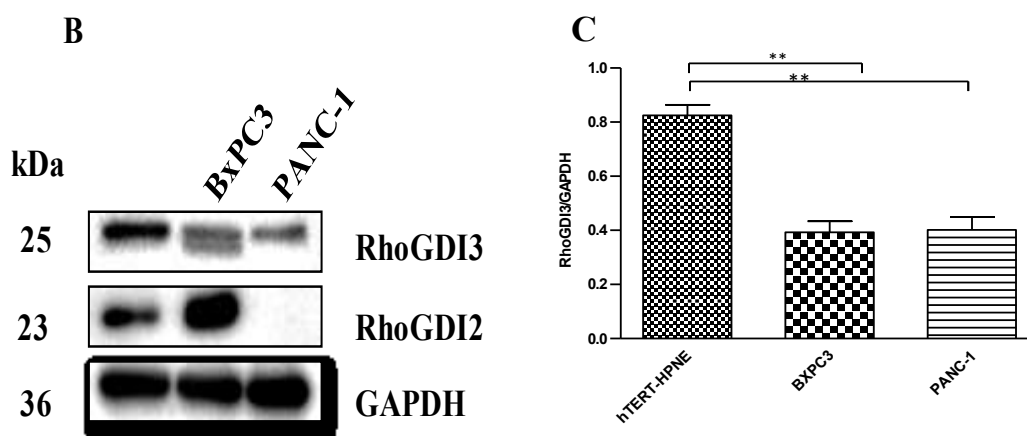


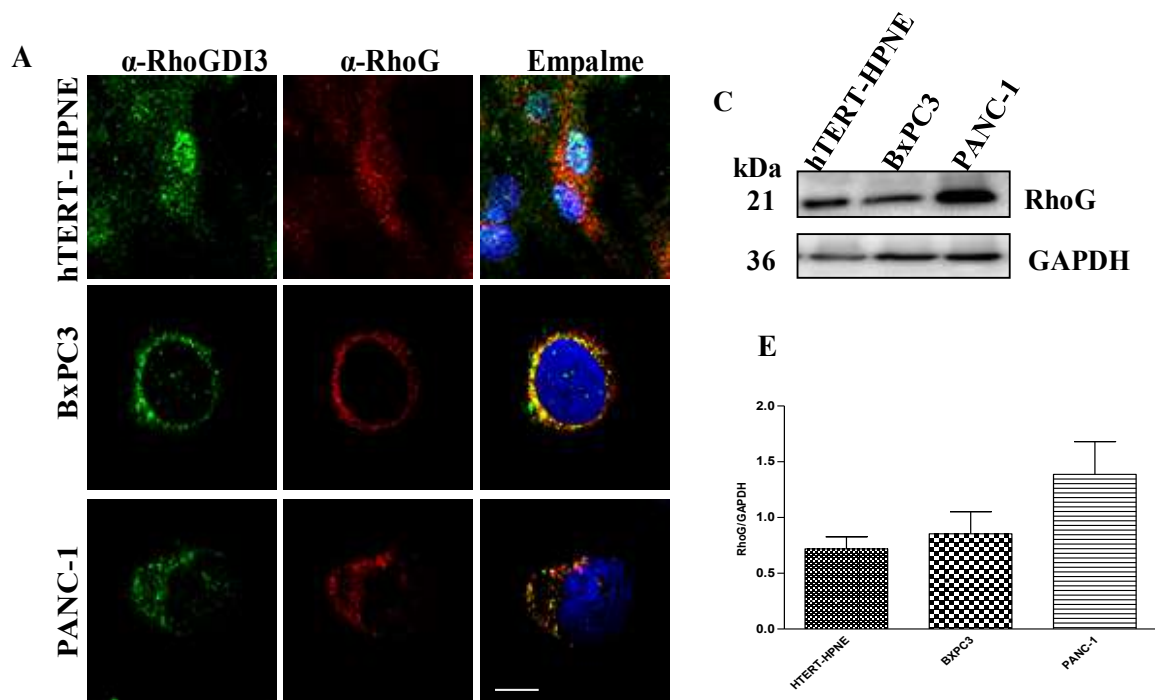
Figura 25. Líneas celulares cancerosas pancreáticas muestran un patrón diferente de expresión de la proteína RhoGDI3. (A) Análisis por microscopía de fluorescencia de la proteína RhoGDI 3 (verde); la proteína 58K, marcador de aparato de Golgi (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul); panel superior, medio e inferior, líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1 respectivamente. (B) Western blot representativo utilizando los anticuerpos anti-RhoGDI3, anti-RhoGDI2 y anti-GAPDH. Lisados totales de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 and PANC-1 fueron analizados. (C) Para comparar los niveles de expresión de la proteína RhoGDI3 entre las tres líneas celulares, el total de la proteína RhoGDI3 fue normalizado con la cantidad total de la proteína GAPDH. Para los ensayos fueron analizados 20 μ g de lisado celular. El análisis densitométrico del western blot fue determinado utilizando el software Image Lab software. ** $P < 0.005$ (Anova-test). Escala de 20 μ m. N=3

La expresión de las proteínas RhoG y RhoB se encuentra alterada en las líneas celulares pancreáticas

Para determinar si la proteína RhoG colocalizaba con la proteína RhoGDI3 en las líneas celulares pancreáticas hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1, estas fueron crecidas en el medio estandar recomendada por el proveedor, las cuales fueron sujetas a análisis de inmunofluorescencia y análisis por el microscopio confocal. Se observó que la proteína RhoG presenta un patrón puntiforme en cada línea celular (Fig. 26A), aunque la colocalización subcelular con la proteína RhoGDI3 fue diferente en las tres. En las células hTERT-HPNE, las dos proteínas presentaron un patrón de distribución similar, a lo largo de toda la célula (Fig. 26A upper panel); mientras que en las células BxPC3 y PANC-1, se localizaron en el área perinuclear (Fig. 26A panel medio e inferior), los cuales son consistentes con lo ya reportado anteriormente [101]. Estos resultados sugieren que el complejo proteico RhoG-RhoGDI3 se encuentra presente en las líneas celulares con ambos fenotipos, normal y canceroso.

Mediante ensayos de western blot utilizando un anticuerpo anti-RhoG, detectamos una banda de 21 kDa, correspondiente al peso molecular reportado para la proteína RhoG, la cual se encuentra tres veces más expresada en la línea celular PANC-1, no así en los extractos de las células BxPC3, las cuales son equiparables con el control de línea celular no cancerosa hTERT-HPNE (Fig. 26C,E).

Aunque los ensayos de pulldown demostraron la interacción de la proteína RhoB con RhoGDI3, [99], esta no ha sido demostrada in vivo. Por lo que, mediante ensayos de inmunofluorescencia encontramos una colocalización de la proteína RhoB y RhoGDI3 presentando en un patrón difuso en las células de hTERT-HPNE y BxPC3 cells (Fig. 26B panel superior y medio); mientras que en las células de PANC-1 la colocalización se encuentra amás polarizada en donde ambas moléculas colocalizan de manera franca (Fig. 26B panel inferior). Consecuentemente, la expresión de la protein RhoB es muy baja en las células BxPC3 y PANC-1 en comparación con la línea celular pancreática no cancerosa (Fig. 26D, F).



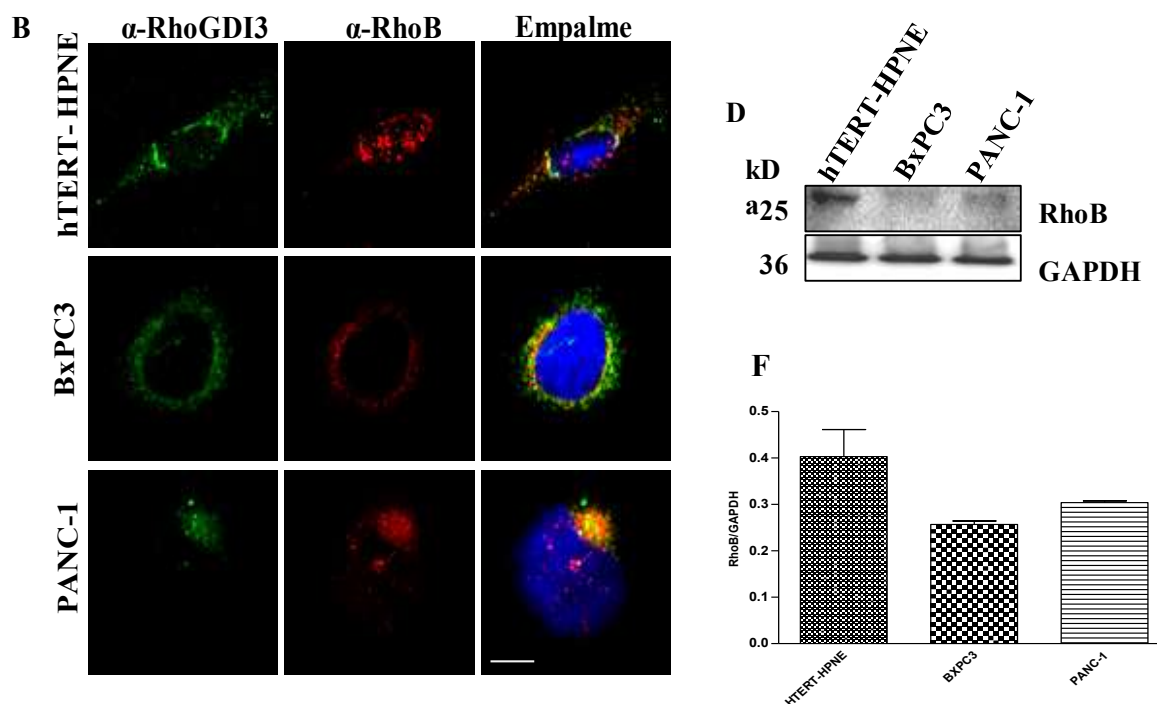


Figura 26. La expresión de las proteína RhoG y RhoB se encuentra alterada en las líneas celulares pancreáticas. Análisis por microscopía de fluorescencia de la proteína RhoGDI3 (verde); RhoG (A) y RhoB (B) (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul); panel superior, medio e inferior, líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1 respectivamente. Western blot representativo utilizando los anticuerpos anti-RhoG (C), anti-RhoB (D) y anti-GAPDH. Lisados totales de las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 and PANC-1 fueron analizados. Para la comparación de los niveles de expresión de las GTPasas entre las tres líneas celulares, la cantidad total de RhoG (E) y RhoB (F) fue normalizada con la cantidad total de la proteína GAPDH. Para los ensayos fueron analizados 20 μ g de lisado celular. El análisis densitométrico del western blot fue determinado utilizando el software Image Lab software. Escala de 10 μ m. N=3

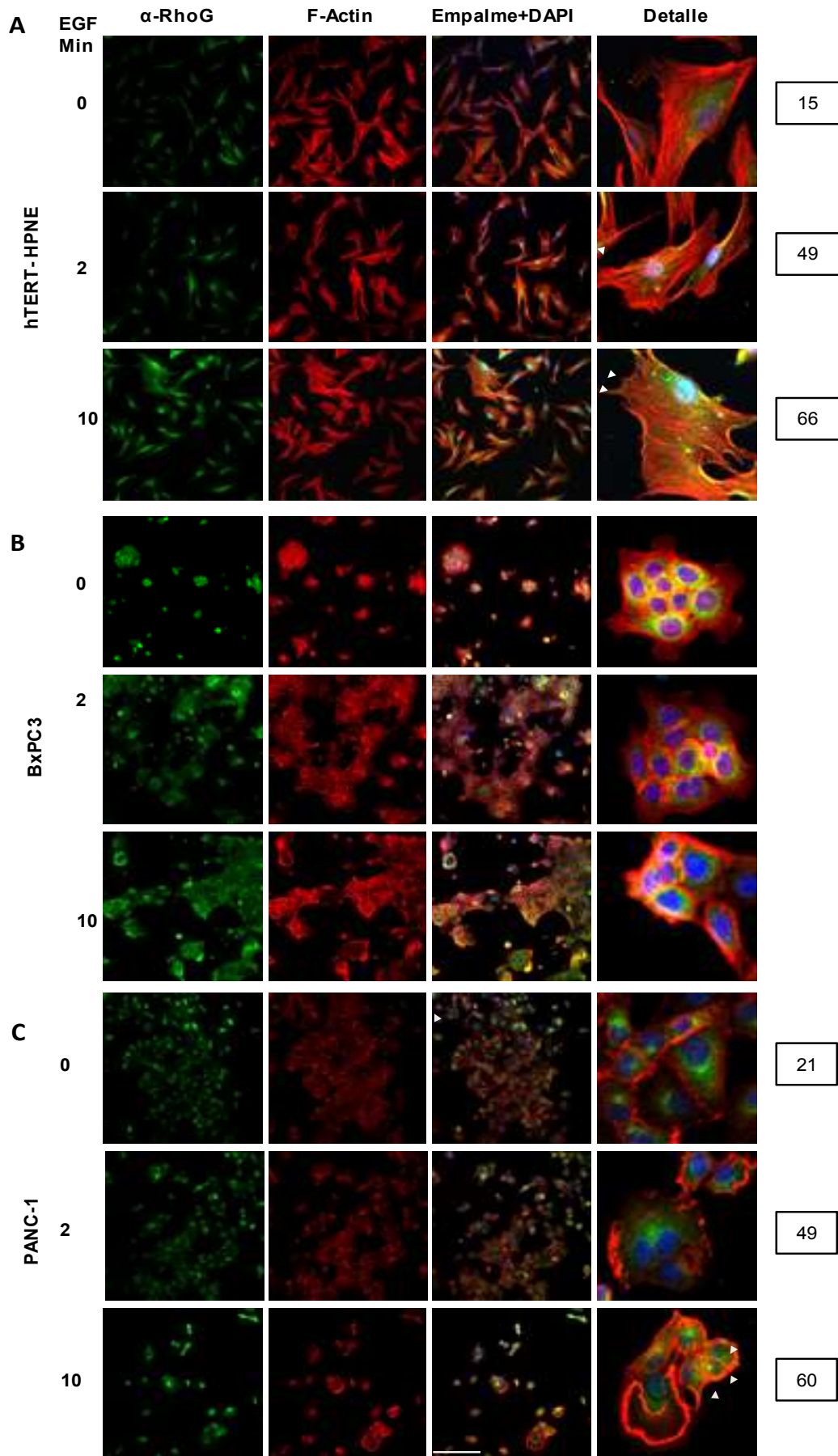
Niveles de activación de la GTPasa RhoG en las líneas celulares pancreáticas hTERT-HPNE, BxPC3, PANC-1

Através de ensayos de microscopía confocal, utilizando el anticuerpo anti-RhoG analizamos la morfología celular después de estimular a esta GTPasa con rhEGF. Para demostrar que hubo una reorganización del citoesqueleto de actina después de la estimulación con rhEGF, las células fueron teñidas con faloidina rodaminada. Las células hTERT-HPNE y PANC-1 estimuladas mostraron dos patrones diferentes: RhoG fue localizada tanto en las protrusiones denominadas lamelipodia como en el citosol (Fig. 27A y C); mientras que las células BxPC3 no mostraron una relocalización clara de la proteína en ninguno de los tiempos analizados (Fig.27B),

dejando en duda si la proteína RhoG se encontraba activada. Posteriormente, los niveles de la GTPasa RhoG unida a GTP, es decir, activada, fueron medidos utilizando rhEGF en tres diferentes tiempos, 0, 2 y 10 minutos (T0, T2, T10) mediante ensayos tipo pulldown, donde observamos que existe una activación basal en las líneas celulares, en el tiempo 0, que se dispara después de haber sido confrontadas con el rhEGF durante 2 minutos, donde se observó un pico significativo el cual disminuyó después de los 10 minutos de interacción con rhEGF (Fig. 27D,E,F). Sin embargo, las células BxPC3 y PANC-1 demostraron un disparo en la activación de RhoG en el tiempo 2 comparado con la línea celular hTERT-HPNE (Fig. 27D). Decidimos cuantificar el número de células que presentaban la relocalización de la GTPasa RhoG en las protrusiones membranales o cercana a la membrana plasmática en los tres tiempos observando que en el tiempo 2 fue evidente en las células de hTERT-HPNE y de PANC-1 un aumento en la relocalización, sugiriendo la activación de estas en la membrana; sin embargo, este patrón no se observó en la línea celular BxPC3 en ninguno de los tres tiempos. (Fig. 27A, B y C cajas y cabezas de flecha).

En el año del 2003, Katoh y colaboradores reportaron que la activación de la GTPasa RhoG activa a su vez a la GTPasa Rac-1 a través de la vía ELMO/Dock180 [135]; por lo tanto, fue posible utilizar el mismo ensayo de pulldown e investigar el nivel de activación de la GTPasa Rac-1. Encontramos que la proteína Rac-1 está presente en los tres tiempos analizados (T0, T2 y T10), con una significativa activación en el T2 decayendo esta al T10 en las tres líneas celulares, observándose un particular aumento de expresión en las células de BxPC3 y PAN C-1 (Fig. 27 D-I).

Caracterización Inmunológica y Contribución Funcional de la Proteína RhoGDI3 y sus Moléculas Blanco, RhoG y RhoB, en Células Humanas Normales y Cancerosas Pancreáticas



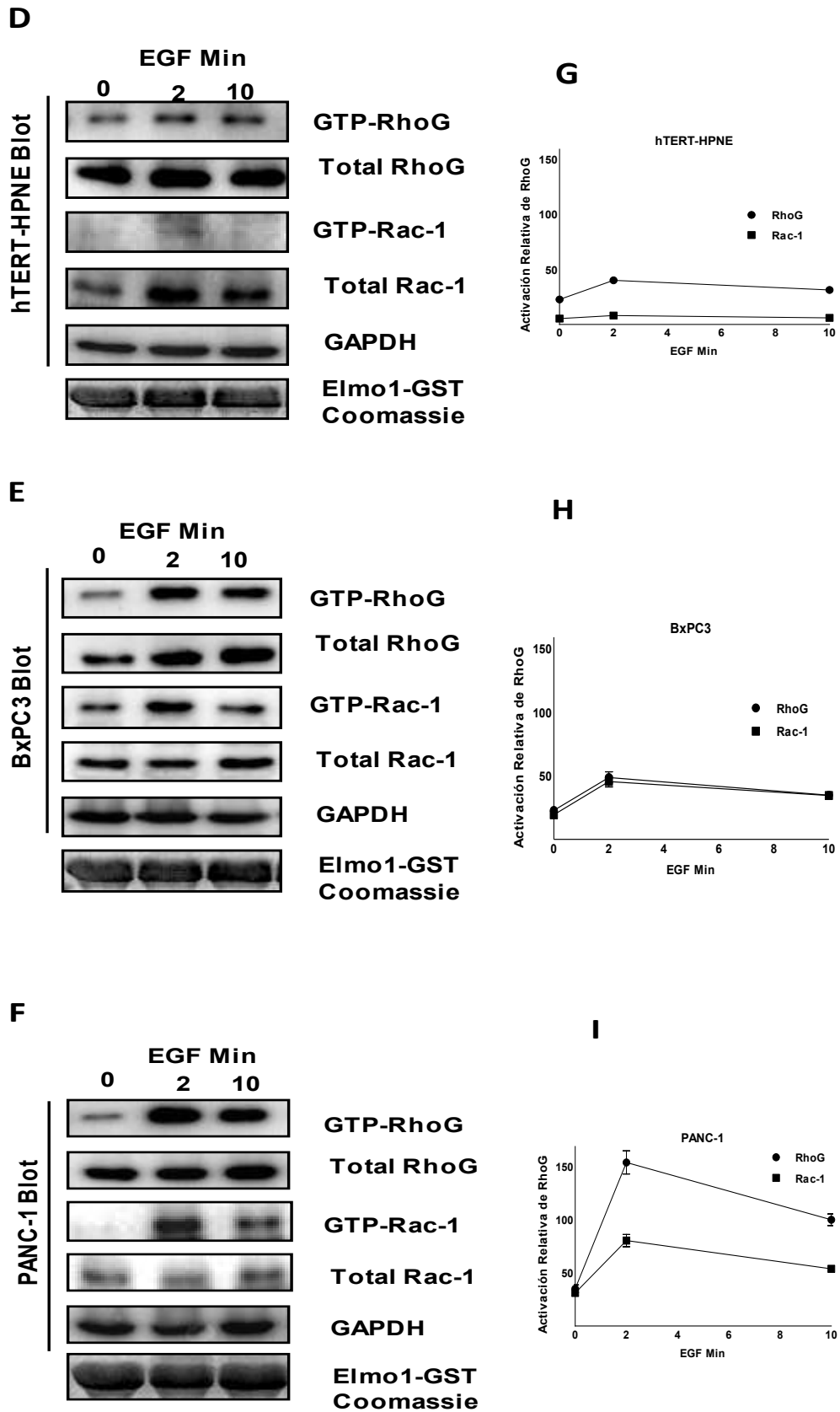
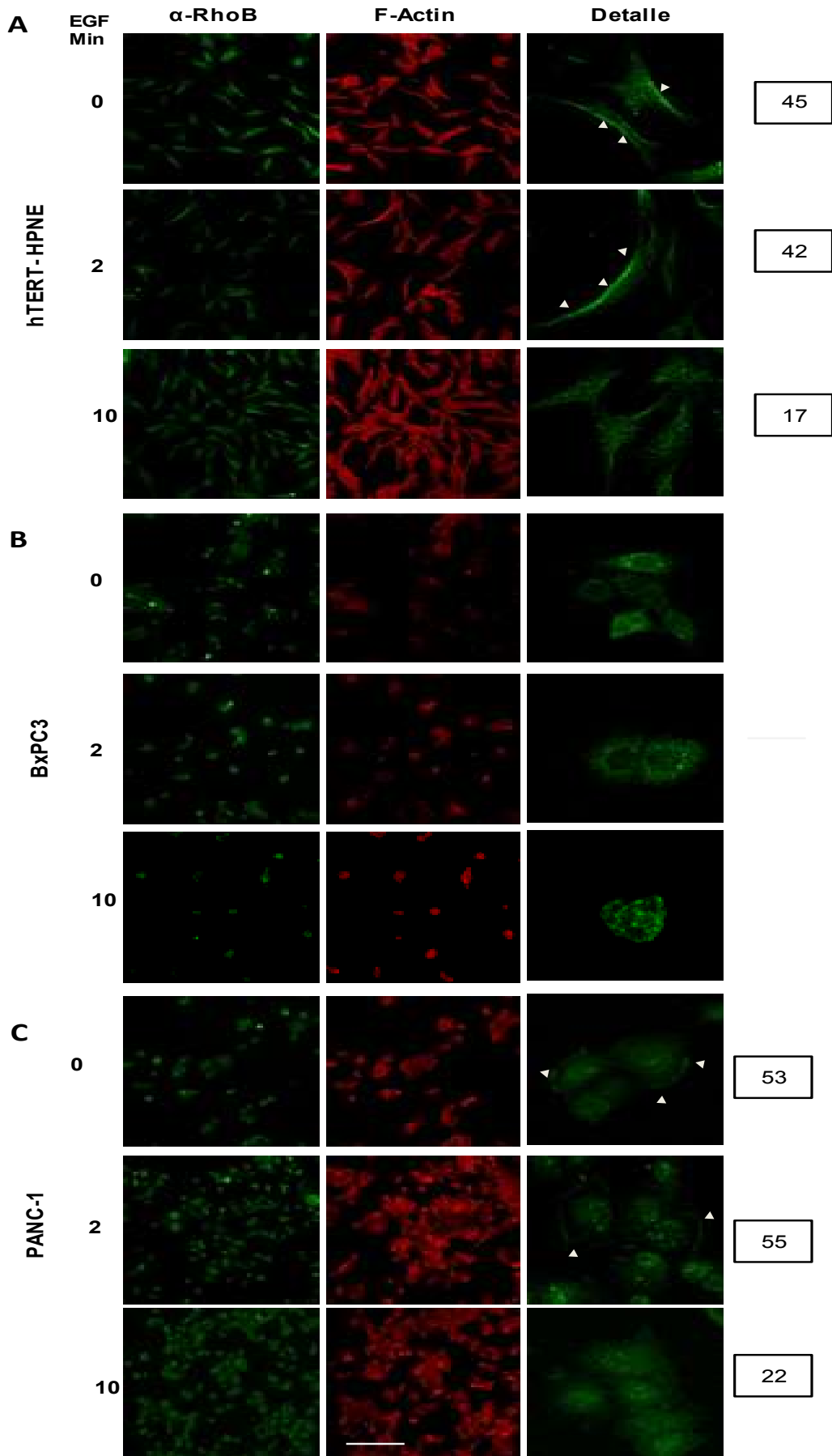


Figura 27. Estado de activación de la GTPasa RhoG en las líneas celulares pancreáticas hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1. Las células fueron sometidas a 6

horas de ayuno y posteriormente confrontadas con rhEGF por un período de 0, 2 y 10 minutos (marcadas como 0, 2 y 10). Las microscopías de fluorescencia tiñendo a la proteína RhoG (verde) fueron llevadas a cabo en las líneas celulares de hTERT-HPNE **(A)**, BxPC3 **(B)** y PANC-1 **(C)**. Para evidenciar la reorganización del citoesqueleto de actina después del estímulo con rhEGF, F-actina fue teñida con faloidina rodaminada. La cuantificación de la activación de la GTPasa RhoG fue analizada mediante ensayos tipo pulldown. Los western blots para las proteínas RhoG, Rac-1 y GAPDH para las líneas celulares hTERT-HPNE **(D)**, BxPC3 **(E)** y PANC-1 **(F)** se muestran. Para cuantificar la cantidad de RhoG-GTP y unida a Rac-1, análisis densitométricos fueron obtenidos usando Image Lab software. Para comparar la actividad de RhoG, RhoG-GTP en los lisados celulares fue normalizado con la proteína RhoG total. La proteína GAPDH fue usada como control de carga. Se muestra la tinción con azul de coomassie como control de carga de la proteína ELMO1-GST (50 µg) acoplada a perlas de Glutation sepharose. Las cabezas de flechas denotan la localización de la proteína RhoG en la periferia membranal; las cajas con números representan el número de células con este fenotipo. Escala de 100 µm.

Activación diferencial de la GTPasa RhoB en las líneas celulares pancreáticas

A pesar de que la expresión de la proteína RhoB se encuentra prácticamente abolida en las líneas celulares BxPC3 y PANC-1, decidimos evaluar si la GTPasa RhoB se encuentra activada en estas células. Debido que RhoB es una molécula estimulada por diversos factores de crecimiento, tratamos a las células con el rhEGF durante los mismos intervalos de tiempo, 0, 2 y 10 minutos (T0, T2, and T10) con el objetivo de evaluar el estado de activación de la GTPasa RhoB. Los ensayos de pulldown en la línea celular hTERT-HPNE mostraron una activación de RhoB en los T0 y T2, decayendo esta al T10 (Fig. 28D, G). Sin embargo, las células BxPC3 no mostraron un patrón de activación (Fig. 28E,H), mientras que las células de PANC-1 demostraron una activación al T0 y T10, siendo similar a lo observado en la línea celular normal (Fig. 28F,I). Para corroborar el dato de activación, cuantificamos el número de células que mostraban una localización en la membrana plasmática o cercana a ella después del tratamiento con rhEGF, observando que en las células de hTERT-HPNE y PANC-1, esta relocalización es evidente en el T0 y el T2 disminuyendo en el T10 en la línea celular hTERT-HPNE (Fig. 28A-B cajas y cabezas de flecha), lo cual concuerda con nuestros resultados de activación de RhoB.



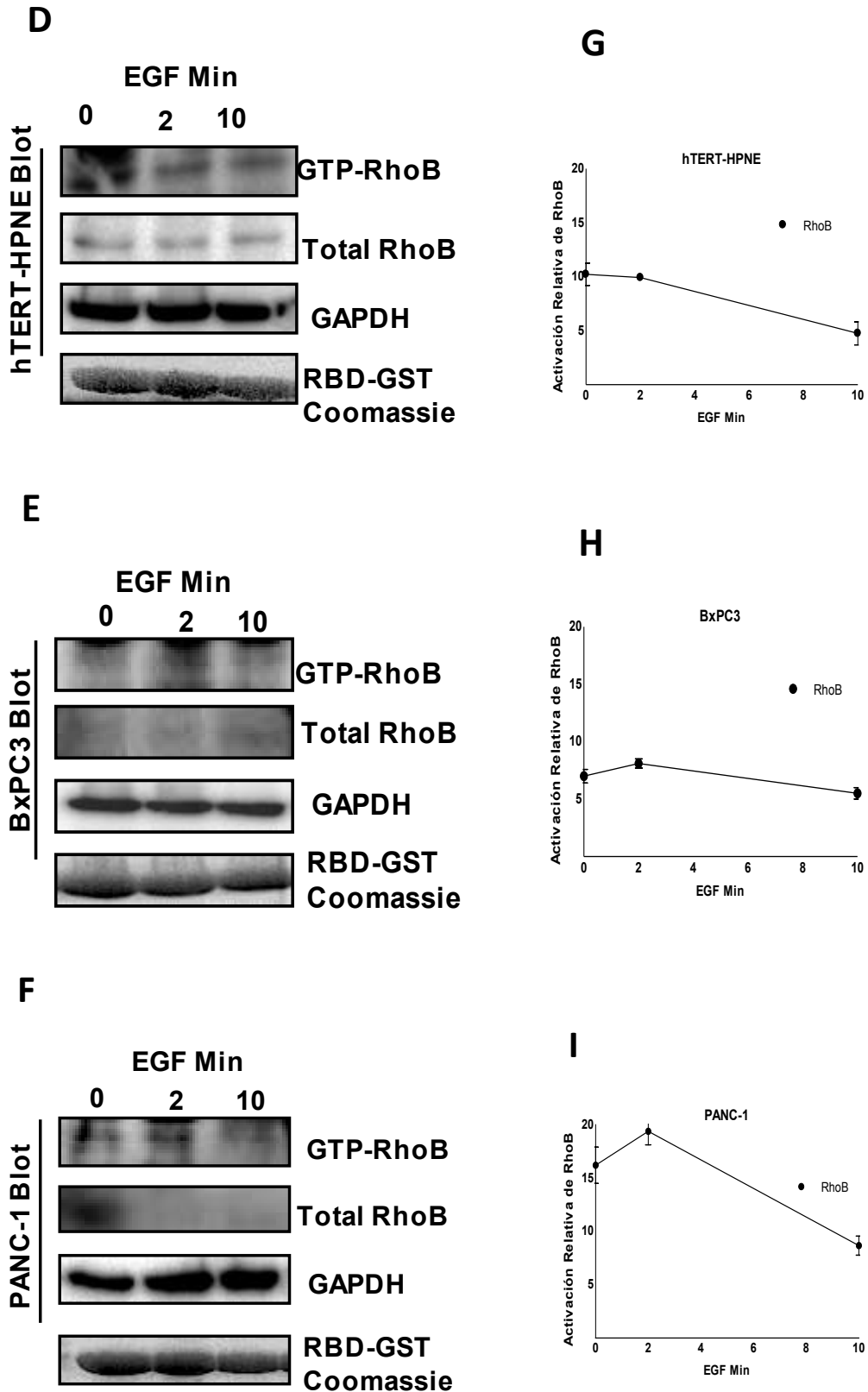


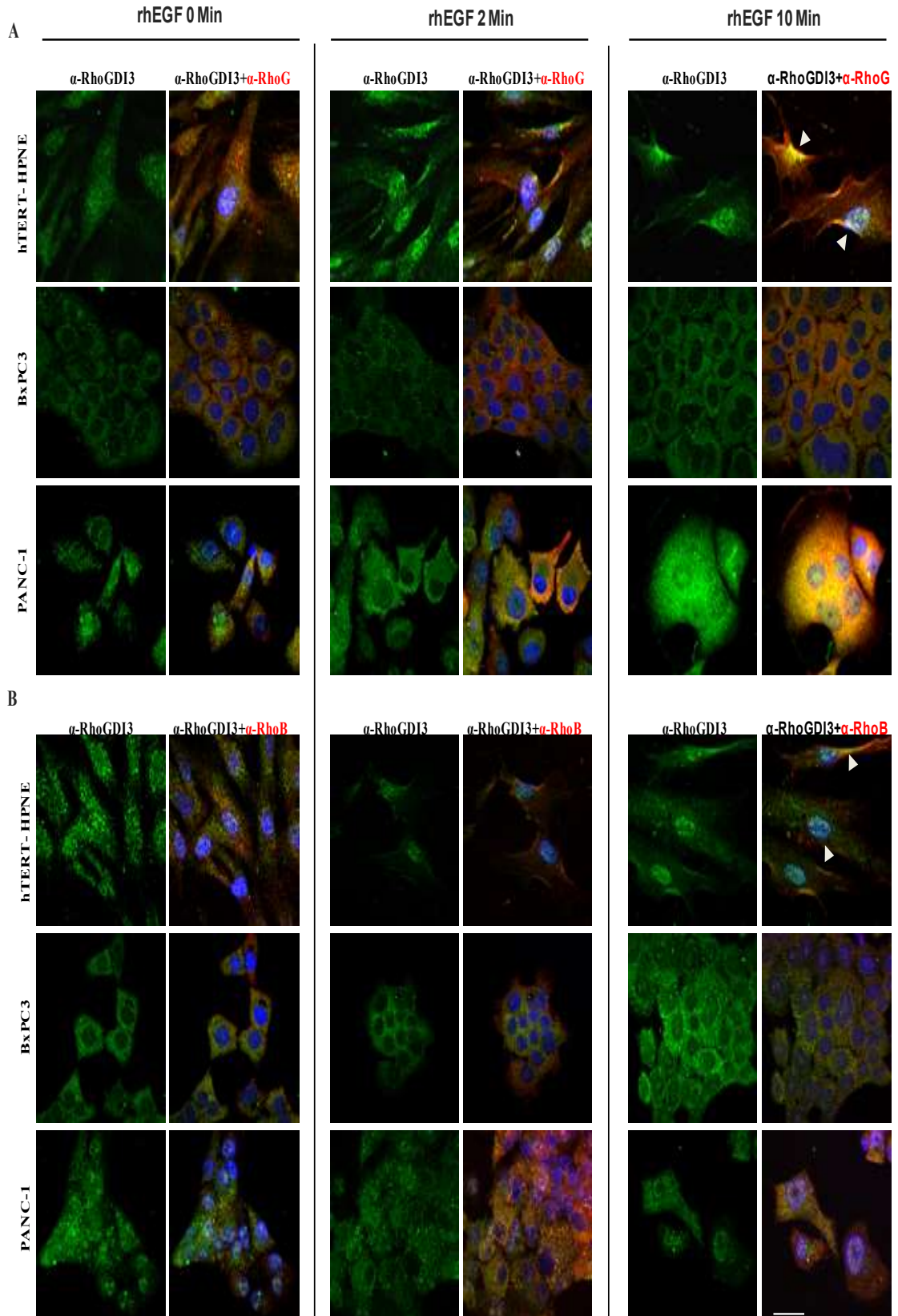
Figura 28. Estado de activación de la GTPasa RhoB en las líneas celulares pancreáticas hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1. Las células fueron sometidas a 6 horas de ayuno y posteriormente confrontadas con rhEGF por un período de 0, 2 y 10

minutos (marcadas como 0, 2 y 10). Las microscopías de fluorescencia tiñendo a la proteína RhoB (verde) fueron llevadas a cabo en las líneas celulares de hTERT-HPNE (A), BxPC3 (B) y PANC-1 (C). Para evidenciar la reorganización del citoesqueleto de actina después del estímulo con rhEGF, F-actina fue teñida con faloidina rodaminada. La cuantificación de la activación de la GTPasa RhoB fue analizada mediante ensayos tipo pulldown. Los western blots para las proteínas RhoB y GAPDH para las líneas celulares hTERT-HPNE (D), BxPC3 (E) y PANC-1 (F) se muestran. Para cuantificar la cantidad de RhoB-GTP y unida a Rac-1, análisis densitométricos fueron obtenidos usando Image Lab software. Para comparar la actividad de RhoB, RhoB-GTP en los lisados celulares fue normalizado con la proteína RhoB total. La proteína GAPDH fue usada como control de carga. Se muestra la tinción con azul de coomassie como control de carga de la proteína RBD-GST (50 µg) acoplada a perlas de Glutation sepharose. Las cabezas de flechas denotan la localización de la proteína RhoB en la periferia membranal; las cajas con números representan el número de células con este fenotipo. Escala de 100 µm.

El papel dinámico de la proteína RhoGDI3 en las líneas celulares pancreáticas

Debido al patrón de expresión y a la activación de las GTPasas RhoG y RhoB después del tratamiento con rhEGF, el siguiente paso fue indagar sobre la dinámica de colocalización de las proteínas RhoGDI3 y sus GTPasas blanco una vez que fueron estimuladas con rhEGF. Para este fin, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal analizando los tres tiempos señalados T0, T2 y T10, utilizando anticuerpos anti-RhoGDI3, anti-RhoG y RhoB. El patrón de expresión fue variado entre las líneas celulares analizadas. En las células de hTERT-HPNE y PANC-1, la proteína RhoGDI3 mostró una relocalización de la zona perinuclear a la zona perimembranal, específicamente en los lamelipodios, siendo esta relocalización mucho más evidente en el T10 (Fig. 29A, cabezas de flecha); mientras que las células BxPC3 no se observó un fenotipo característico, puesto que la señal fue difusa (Fig. 29A). Lo siguiente que decidimos elucidar, fue la posibilidad de colocalización de la proteína RhoGDI3 con sus GTPasas blanco, RhoG y RhoB, lo cual en efecto demostró un franco patrón de colocalización, siendo principalmente evidente en las protrusiones celulares (Fig. 29). Uno de los hallazgos más notorios fue el enriquecimiento de la proteína RhoGDI3 en el núcleo en la línea celular, además de la presencia de la proteína RhoG en el núcleo de las tres líneas celulares, al menos mediante este método.

Caracterización Inmunológica y Contribución Funcional de la Proteína RhoGDI3 y sus Moléculas Blanco, RhoG y RhoB, en Células Humanas Normales y Cancerosas Pancreáticas



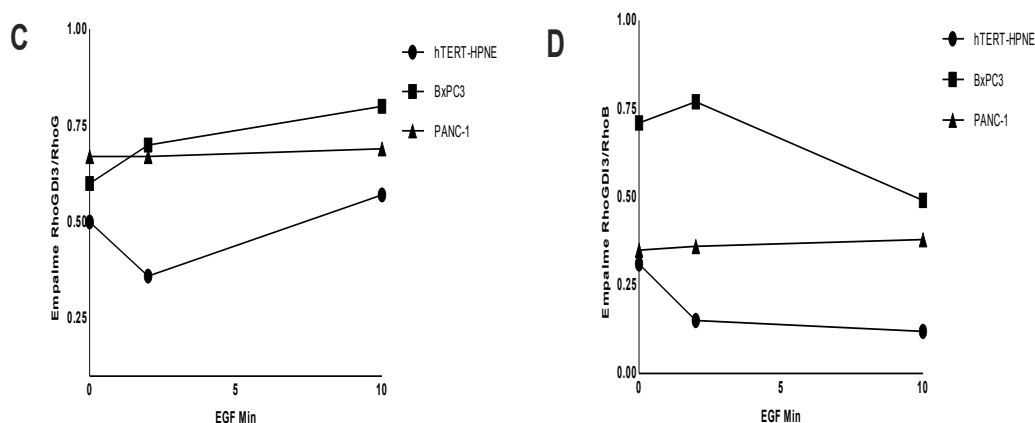


Figura 29. El papel dinámico de la proteína RhoGDI3 en las líneas celulares pancreáticas. Las células fueron sometidas a un ayuno de 6 horas y posteriormente confrontadas con rhEGF durante un período de de 0, 2 y 10 minutos (marcado en la parte superior como 0, 2 y 10 rhEGF). Ensayos de microscopía de fluorescencia tiñendo RhoGDI3 (verde), RhoG (A) y RhoB (B) (rojo, imágenes no mostradas) fueron llevadas a cabo utilizando las líneas celulares hTERT-HPNE, BxPC3 y PANC-1, panel superior, medio e inferior, respectivamente. El nivel de superposición entre las proteínas RhoGDI3 y RhoG y RhoB se muestran en las gráficas C) y D) respectivamente. Escala de 10 μ m. N=3

La proteína RhoGDI3 es localizada en el núcleo de la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE

Para confirmar nuestros hallazgos por inmunofluorescencia sobre la posible localización nuclear de la proteína RhoGDI3 en las células de hTERT-HPNE en los tres tiempos, T0, T2 y T10, llevamos a cabo ensayos de fraccionamiento subcelular para obtener fracciones nucleares y citosólicas, sometiéndolas a un análisis a través de ensayos de western blot. Las células fueron tratadas con rhEGF bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. La pureza de los extractos nucleares fue verificada utilizando un anticuerpo anti-H3, donde ninguna señal fue detectada en la fracción citoplásmica. Como marcador de citosol, utilizamos un anticuerpo anti-Aldolase B, detectando únicamente señal en la fracción citosólica (Fig. 30). Confirmamos que la proteína RhoGDI3 está presente en las fracciones nucleares y citosólicas de las células hTERT-HPNE (Fig. 30A), estando ausente en las células cancerosas, en las cuales, la proteína está limitada a la fracción citosólica, y en donde además la proteína RhoG se observó presente en ambas fracciones en las tres líneas celulares (Fig. 30). Mientras tanto, la GTPasa RhoB no fue observada en las

fracciones nucleares a diferencia de lo reportado en otros sistemas celulares (Fig. 30) [136].

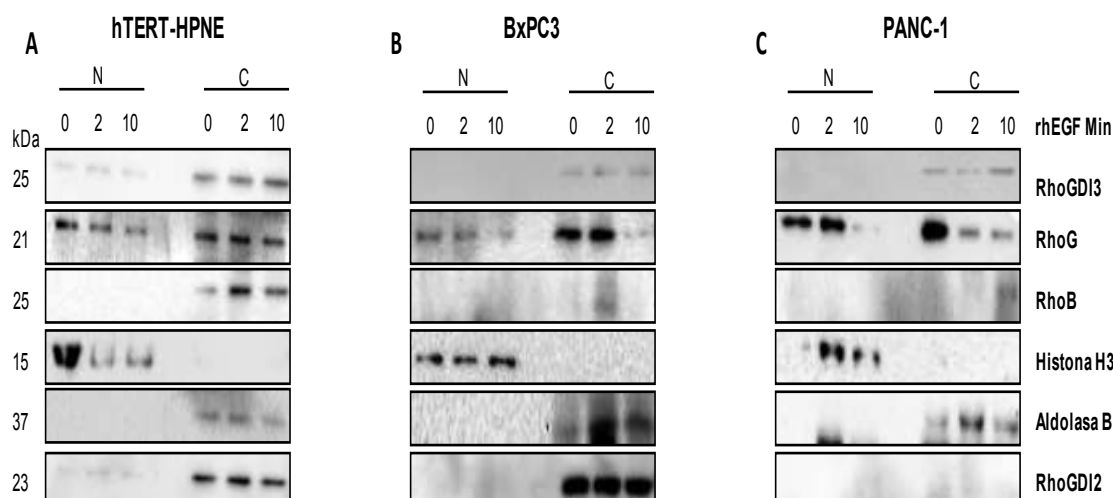


Figura 30. La proteína RhoGDI3 está localizada en los núcleos de la línea celular hTERT-HPNE después del tratamiento con rhEGF. Una vez que las células fueron confrontadas con el rhEGF (marcado en la parte superior como 0, 2 y 10 rhEGF Min), las fracciones nuclear y citosólica de las líneas hTERT-HPNE (A), BxPC3 (B) y PANC-1 (C) fueron obtenidas y analizadas mediante western blot utilizando anticuerpos anti-RhoGDI3, anti-RhoG, anti-RhoB y anti-RhoGDI2. El anticuerpo anti-histona H3 fue utilizado como control nuclear mientras que el anticuerpo anti-Aldolase B como control de citosol. Para los ensayos fueron analizados 20 µg de lisado celular fraccionado.

La proteína RhoGDI3 está presente en los núcleos de tejido normal pancreático humano

Hasta ahora, los experimentos descritos anteriormente demuestran que la proteína RhoGDI3 está presente en los núcleos de la línea celular pancreática normal hTERT-HPNE; no obstante, era crucial indagar si RhoGDI3 también estaba localizada en el núcleo de células derivadas de tejido pancreático humano. Con este fin, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de tejidos embebidos en parafina, utilizando 3 muestras normales de páncreas humano. Logramos observar que las proteínas RhoG y RhoGDI3 se encontraban predominantemente en el citoplasma del tejido pancreático normal, pero con una evidente localización nuclear (Fig. 31A y B). Aunque nos fue posible evidenciar la presencia de ambas moléculas en el tejido, no hallamos una colocalización franca como lo observamos en las líneas celulares (Fig. 31C). Interesantemente, aunque hallamos a las moléculas RhoGDI3 y RhoG en el núcleo de los tejidos normales pancreáticos humanos, la expresión de la proteína RhoG está

prácticamente ausente en las muestras de tejido derivado de biopsias con el diagnóstico histológico de PDAC, con una ligera expresión de esta en el citosol (Fig. 31C). Estos resultados demuestran que en las células cancerosas pancreáticas hay una pérdida de la expresión de la proteína RhoGDI3 en el núcleo, manteniéndose solamente en el citosol, comparado con la línea celular normal pancreática hTERT-HPNE.

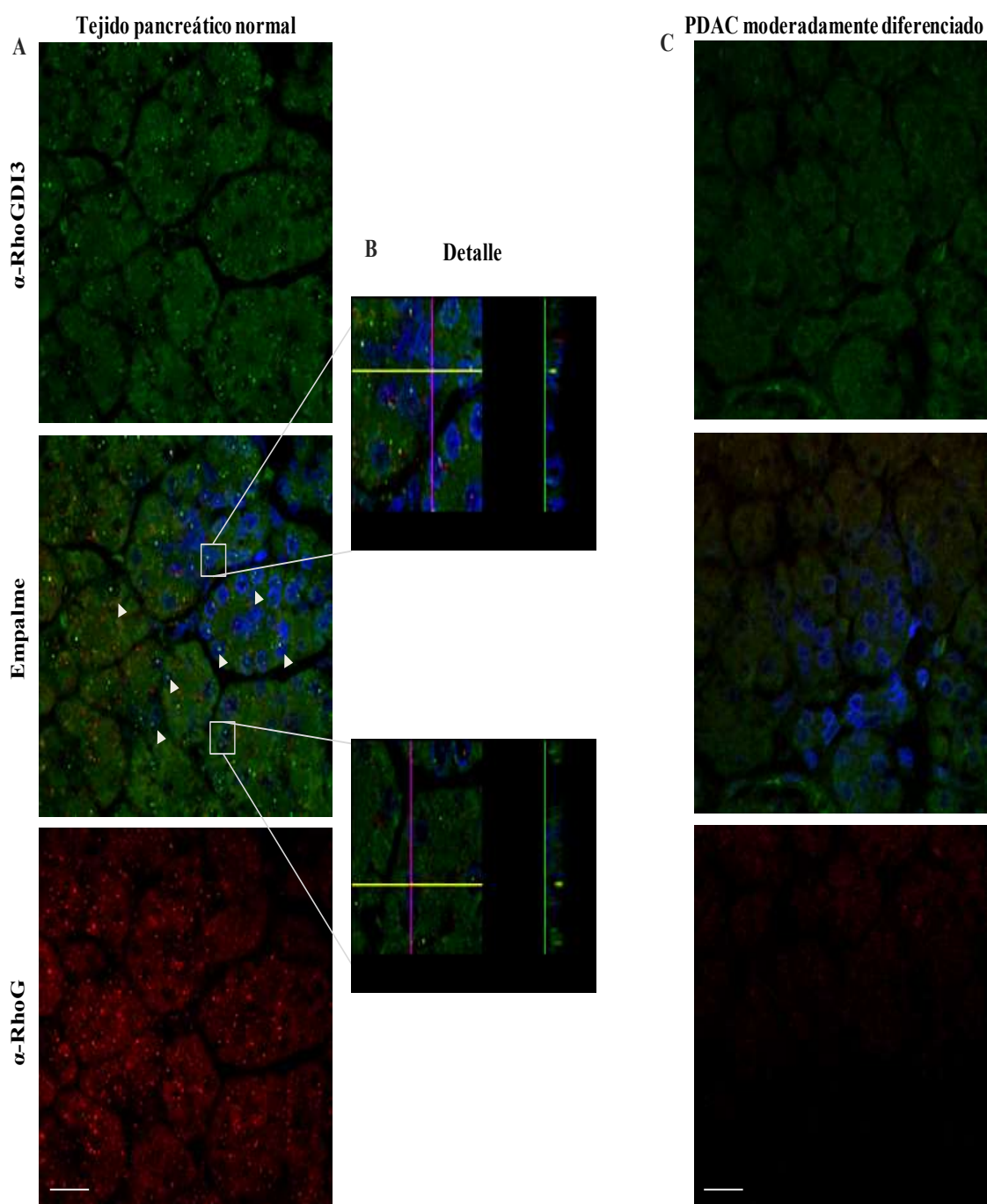


Figura 31. La proteína RhoGDI3 se encuentra localizada en los núcleos de tejido normal pancreático humano. Ensayos de microscopía de fluorescencia tiñendo a la

proteína RhoGDI3 (verde) y a la GTPasa RhoG (rojo) fueron llevados a cabo utilizando tejido pancreático humano normal (A) y biopsias con el diagnóstico histológico de PDAC moderadamente diferenciado (C). (B) Acercamiento de las proteínas RhoG y RhoGDI3 dentro de los núcleos de tejido pancreático humano. Las cabezas de flechas muestran la localización de ambas proteínas dentro del núcleo. Escala de 10 μ m. N=3

Patrón de inmunorreactividad de las proteínas RhoGDI3 y sus GTPasas blanco RhoG y RhoB en tejido humano pancreático

Hasta la fecha, no se ha evaluado la correlación de la expresión de RhoGDI3, RhoG y RhoB en tejido sano de páncreas ni en tejido con diagnóstico de PDAC; y considerando que nuestros resultados en líneas celulares nos dan indicios de la pérdida de la expresión de esta molécula en estadios más agresivos de la enfermedad, conocer el patrón de esta molécula en PDAC, en tejidos sanos y en procesos inflamatorios fue de suma importancia para sugerir en un futuro a estas moléculas como posibles biomarcadores. Para llevar a cabo este objetivo, el protocolo “Estudio del patrón de inmunorreactividad de la proteína RhoGDI3 en tejido pancreático histológicamente normal derivado de autopsias” fue sometido a las leyes de salud mexicanas y aprobado por los comités de Investigación y del Comité de Ética en Investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez, con el número de protocolo 12-36-2014. Las muestras parafinadas que fueron obtenidas del servicio de Patología, procesadas tal y como se describió en materiales y métodos.

Los resultados determinaron que las muestras de tejido pancreático sano presentaban un patrón de inmunorreactividad de la proteína RhoGDI3 en los diferentes tipos histológicos, células ductales, islotes y acinos pancreáticos (Fig.32), mientras que los tejidos con diagnóstico de PDAC mostraron un grado de inmunorreactividad bajo o nulo (Tabla 9). En los procesos inflamatorios crónicos, la expresión de la proteína tiende a desaparecer.

Tabla 9. Grado de inmunorreactividad de la proteína RhoGDI3 en tejido pancreático

Grado de inmunorreactividad de la proteína RhoGDI3 en tejidos pancreáticos						
Tejido	n	Tipo celular	Grado de inmunorreactividad			
			0	1+	2+	3+
Sano	5	Células ductales	0	1	1	3
		Islotes	0	1	3	1
		acinos	1	0	1	3
PDAC	4	Células ductales	4	0	0	0
		Islotes	2	1	0	1
		acinos	2	0	2	0
Pancreatitis crónica		Células ductales	4	1	0	1
		Islotes	1	3	0	2
		acinos	4	2	0	0
Otras patologías pancreáticas	11	Células ductales	6	1	1	2
		Islotes	2	1	2	6
		acinos	3	0	2	6

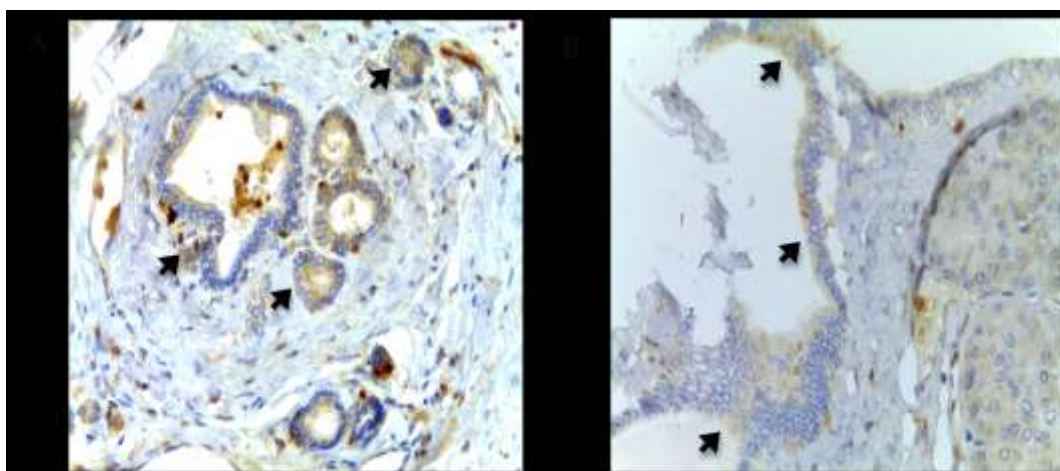


Figura 32. Micrografías del patrón de inmunorreactividad de la proteína RhoGDI3 en tejido pancreático sano. A) Expresión en islotes pancreáticos. B) Expresión focal positiva en conducto ductales pancreáticos.

En lo que respecta al patrón de inmunorreactividad de las GTPasa RhoG y RhoB, el patrón de expresión de ambas moléculas (Tablas 10 y 11) es muy similar tanto en

el tejido normal como con diagnóstico histológico de PDAC, es decir, presentan una señal débil y casi ausente. Este resultado contrasta de manera importante con los hallazgos de sobreexpresión de la GTPasa RhoG en la línea celular PANC-1; mientras que este hallazgo es completamente equiparable con la expresión baja de la GTPasa RhoB tanto en las líneas celulares sana, hTERT-HPNE y cancerosa en estado temprano, BxPC3 y estadio más agresivo (PANC-1).

Tabla 10. Grado de inmunorreactividad de la GTPasa RhoG en tejidos pancreáticos

Grado de inmunorreactividad de la GTPasa RhoG en tejidos pancreáticos						
Tejido	n	Tipo celular	Grado de inmunorreactividad			
			0	1+	2+	3+
Sano	5	Células ductales	4	1	0	0
		Islotes	5	1	0	0
		acinos	5	0	0	0
PDAC	4	Células ductales	3	1	0	0
		Islotes	4	0	0	0
		acinos	4	2	0	0
Procesos inflamatorios crónicos	6	Células ductales	6	0	0	0
		Islotes	6	0	0	0
		acinos	4	1	1	0
Otras patologías pancreáticas	11	Células ductales	10	1	0	0
		Islotes	11	0	0	0
		acinos	7	1	3	0

Tabla 11. Grado de inmunorreactividad de la GTPasa RhoB en tejidos pancreáticos

Grado de inmunorreactividad de la GTPasa RhoB en diversos tejidos pancreáticos						
Tejido	n	Tipo celular	Grado de inmunorreactividad			
			0	1+	2+	3+
Normal	5	Células ductales	3	2	0	0
		Islotes	5	0	0	0
		acinos	5	0	0	0
PDAC	4	Células ductales	4	0	0	0
		Islotes	4	0	0	0
		acinos	2	2	0	0
Pancreatitis crónica	6	Células ductales	6	0	0	0
		Islotes	6	0	0	0
		acinos	4	2	0	0
Otras patologías pancreáticas	11	Células ductales	8	0	3	0
		Islotes	10	0	1	0
		acinos	8	0	2	1

Contribución Funcional de la proteína RhoGDI3 en la línea celular PANC-1

Obtención de las transfectantes estables sobreexpresando a la proteína RhoGDI3 en la línea celular PANC-1

Nuestros resultados hasta ahora demuestran que hay una expresión significativamente baja de la molécula RhoGDI3 (aproximadamente el 50%) en los extractos de la línea PANC-1 comparado con los extractos totales de la línea celular no cancerosa hTERT-HPNE; por lo que el siguiente paso fue conocer cuál es la contribución funcional de la proteína RhoGDI3 al reconstituir el sistema, PANC-1, sobreexpresando a la proteína utilizando la técnica de transfección tal y como se describió en la sección de materiales y métodos.

Para llevar a cabo el objetivo planteado, la región codificante para la proteína RhoGDI3 fue amplificada utilizando el RNA total extraído de la línea celular hTERT-HPNE, la cual previamente había sido verificada por secuenciación automática demostrando que no hay cambios en la secuencia codificante. Mediante la técnica de RT-PCR, con los oligonucleótidos sintéticos específicos, a los cuales se les agregó una secuencia de corte para enzimas de restricción y una secuencia codificante para la bandera FLAG, como fue descrito en materiales y métodos; el producto obtenido fue migrado en un gel de agarosa al 1% observándose una banda de 726 bp, la cual codifica para la proteína RhoGDI3 acoplada en su extremo carboxilo terminal con una bandera FLAG, que permitió discernir entre la proteína exógena de la proteína endógena (Fig. 33). La región amplificada fue purificada para realizar la clonación dirigida en los sitios de restricción BamH1 y Xho1 presentes dentro del vector de clonación procarionte pCR2.1; posteriormente, esta ligación fue utilizada para transformar bacterias de la cepas de *E. coli* DH5 α

La selección de las colonias positivas fue llevada a cabo mediante la técnica de PCR de colonia. De las colonias positivas, se eligió la colonia 1 para la extracción del DNA plasmídico para su posterior digestión con las enzimas BamH1 y Xho1 (Fig. 33D); como se observa en la imagen, la digestión de este plásmido liberó un inserto del tamaño esperado para RhoGDI3-FLAG (726 pb). La confirmación de que el amplicón RhoGDI3-FLAG fue clonado en el vector pCR2.1 se llevó a cabo,

mediante la secuenciación del DNA plasmídico utilizando los oligonucléotidos sintéticos M13 Fw y Rv. El análisis del resultado de la secuenciación nos confirmó que el marco de lectura clonado en el vector pCR2.1 fue el correspondiente para la molécula RhoGDI3-FLAG (Fig. 33E).

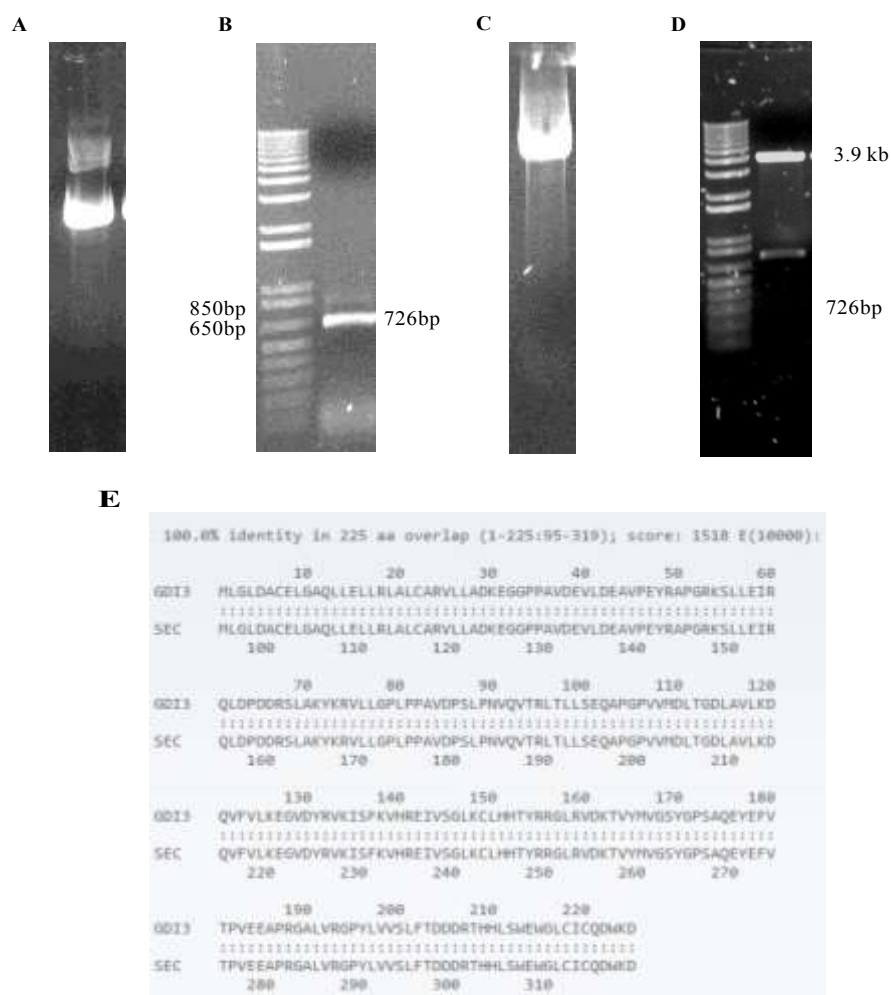


Figura 33. Clonación de la secuencia codificante para la proteína RhoGDI3-Flag en el vector de clonación pCR2.1. A) DNA plasmídico pCR2.1-RhoGDI3 para la obtención del amplicón de 726 bp, RhoGDI3-Flag (B). C) Obtención del DNA plasmídico pCR2.1-RhoGDI3-Flag de colonias bacterianas. D) Digestión del DNA plasmídico pCR2.1-RhoGDI3 –Flag y obtención del inserto RhoGDI3-Flag. E) Secuenciación automática del plásmido pCR2.1-RhoGDI3 –Flag.

Una vez confirmada que la secuencia codificante para la proteína RhoGDI3-FLAG se encontraba en marco de lectura correcto, se procedió a digerir el inserto y purificarlo para realizar la clonación dirigida en los sitios de restricción Kpn1 y Xho1 presentes dentro del vector de expresión eucariote pCDNA3 para posteriormente

realizar la transformación utilizando la cepa bacteriana *E. coli DH5α* con el vector pCDNA-RhoGDI3-FLAG. La selección de las colonias positivas para la clonación fue llevada a cabo mediante la técnica de PCR de colonia (Fig. 34A) utilizando los oligonucleótidos utilizados para la amplificación original del inserto. De todas las colonias analizadas, se eligió una de las tres positivas, para la extracción del DNA plasmídico (Fig. 34C) y su posterior digestión con las enzimas Kpn1 y Xho1 (Figura 34D), donde observamos que el plásmido pCDNA3 liberó un inserto de 726 bp, correspondiente a

RhoGDI3-FLAG, lo cual nos permitió confirmar la clonación en este vector de expresión eucarionte pCDNA3. Esta clonación se utilizó para la secuenciación automática (Fig. 34E) y la posterior transfección mediante la técnica de lipofección.

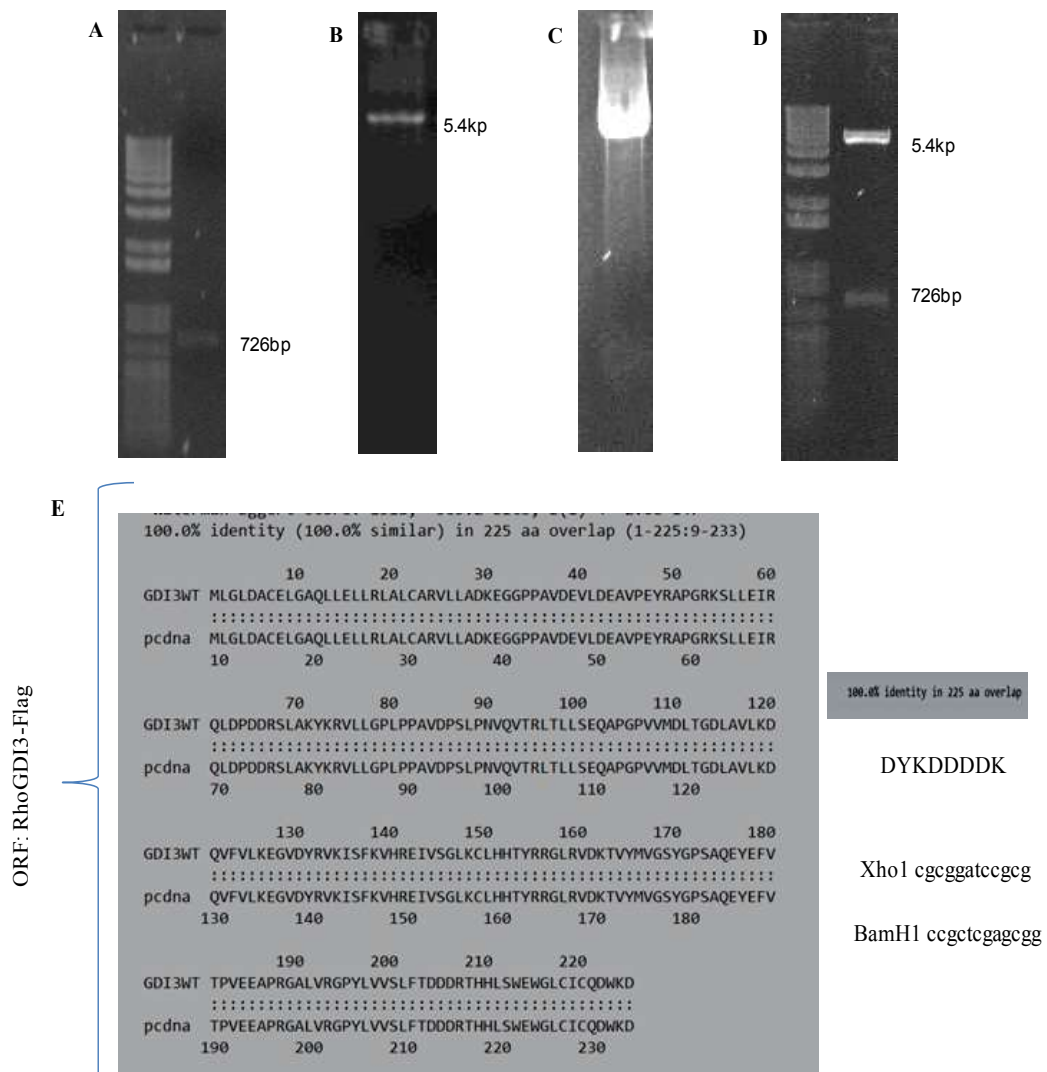


Figura 34. Clonación de la secuencia codificante para la proteína RhoGDI3-Flag en el vector de expresión mamario pCDNA3. **A)** Digestión del DNA plasmídico pCR2.1-RhoGDI3 –Flag y obtención del inserto RhoGDI3-Flag . **(B)** Digestión y purificación del plásmido pCDNA3. **C)** Obtención del DNA plasmídico pCDNA3-RhoGDI3-Flag. **D)** Liberación del inserto RhoGDI3-Flag del plásmido pCDNA3-RhoGDI3 –Flag. **E).** Secuenciación automática del plásmido pCDNA3-RhoGDI3 –Flag.

Una vez que la línea celular PANC-1 en el pasaje 4 fue transfectada, se verificó la eficiencia de transfección, utilizando como control de transfección al vector pGFP-N1. Posterior a las 36 horas del proceso de transfección, las células se despegaron y 100,00 de ellas fueron fijadas sobre un cubreobjetos, los núcleos fueron teñidos con DAPI y montadas para su sellado y su subsecuente visualización. El porcentaje de transfección fue del 85%, el cual fue obtenido al observar diferentes campos y contabilizando 100 células. (Fig. 35).

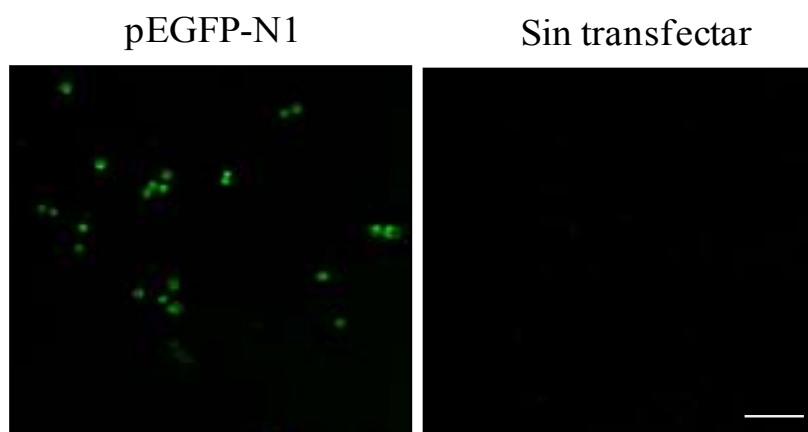


Figura 35. Eficiencia de transfección utilizando el plásmido pEGFP-N1 n la línea celular PANC-1. Micrografía representativa de la línea celular PANC-1 después de 36 horas posttransfección con el plásmido pEGFP-N1. Verde: Proteína verde Fluorescente. Escala 100 μ m.

El resto de las células despegadas, fueron sembradas en cajas multipozos de 6 con el medio completo correspondiente a la línea celular adicionando el agente selector G418 a una concentración de 1000 μ g/ml, esta dosis fue establecida mediante un ensayo viabilidad celular con cristal violeta utilizando monocapas de la línea celular PANC-1 sin transfectar. (Fig. 36), ver materiales y métodos.

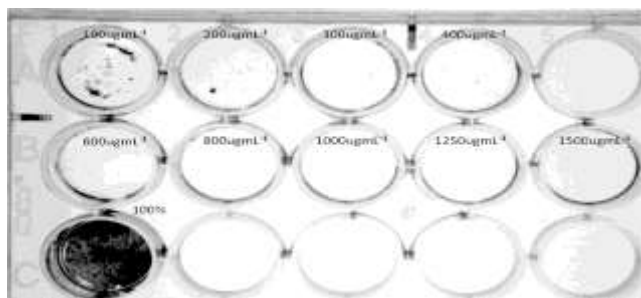


Figura 36. Curva de selección con G418 en la línea celular PANC-1 en el día 13.

Las células fueron sometidas a la selección durante 3 semanas, llevando como control de viabilidad a las células de PANC-1 sin transfectar. Una vez que el control no fue viable, se disminuyó la concentración del agente selector a 500 µg/ml, como dosis de mantenimiento.

Inmunodetección de la proteína exógena RhoGDI3-FLAG en extractos protéicos totales de la línea celular PANC-1

Con el objetivo de determinar que las células de PANC-1 transfectadas expresaban la proteína exógena RhoGDI3-Flag, se realizó un ensayo de western blot, para lo cual se utilizaron extractos totales de las transfectantes estables pCDNA3 (MOCK), pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 1) y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 2). La inmunodetección para la proteína RhoGDI3-Flag, se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Flag, a una dilución de 1:500. Los resultados experimentales del Western blot mostraron la inmunodetección de una banda única localizada con un peso esperado de aproximadamente 25 KDa (Fig. 37) correspondiente a la proteína exógena RhoGDI3-Flag en los extractos totales de las transfectantes pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 1) y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 2), no así en los extractos de las transfectantes pCDNA3 (MOCK) (Fig. 37).

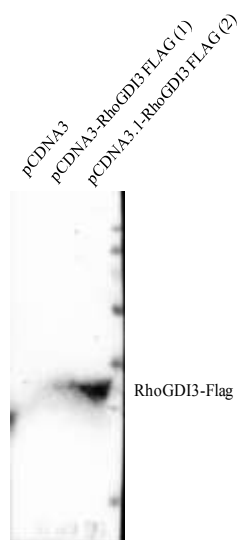


Figure 37. Western blot del sistema de sobreexpresión generado en la línea celular PANC-1 para aumentar la traducción de la proteína RhoGDI3. Western blot de extractos protéicos totales de las clónas pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (clona 1 y clona 2) de PANC-1 utilizando los anticuerpo anti-Flag (1:1000).

Una vez que fue confirmada por western blot la presencia de la proteína exógena RhoGDI3-Flag, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la presencia y localización subcelular de la proteína exógena RhoGDI3-Flag las transfectantes estables de PANC-1, pCDNA3 (MOCK), pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 1) y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 2), utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Flag. Los resultados observados demostraron que la proteína RhoGDI3-Flag fue localizada tanto en el citoplasma, así como, sugerente en el núcleo (Fig 40). Esto nos sugirió que el patrón de distribución de la proteína exógena RhoGDI3-Flag en las transfectantes estables al enriquecer la expresión de la proteína RhoGDI3 total, esta se localiza en los núcleos, tal y como fue observado en la línea celular hTER-HPNE.

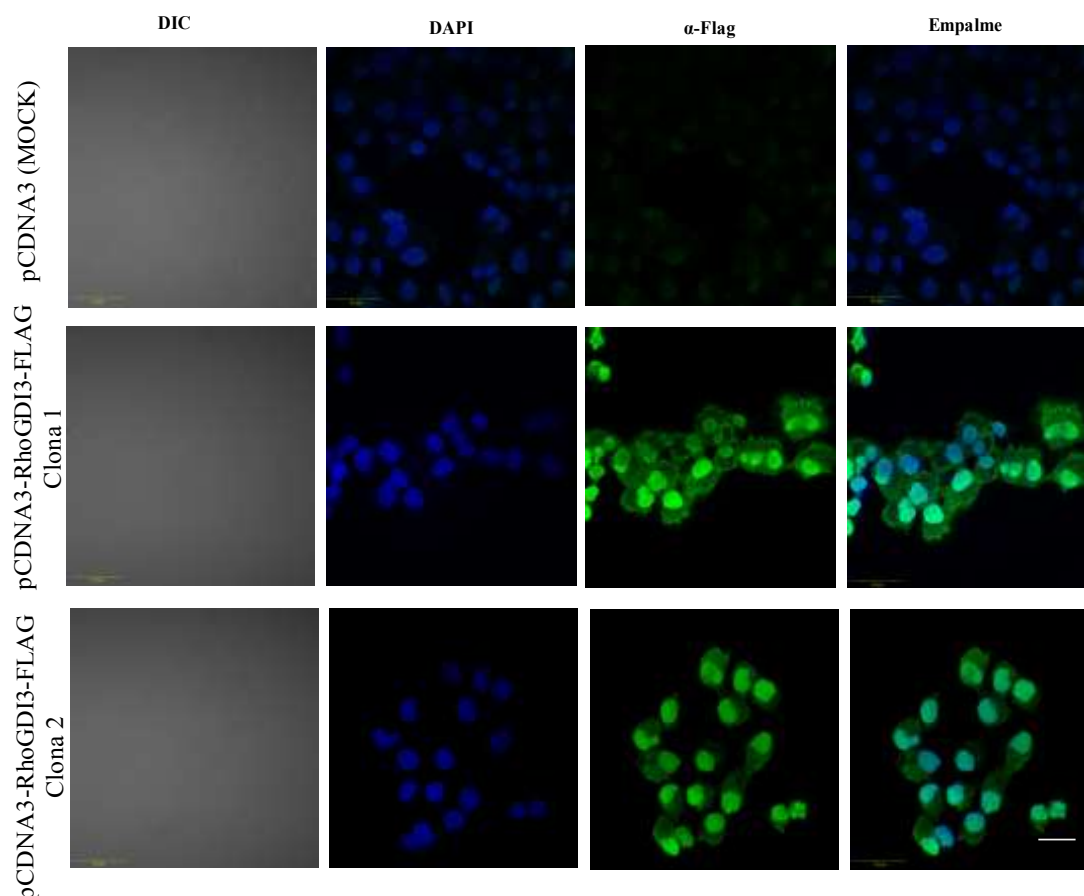


Figura 38. Micrografías representativas de la tinción de la proteína exógena RhoGDI3-Flag. Clonas pCDNA3 y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (clona 1 y clona 2), panel superior, medio e inferior, respectivamente. Para los ensayos fueron analizados 20 μ g de lisado celular. Escala 20 μ m.

Obtención de las transfectantes estables *knockdown* mediante shRNA disminuyendo la expresión de la proteína RhoGDI3 en la línea celular PANC-1

Existen diversas metodologías para el análisis funcional de las proteínas, uno de ellos es el ensayo de sobreexpresión de la proteína RhoGDI3; sin embargo, otra de las perspectivas interesantes fue conocer si el fenotipo de la línea celular PANC-1, era más agresivo al disminuir más la expresión de la proteína endógena RhoGDI3, por lo que el siguiente objetivo fue obtener un *knockdown* de la proteína endógena RhoGDI3. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando plataformas computacionales tal y como se describió en materiales y métodos. Se eligieron 4 secuencias del mRNA de RhoGDI3 para la obtención de los shRNA; la primera de ellas llamada Ck, representa la secuencia scramble de la secuencia R1, es decir, no

afecta la traducción de la proteína RhoGDI3; las secuencias R1, R2, R3, son las secuencias elegidas que tienen como blanco al mRNA de RhoGDI3, estas secuencias están localizadas en la parte intermedia de la secuencia del mRNA. (Fig. 39A). Cada par de oligonucleótidos fue alineado para generar un DNA de doble cadena (Fig. 39B, C), posteriormente fueron clonados en el vector de expresión mamario pSR-GFP-Neo, el cual fue digerido con las enzimas de restricción HindIII y BglII (Fig. 40); migrado y purificado en un gel de agarosa al 1%. El vector y el DNA de doble cadena fueron ligados durante toda la noche. Las construcciones se utilizaron para transformar bacterias de la cepa de *E. coli DH5α* (Fig. 39D).

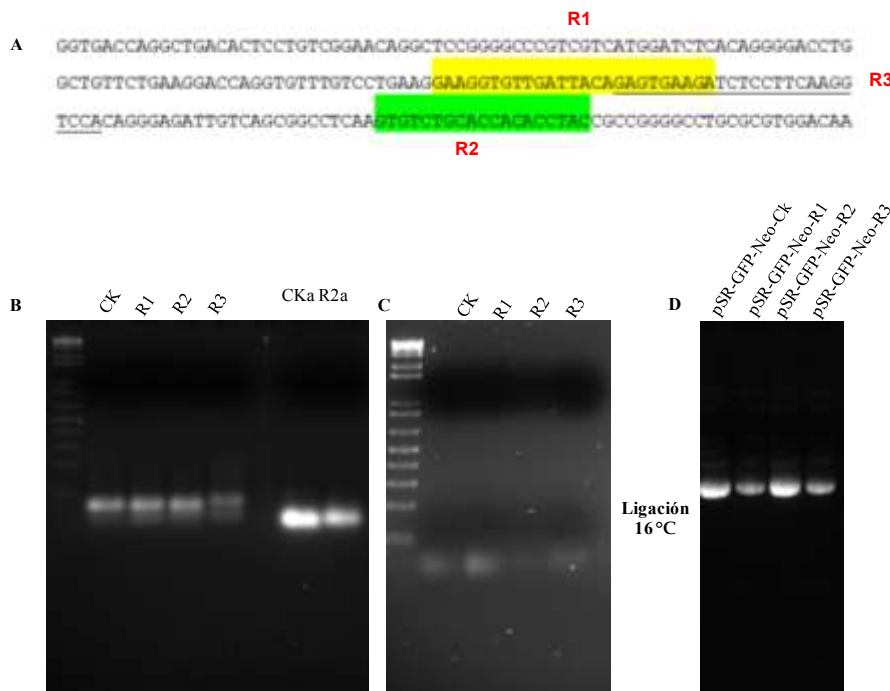


Figura 39. Obtención de los oligonucleótidos sintéticos para la generación de shRNA-RhoGDI3. A) Secuencia nucleotídica del mRNA codificante para la proteína RhoGDI3 mostrando los 3 sitios con alto puntaje para la generación eficiente de *knockdown*. B) Alineamiento de los oligonucleótidos sintéticos para la generación del DNA de doble cadena, CK, R1, R2 y R3; Cka y R2a se muestran como control de DNA de una cadena. C) Purificación del DNA de doble cadena CK, R1, R2 y R3. D) Obtención de los plásmidos pSR-GFP-Neo-CK, R1, R2 y R3.

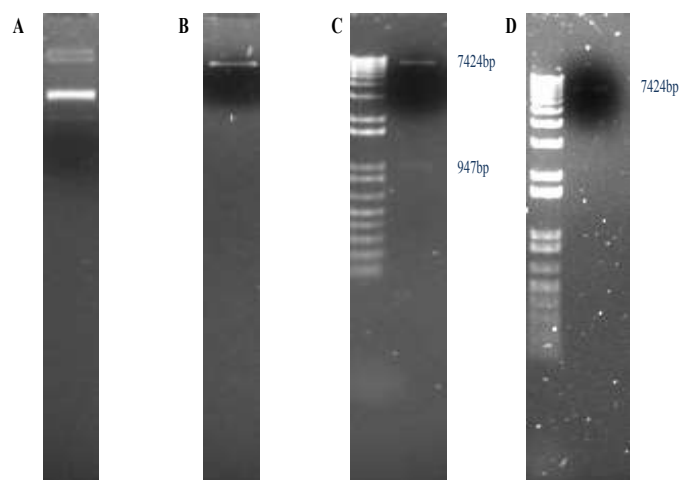
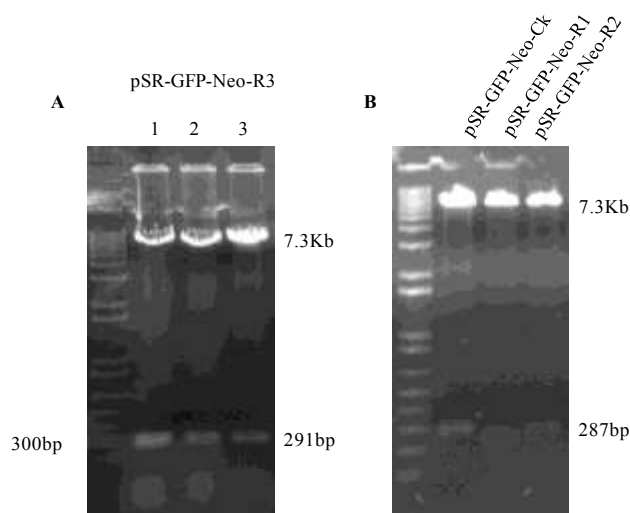


Figura 40. Digestion del vector pSR-GFP-Neo. A) Corrimiento del Plásmido pSR-GFP-Neo circular en un gel de agarosa al 1%. B) Digestión del plásmido con la enzima HindIII. C) Digestión enzimática con la enzima BglII, liberando un inserto de 947 bp correspondiente a la secuencia de relleno del vector. D) Purificación del plásmido pSR-GFP-Neo linearizado para su posterior ligación con el DNA de doble cadena.

Para la detección de clonas positivas, se seleccionaron varias colonias, de las cuales se obtuvieron los plásmidos a través de la técnica de lisis alcalina. Los plasmidos fueron migrados en un gel de agarosa al 1% para conocer la cantidad del material plasmídico a digerir (Fig. 39D) con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII; las clonas positivas liberaron un inserto de 281 pares de bases (Fig. 41). Adicionalmente, la correcta inserción del DNA de doble cadena en el vector pSR-GFP-Neo fue confirmada por secuenciación automática (Fig. 41C-F).



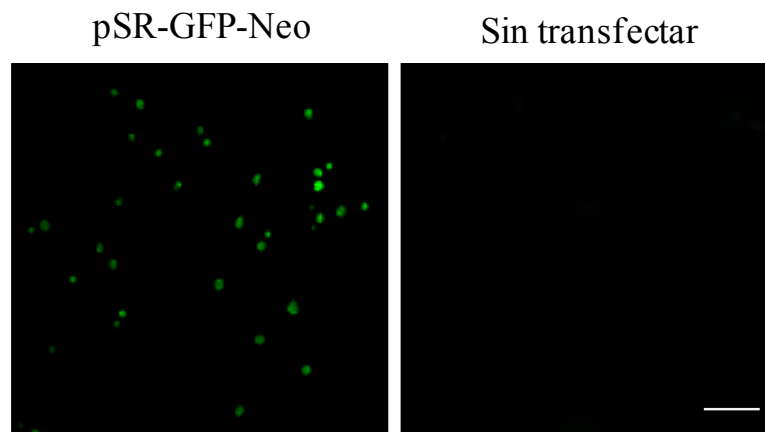


Figura 42. Eficiencia de transfección utilizando el plásmido pSR-GFP-Neo la línea celular PANC-1. Micrografía representativa de la línea celular PANC-1 después de 36 horas posttransfección con el plásmido pSR-GFP-Neo. Verde: Proteína verde Fluorescente. Escala 100 μ m.

El resto de las células despegadas, fueron sembradas en cajas multipozos de 6 con el medio completo correspondiente a la línea celular adicionando el agente selector G418 a una concentración de 1000 μ g/ml, esta dosis fue establecida mediante un ensayo viabilidad celular utilizando monocapas de la línea celular PANC-1 sin transfectar tal y como fue descrito en materiales y métodos.

Las células fueron sometidas a la selección durante 3 semanas, llevando como control de viabilidad a las células de PANC-1 sin transfectar. Una vez que el control no fue viable, se disminuyó la concentración del agente selector a 500 μ g/ml, como dosis de mantenimiento.

Inmunodetección de la proteína endógena RhoGDI3 en extractos protéicos totales de las transfectantes estables pSR-GFP-Neo, pSR-GFP-Neo-Ck, pSR-GFP-Neo-R1, pSR-GFP-Neo-R2, pSR-GFP-Neo-R3 de PANC-1

Con el objetivo de determinar que las células de PANC-1 transfectadas demostraban una disminución de la proteína endógena RhoGDI3, se realizó un ensayo de western blot, para lo cual se utilizaron extractos totales de las transfectantes pSR-GFP-NEO, pSR-GFP-NEO-Ck, pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3. La inmunodetección de la molécula RhoGDI3, se realizó utilizando el anticuerpo policlonal anti-RhoGDI3, a una dilución de 1:3000. Los resultados experimentales

del Western blot mostraron la inmunodetección de una banda única localizada con un peso esperado de aproximadamente 25 kDa (Fig. 43B) correspondiente a la proteína RhoGDI3. De las tres transfectantes, pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3, esta última demostró un abatimiento de la expresión de aproximadamente 50% comparada con los controles pSR-GFP-NEO, pSR-GFP-NEO-Ck (Fig. 43).

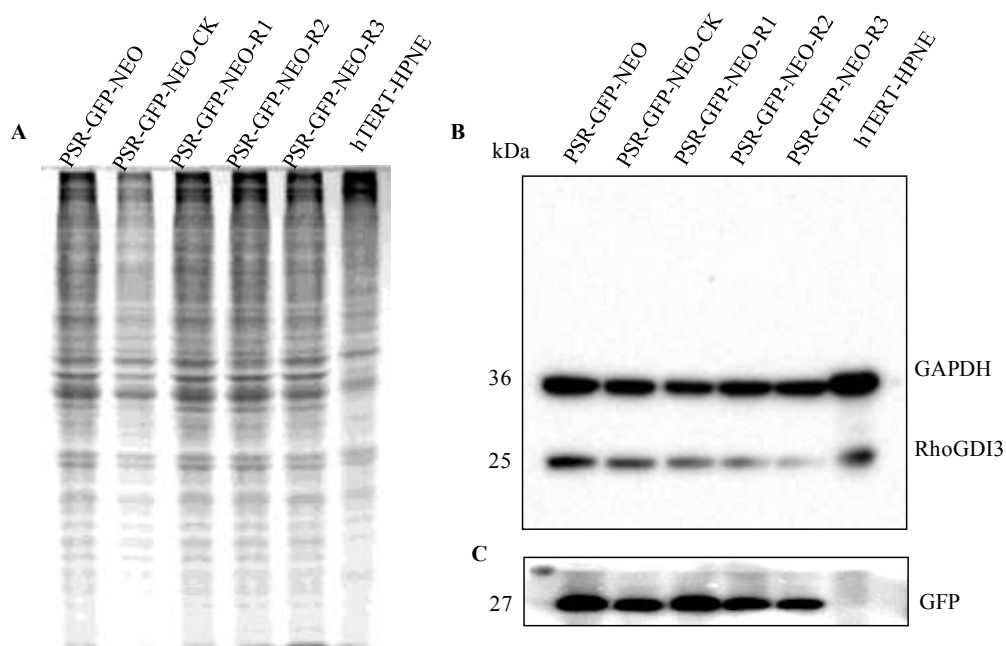


Figura 43. Western blot del sistema *knock-down* generado en la línea celular PANC-1 para disminuir la traducción de la proteína RhoGDI3. A) Extractos protéicos totales de las clonas pSR-GFP-Neo-Ck, R1, R2 y R3 de PANC-1 son mostrados en un gel de acrilamida al 12% teñido con azul de coomassie. B) Western blot de extractos protéicos totales de las clonas pSR-GFP-Neo-Ck, R1, R2 y R3 utilizando los anticuerpo anti-RhoGDI3, anti-GAPDH y anti-GFP (C). Para los ensayos fueron analizados 20 μ g de lisado celular.

Para corroborar este abatimiento, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular de la proteína endógena RhoGDI3 en las transfectantes estables de PANC-1: pSR-GFP-NEO, pSR-GFP-NEO-Ck, pSR-GFP-NEO-R1, pSR-GFP-NEO-R2, pSR-GFP-NEO-R3 utilizando el anticuerpo policlonal anti-RhoGDI3. Los resultados demostraron y corroboraron que las tres secuencias, R1, R2 y R3 disminuyeron significativamente la traducción de la proteína RhoGDI3, siendo mucho más evidente en las transfectantes pSR-GFP-NEO-R3 (Fig. 44).

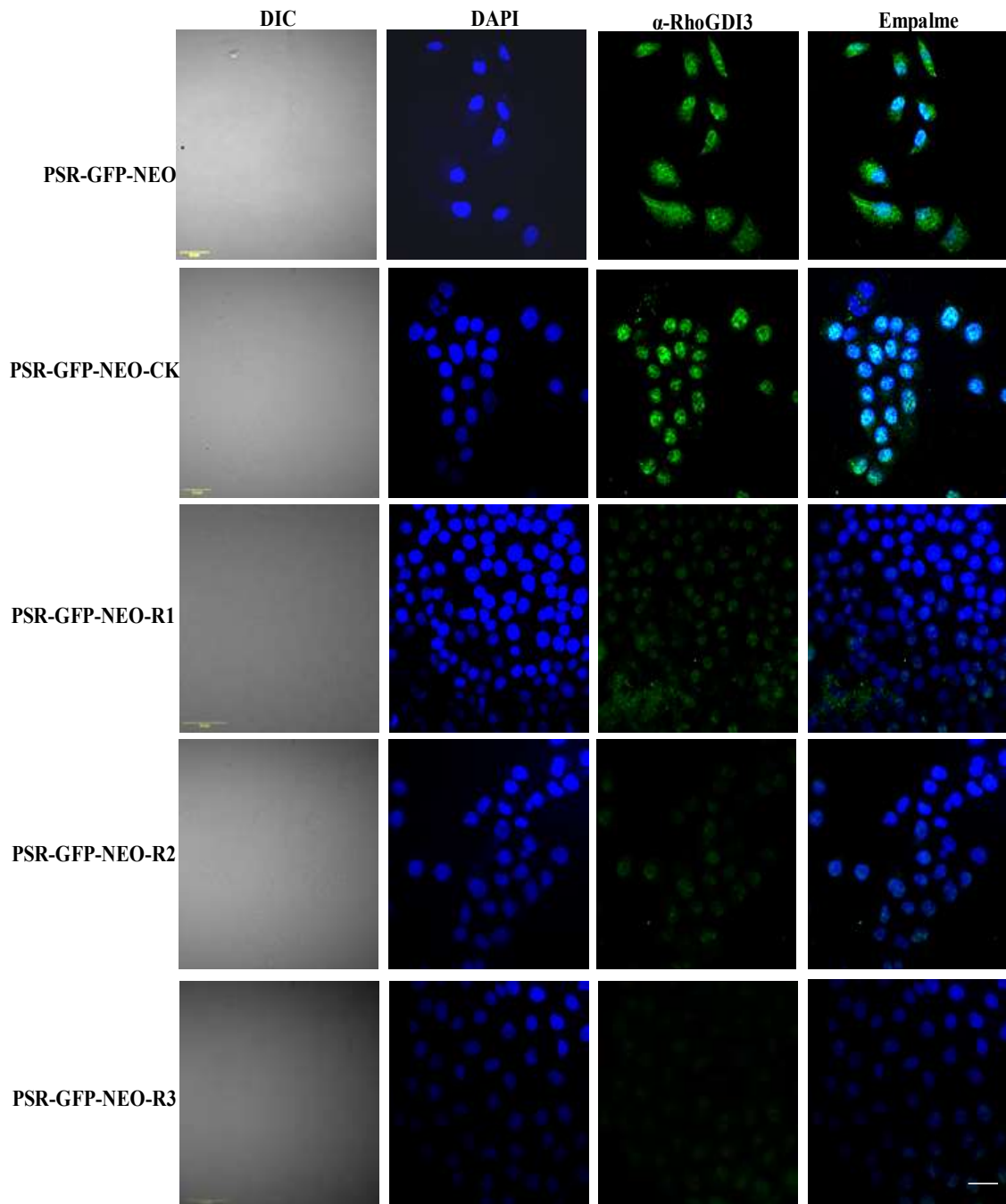


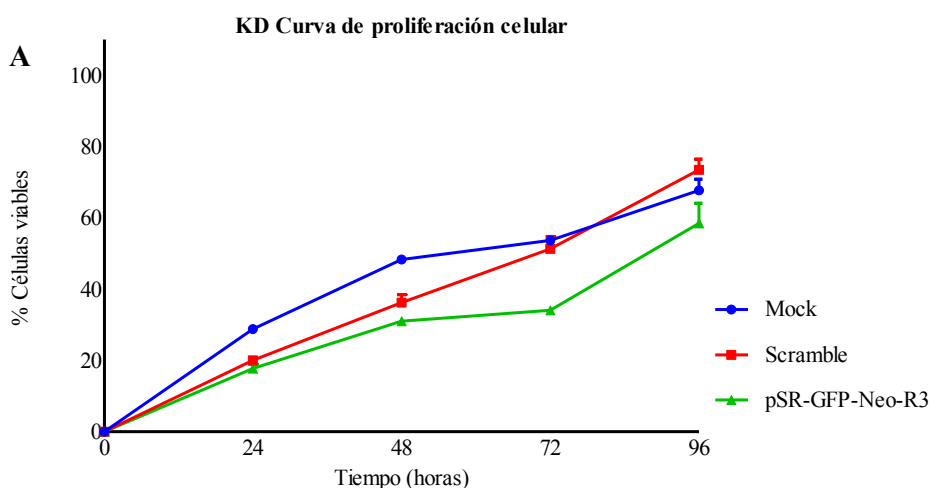
Figura 44. Microscopía confocal en las clonas pSR-GFP-Neo-Ck, R1, R2 y R3 de la línea celular PANC-1 . A) Tinción de la proteína RhoGDI3 (verde) y los núcleos con DAPI (azul) utilizando el anticuerpo anti-RhoGDI3 en las clonas pSR-GFP-Neo-Ck , R1, R2 y R3 de PANC-1. Escala 20 μ m.

Ensayos *in vitro*

Una vez que hubimos establecido nuestros sistemas de knockdown y sobreexpresión, decidimos estudiar los efectos de la molécula RhoGDI3 en proliferación, resistencia a quimioterápicos, transformación maligna y migración, eventos celulares indispensables para la carcinogénesis y metástasis. Para llevar a cabo estos ensayos, seleccionamos las siguientes clonas del sistema de knock-down: pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (Problema); mientras que para el sistema de sobreexpresión utilizamos las tres clonas, es decir, pCDNA3 (Mock), pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 1) y pCDNA3-RhoGDI3-Flag (Clona 2).

Potencial proliferativo en las transfectantes *knockdown* y la sobreexpresión de RhoGDI3

Para evaluar el potencial proliferativo de nuestras clonas transfectadas de PANC-1, cada una de las clonas fue cultivada y tratada como fue descrito en materiales y métodos. Los resultados de este ensayo nos demostraron que el knockdown de RhoGDI3, es decir, la clona pSR-GFP-Neo-R3 tiene una capacidad proliferativa más lenta que la clona mock y la clona scramble (Fig. 45^a); sin embargo, la tendencia a proliferar sigue el mismo patrón de las clonas controles; mientras que la sobreexpresión no nos permitió ver un claro efecto en la proliferación (Fig. 45B).



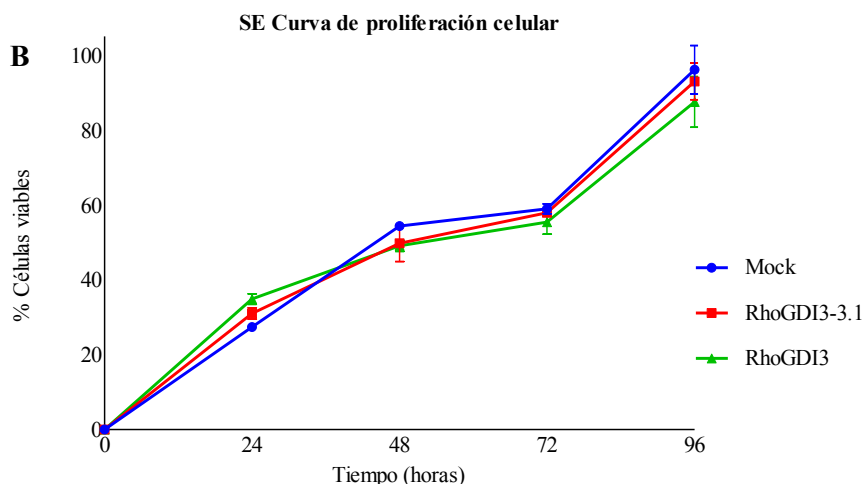


Figura 45. Curva de viabilidad celular (Células viables) del knockdown y la sobreexpresión de RhoGDI3 en la línea celular PANC-1. A) Gráfica de viabilidad celular del knockdown (KD), donde pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (knockdown). **B)** Gráfica de viabilidad celular de la sobreexpresión (SE), donde pCDNA3 (Mock), RhoGDI3-3.1 (pCDNA3-RhoGDI3-Flag Clona 1) y RhoGDI3 (pCDNA3-RhoGDI3-Flag Clona 2). N=3

Implicación de la proteína RhoGDI3 en la resistencia a quimioterápicos

Subsecuentemente, decidimos determinar la resistencia a la terapia con los quimioterápicos de elección para PDAC, primeramente Gemcitabine y 5-Fluoracilo, ya que esta línea celular PANC-1, además de haber sido descrita como de estadios avanzados de la enfermedad, es también resistente al tratamiento con Gemcitabina. Nuestros resultados nos demostraron que ni el aumento ni la disminución de la proteína RhoGDI3 ejercen un papel significativo en la sensibilidad (Fig. 46A); no obstante, se observa que al sobreexpresar a la proteína RhoGDI3, la tendencia es a la resistencia para ambas drogas (46B), sobre todo en la clona RhoGDI3-3.1; lo cual sugiere que el aumento de esta molécula podría participar en eventos de resistencia a fármacos.

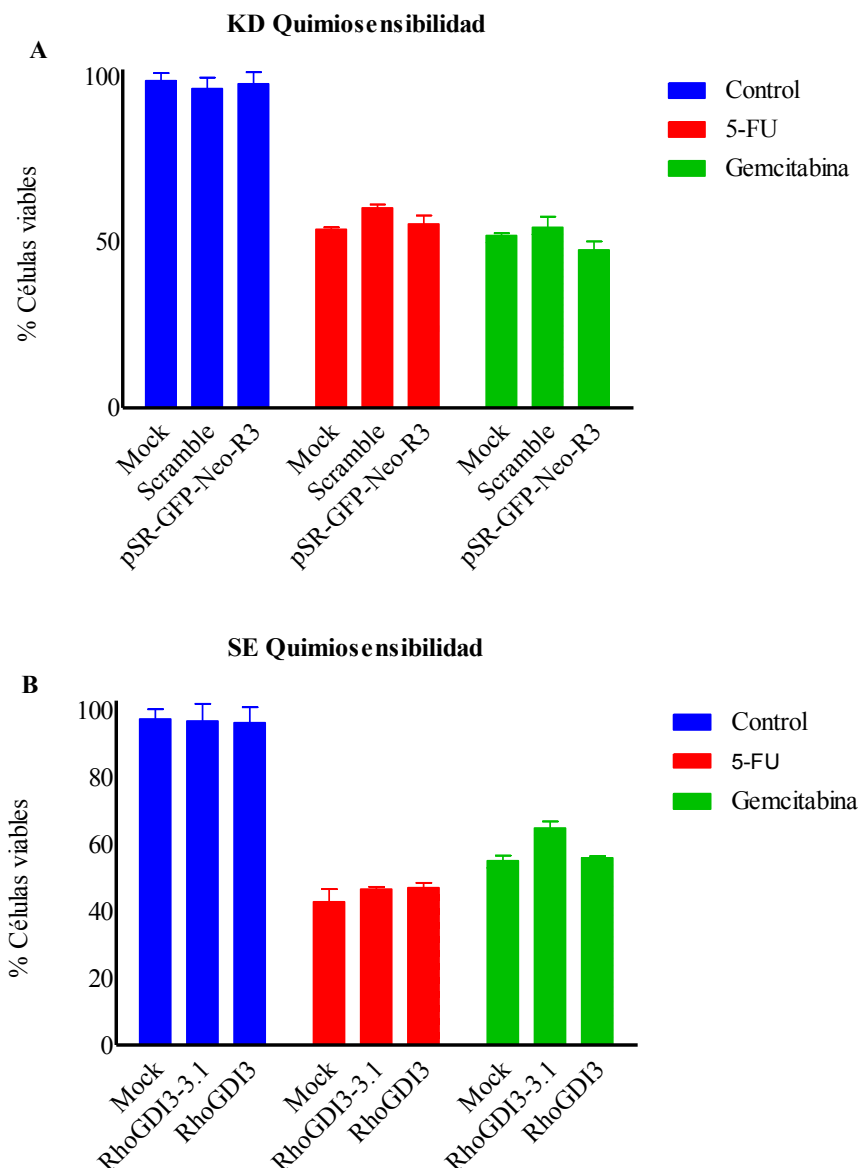


Figura 46. Curva de viabilidad celular (% de células viables) del knockdown y la sobreexpresión de RhoGDI3 en la línea celular PANC-1 post-tratamiento con los quimioterápicos 5-Fluoracilo (5-FU) y Gemcitabina. A) Gráfica de viabilidad celular del knockdown (KD), donde pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (knockdown). **B)** Gráfica de viabilidad celular de la sobreexpresión (SE), donde pCDNA3 (Mock), RhoGDI3-3.1 (pCDNA3-RhoGDI3-Flag Clona 1) y RhoGDI3 (pCDNA3-RhoGDI3-Flag Clona 2). N=3. El tratamiento se llevó a cabo a las 72 horas.

La proteína RhoGDI3 participa en la capacidad de migración celular

La capacidad de migración e invasión son características importantes en las células cancerosas, por lo tanto, para indagar sobre la posible participación de la proteína RhoGDI3 en estos eventos celulares, llevamos a cabo el ensayo de quimiotaxis *in*

in vitro utilizando las clonas de knockdown, Mock, Scramble y pSR-GFP-Neo-R3; así como las clonas de la sobreexpresión, Mock y pCDNA-RhoGDI3 (clonas 1 y 2), las cuales fueron colocadas a una densidad de 50,000 células en la cámara superior de cajas tipo transwell, dejándolas migrar a la cámara inferior durante un período de 48 horas. Posteriormente, las células que migraron fueron detectadas utilizando una densidad óptica de 485 nm. Los resultados demostraron que el número de células migradas de la clona knockdown pSR-GFP-Neo-R3 disminuyó significativamente respecto al control (Fig. 47A), lo cual fue reforzado con los resultados de las clonas de sobreexpresión RhoGDI3-3.1 y RhoGDI3, donde el grado de migración se incrementó de manera significativa (Fig. 47B).

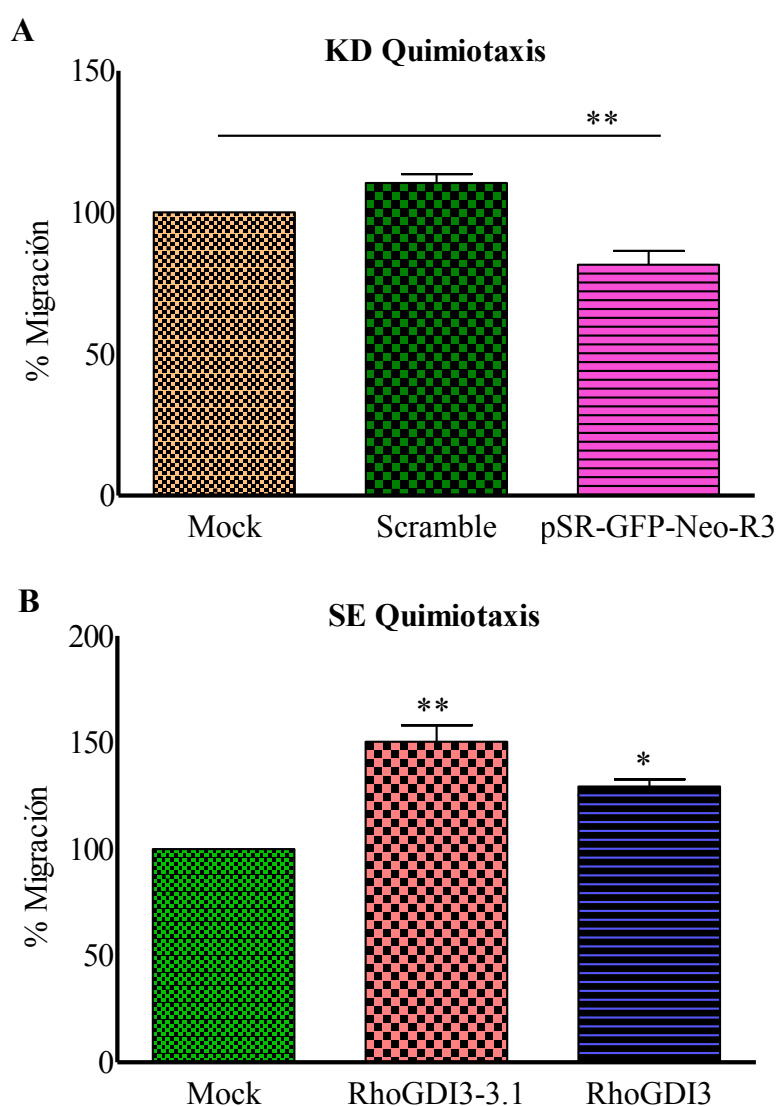
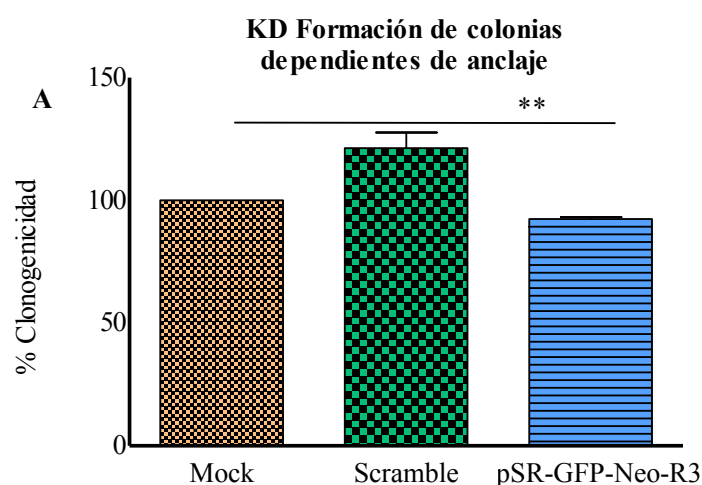


Figura 47. Ensayo de quimiotaxis de las transfectantes de knockdown y sobreexpresión de RhoGDI3 de PANC-1. A) % de migración del knockdown

(KD), donde pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (knockdown). **B)** % de migración de la sobreexpresión (SE), donde pCDNA3 (Mock), RhoGDI3-3.1 (pCDNA3-RhoGDI3-Flag Clona 1) y RhoGDI3 (pCDNA3-RhoGDI3-Flag Clona 2). 50,000 células de cada transfectante fueron previamente ayunadas durante 24 horas, fueron colocadas en las cámaras tipo transwell. N=3. *, P<0.05.

Capacidad de formación de colonias dependientes de anclaje del knockdown y la sobreexpresión de RhoGDI3 en PANC-1

Además de los eventos proliferativos, examinamos el efecto del aumento y disminución de la expresión de la proteína RhoGDI3 de la capacidad clonogénica para formar colonias sobre plástico, observando que la disminución de la expresión de RhoGDI3 tiende a disminuir significativamente la capacidad para formar colonias, lo cual corresponde con la capacidad proliferativa deficiente demostrada en los ensayos de viabilidad celular (Fig. 48A). Este hecho fue corroborado con los resultados obtenidos con la sobreexpresión de RhoGDI3, ya que la capacidad de formar colonias dependientes de anclaje tiende a aumentar respecto al mock, en aproximadamente 20% más (Fig. 48B).



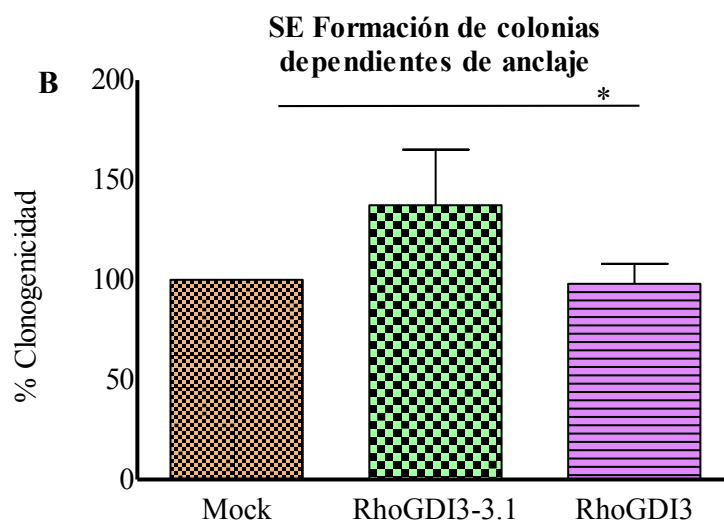


Figura 48. Formación de colonias dependientes de anclaje de las transfectantes de knockdown y sobreexpresión de RhoGDI3. Las células fueron crecidas hasta el día 10 y fueron teñidas con cristal violeta al 0.1% y posteriormente lisadas con SDS al 1%. **A)** % de clonogenicidad del knockdown (KD), donde pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (knockdown). **B)** % de clonogenicidad de la sobreexpresión (SE), donde pCDNA3 (Mock), RhoGDI3-3.1 (pCDNA3-RhoGDI3 Clona 1) y RhoGDI3 (pCDNA3-RhoGDI3 Clona 2). N=3. *, P<0.05.

Capacidad de formación de colonias independientes de anclaje del knockdown y la sobreexpresión de RhoGDI3 en PANC-1

Las células en división, deben estar adheridas a un sustrato sólido; por lo que, cuando estas se resuspenden en un fluido viscoso pierden esta capacidad, o al menos disminuyen su rango de proliferación; no obstante, cuando las células se encuentran transformadas, crecen y adquieren la capacidad de proliferar sin necesitar un sustrato como el plástico o el vidrio. Con base en estos antecedentes, nosotros decidimos indagar sobre la posible implicación de los niveles de RhoGDI3 la transformación *in vitro* utilizando agarosa como sustrato viscoso. Los resultados demostraron que la sobreexpresión disminuye el número de colonias en comparación con el mock (Fig. 50), mientras que el knockdown tiende a aumentarlas (Fig. 49). Estos datos *in vitro* sugieren que la sobreexpresión de la proteína RhoGDI3 es un factor que podría inhibir la transformación maligna *in vivo*.

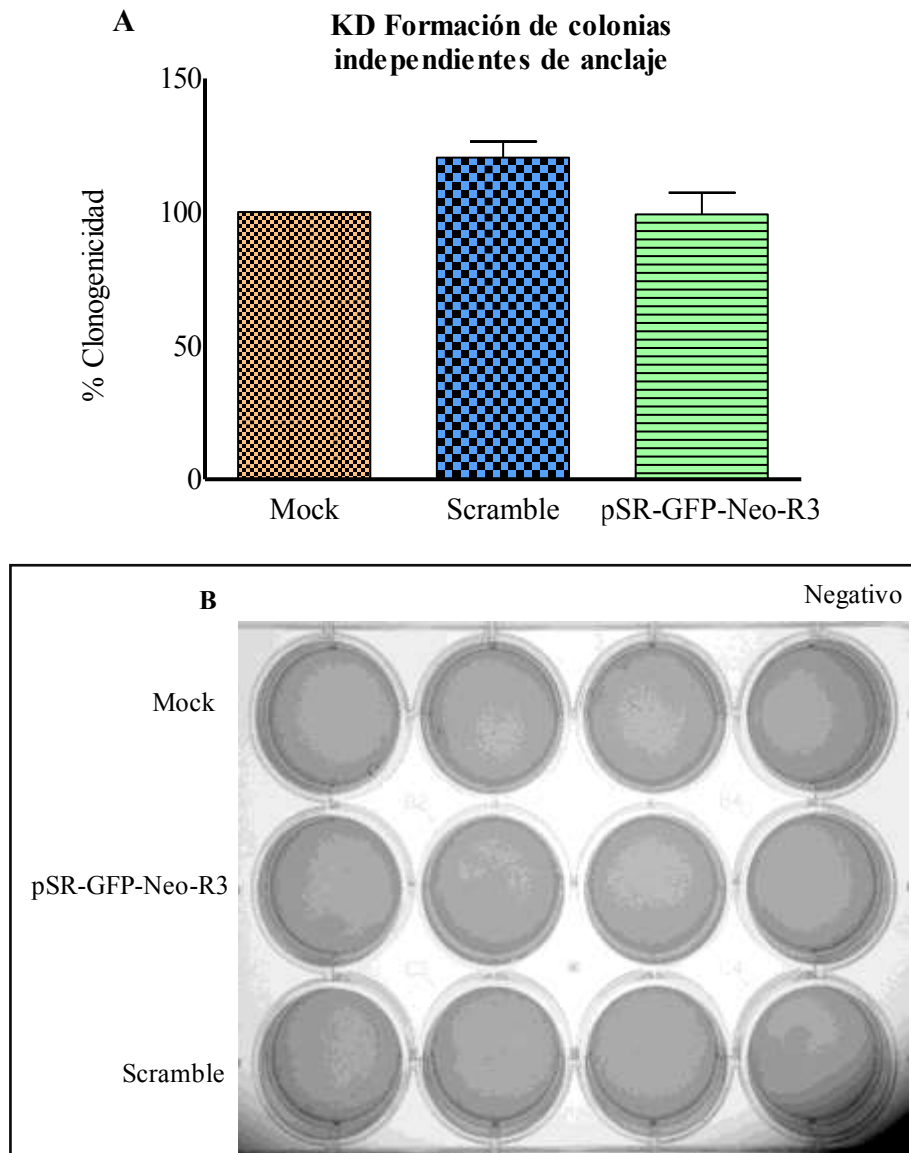


Figura 49. Formación de colonias independientes de anclaje de las transfectantes de knockdown de RhoGDI3. Las células fueron crecidas hasta el día 10 y fueron teñidas con cristal violeta al 0.1% y posteriormente lisadas con SDS al 1%. **A)** % de clonogenicidad del knockdown (KD), donde pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (knockdown). N=3. *, P<0.05. **B)** Fotografía representativa de la placa con las colonias en agar. Fila superior, Mock; fila intermedia, pSR-GFP-Neo-R3 y fila inferior, Scramble.

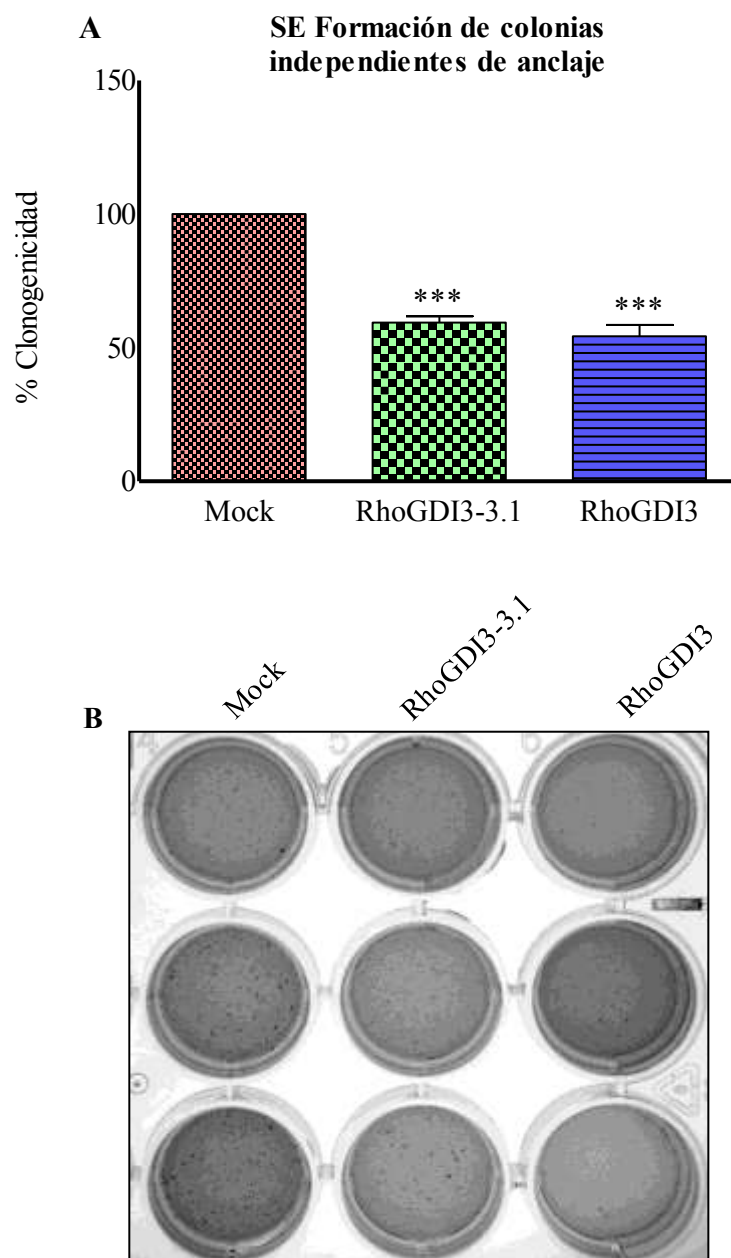


Figura 50. Formación de colonias independientes de anclaje de las transfectantes sobreexpresión de RhoGDI3. Las células fueron crecidas hasta el día 10 y fueron teñidas con cristal violeta al 0.1% y posteriormente lisadas con SDS al 1%. **A)** % de clonogenicidad del knockdown (KD), donde pSR-GFP-Neo (Mock), pSR-GFP-Neo-Ck (Scramble) y pSR-GFP-Neo-R3 (knockdown). N=3. *, P<0.05. **B)** Fotografía representativa de la placa con las colonias en agar. De izquierda a derecha: Columna 1, Mock; columna 2, clona RhoGDI3-3.1 y columna 3, clona RhoGDI3.

17. DISCUSIÓN

En este estudio, reportamos por primera vez los patrones de expresión subcelular y los estados de activación de las proteínas RhoGDI3 así como la expresión de sus GTPasas, RhoG y RhoB, las cuales han sido documentadas como moléculas blanco para este regulador negativo, tanto en líneas celulares como en tejido pancreático humano; además analizamos la posible implicación funcional de la proteína RhoGDI3 en eventos cancerosos, como viabilidad, clonogenicidad, quimiotaxis y resistencia a quimioterápicos. Nuestros hallazgos pueden ser de utilidad para nuevas propuestas de marcadores tumorales y de agresividad en el PDAC.

Canónicamente, las proteínas RhoGDI's ejercen su función en el citosol, donde actúan como chaperonas para solubilizar a las GTPasas Rho, fungiendo como mediadores al monitorear el intercambio de estas entre el citosol y la membrana celular y *vice versa*. Se ha propuesto que las proteínas RhoGDI's podrían tener funciones redundantes; sin embargo, los variables patrones de expresión tanto en tejido como en las líneas celulares han permitido sugerir que no son redundantes; tal y como fue reportado por Towaga y cols., donde los ratones transgénicos *knockout* de la molécula RhoGDI1 se caracterizan por insuficiencia renal e infertilidad [62], mientras que los ratones *knockout* de la molécula RhoGDI2 mostraron una ligera alteración del estado oxidativo de células fagocíticas [63]. Debido a las funciones emergentes de las proteínas RhoGDI's, RhoGDI 1 y RhoGDI2 en diversos tipos de cáncer [69, 71, 76, 137-139] y dada la frecuencia con la que la expresión de estas moléculas son reguladas en cáncer, es comprensible que las proteínas RhoGDI's tengan un papel crucial en el proceso carcinogénico.

De manera similar, los hallazgos de Jian y cols. en cáncer de mama [65], nosotros observamos una marcada reducción en la expresión de la proteína RhoGDI3 en ambas líneas de cáncer pancreático, BxPC3 y PANC-1, lo cual correlaciona con la reducción de la expresión de la molécula RhoGDI3 en tejido de cáncer mamario. Además, nosotros analizamos el patrón de expresión de las GTPasas blanco reportadas, RhoG y RhoB, encontrando una clara reducción de RhoB en las líneas celulares pancreáticas cancerosas mas no en la línea celular control derivada de epitelio normal, lo cual correlaciona con el hecho de que la delección de la molécula

RhoB promueve la formación tumoral [140]. Este hallazgo en líneas celulares fue corroborado con los resultados de inmunohistoquímica, que reportaron una baja o ausente señal de esta proteína RhoB. Contrario a RhoB, la proteína RhoG se observó sobreexpresada solamente en la línea celular PANC-1, la cual fue descrita como una línea celular correspondiente a un estadio avanzado de PDAC; mientras que los niveles de RhoG en BxPC3, una línea celular descrita como un estadio temprano de PDAC, no se observaron diferencias en los niveles de la molécula RhoG comparada con los niveles observados en la línea celular hTERT-HPNE, la línea celular no cancerosa; este resultado es contrastante con lo observado en los tejidos pancreáticos cancerosos, donde el patrón de inmunorreactividad fue bajo o nulo, lo cual nos permite sugerir que las proteínas RhoG y RhoB se encuentran desreguladas en los tejidos cancerosos, al menos pancreático. Como hasta ahora es bien sabido, la mayoría de las GTPasas se han reportado sobreexpresadas en diferentes estirpes celulares [141-144], sin embargo, en tejido pancreático canceroso, nosotros reportamos que hay una ausencia de la inmunorreactividad de la expresión de RhoG; ahora bien, tanto el sistema de línea celular como tisular pueden comportarse de manera divergente.

Las células de PANC-1 son clasificadas como altamente metastásicas, ya que fueron aisladas de un adenocarcinoma en la porción de la cabeza del páncreas, el cual invadió la pared duodenal y generó metástasis en un nódulo linfático [130]. Con el objetivo de metastatizar, es posible especular que una célula deba sobreexpresar moléculas que controlen su movimiento tal como RhoG que pudieran facilitar el desplazamiento celular a otros microambientes. Esta condición correlaciona con el fenotipo celular de la línea BxPC3, células obtenidas de un tumor circunscrito al cuerpo del páncreas en el cual no se encontró evidencia de metástasis [131], y de acuerdo con nuestros resultados, la expresión de RhoG es muy baja en ella. A pesar de los diferentes niveles de expresión de RhoG y de RhoB en las tres líneas celulares, nosotros encontramos similitudes mas no un idéntico estado de activación de estas moléculas, debido a que hemos observado que al minuto 2 después de haber estimulado a las células con rhEGF los niveles de RhoG activado se incrementan, manteniéndose hasta el minuto 10. Estas observaciones son apoyadas con el incremento de activación de la GTPasa Rac-1, la cual se incrementa también en el

minuto 2, debido al hecho de que una vez que la GTPasa RhoG es activada por la proteína GEF en el aparato de Golgi, esta es transportada a la periferia celular y una vez ahí, la GTPasa RhoG activada es capaz de inducir la translocación del complejo ELMODock180 a la membrana celular, dando lugar a la formación de un multicomplejo, el cual puede activar a Rac-1, permitiendo la formación de lamelipodios [135]. Cuando la proteína RhoGDI3 es expresada de manera transitoria en la línea celular MDCK, la activación de RhoG es difícil de observar, sugiriendo la función de inhibición de la liberación del GDP [106]. Nuestros hallazgos revelaron que la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI3 y el incremento de la proteína RhoG en la línea celular PANC-1 pudiera no contrarrestar la incrementada activación de RhoG, sugiriendo que los niveles de la proteína RhoGDI3 no son suficientes para bloquear la activación de RhoG. También se ha demostrado que la proteína RhoGDI1 es un inhibidor de las proteínas GEF, sobrelapando el sitio de unión de las proteínas GDI [145]. Más allá de la rápida activación de RhoG en la línea celular PANC-1 en respuesta al rhEGF en el minuto 2, esto pudo ser ocasionado por la sobreexpresión del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo cual es característico en PANC-1 pero no en la línea celular BxPC3 [146]; aunque si este fuera el caso, debimos haber observado una continua activación de RhoG incluso en el minuto 10, pero fue claro que el sistema se encontraba saturado, disminuyendo así el estado de activación, lo cual refuerza el hecho de la falta de moléculas inhibidoras que mantengan a la GTPasa RhoG en su estado inactivo en el citoplasma, disminuyendo el evento migratorio a través de la activación de Rac-1 dependiente de la activación de RhoG, lo cual podría promover la metástasis.

La molécula RhoB es una de las GTPasas desreguladas en cáncer mamario [65] y en carcinomas invasivos de cabeza y cuello [147]; de acuerdo a ello, nosotros encontramos una disminución de la expresión de la proteína RhoB en la línea celular hTERT-HPNE; así mismo, el patrón de inmunoreactividad fue bajo o nulo tanto en tejidos pancreáticos normales y cancerosos; y debido a su función como molécula supresora de tumores e inhibidora del crecimiento, migración, invasión celular y mantenimiento de la morfología mesenquimatosa, funcionando como un modificador negativo en cáncer, es evidente que la reducción de los niveles de expresión pudieran favorecer la progresión del cáncer [148] [149]. La localización subcelular de RhoB

en las células no cancerosas de hTERT-HPNE diverge de las otras dos líneas cancerosas pancreáticas. En las células hTERT-HPNE se observó una distribución mayormente homogénea; lo cual es probablemente debido a la coexistencia de las dos formas modificadas de la molécula RhoB: RhoB geranilgeranilada (RhoB-GG) y farnesilada (RhoB-F) [150], localizadas en los endosomas tardíos y cercanas a la membrana celular. La GTPasa RhoB es una proteína inestable, la cual es rápida y transitoriamente inducida por una amplia variedad de estímulos, tales como el EGF [151]. Nuestros hallazgos revelaron una activación de la GTPasa RhoB en el minuto 0 y 2 en las líneas celulares hTERT-HPNE y PANC-1 mas no en BxPC3, coincidiendo con la presencia de RhoB en la periferia celular, donde esta controla el reciclamiento del EGFR (receptor del factor del crecimiento epidérmico) [152], la importancia de la modificación postraduccional RhoB-GG hace más eficiente los eventos de reciclamiento hacia la membrana plasmática [150]. Al minuto 10, observamos una redistribución de la protein RhoB a lo largo del citoplasma rodeando los núcleos, donde esta misma observación ha permitido proponer que la molécula Akt muestra una acumulación incrementada [136]. Un hallazgo importante sobre la activación de RhoB en la línea celular PANC-1, podría reflejar un proceso celular diferente que ocurre en las células cancerosas con fenotipo más agresivo, PANC-1 metastásicas, en las cuales RhoB afecta la vía requerida por Rac-1 para la formación y estabilización de prolongaciones como lamelipodios [153]; por lo tanto, RhoB podría modular el alto grado de migración en respuesta al tratamiento con rhEGF; sin embargo, más investigación es requerida para elucidar este mecanismo, donde las células presentan una aparente pérdida de la expresión de RhoB siendo esta inducida por estímulos específicos, activando vías de señalización involucradas en la progresión tumoral.

El grupo de Nakata y cols., reportaron dos mutaciones puntuales en la proteína RhoGDI2, en líneas celulares de linfoma de células B, V68L y V69L, donde a través de modelos de predicción de estructura secundaria, se observó que ambas mutaciones podrían influenciar la región beta plegada de la proteína RhoGDI2; lo cual fue comprobado por la ineficiencia para inhibir la liberación del GDP en donde la sobreexpresión de las proteínas RhoGDI2 con ambas mutaciones aceleraron el proceso de invasión de las células cancerosas [81]. Nuestros hallazgos nos

permitieron encontrar una mutación puntual en los residuos V93A en la línea celular BxPC3 y V40A, en la línea celular PANC-1, ambos residuos pertenecientes al mismo grupo aminoacídico; lo cual nos podría permitir discutir el comportamiento diferente de las líneas celulares cancerosas pancreáticas, ya que como hemos analizado, cada una de ellas es muy divergente desde su fenotipo hasta su comportamiento funcional respecto a las GTPasas, RhoG y RhoB; no obstante, es necesario corroborar este dato con una nueva secuenciación.

El grupo de Adra y cols. reportaron una secuencia de localización nuclear no canónica (non-NLS) en la proteína RhoGDI3, proponiendo que esta molécula podría ser dirigida hacia el núcleo a través de una vía pasiva [99]. Nosotros reportamos por primera vez la presencia de la proteína completa RhoGDI3 en los núcleos de la línea celular hTERT-HPNE y en tejido humano pancreático sano; este hallazgo es apoyado por el hecho de que una vez que la molécula RhoGDI2 ha sido cortada por la caspasa 3, es relocalizada al núcleo, durante el evento [154]. Con base en estas evidencias, nosotros observamos una localización de RhoGDI3 en los núcleos de la línea celular hTERT-HPNE. Lu y cols. mediante la metodología de RNA de interferencia demostraron que la disminución de la expresión de la proteína RhoGDI3 en células neuronales indujo cambios en la morfología celular, lo cual fue consistente con la baja expresión de genes como RhoA, Cdc42, Limk2 y N-WASP, las cuales son moléculas que impactan en la reorganización del citoesqueleto de actina [105]. Por lo tanto, este descubrimiento podría estar relacionado con la homeostasis en células normales, no así en las cancerosas, al menos en células pancreáticas; sin embargo, es necesario indagar en cuál podría ser la participación de la proteína RhoGDI3 en el núcleo en células normales pancreáticas.

No podemos dejar de lado que la GTPasa RhoG fue localizada en el núcleo de las tres líneas celulares, por lo que investigamos si la GTPasa RhoG contaba con un secuencia NLS que pudiera explicar su localización nuclear; así que utilizando el algoritmo computacional cNLS [155] dos secuencias monopartitas fueron predecidas, en los residuos 179 y 182 con un puntaje de 2 y 2.5 respectivamente, ambas en el extremo amino terminal. Hasta hoy, no existe evidencia de que la proteína RhoG sea nuclear; sin embargo, es posible que RhoG sea traslocada al núcleo después de un estado de ayuno, donde probablemente podría jugar un papel en la regulación de

distintos factores de transcripción. Recientemente fue documentado que la GTPasa RhoG promueve la activación transcripcional de Stat3 en fibroblastos murinos y en células humanas de manera similar a lo reportado para la GTPasa [156] y otras GTPasas [157], partiendo de ello, nuestros hallazgos de una proteína RhoG nuclear, podría abrir la posibilidad de entender nuevas funciones alternativas de esta proteínas que pudieran contribuir en el proceso carcinogénico.

Debido a que el proceso carcinogénico es un proceso multifactorial donde las células, mediante múltiples vías de señalización[31], desencadenan eventos celulares como crecimiento celular, invasión, metástasis y resistencia a quimioterápicos; decidimos que, además de la descripción de nuestro sistema normal y canceroso pancreáticos, examinar los efectos de la sobreexpresión y el *knockdown* de la proteína RhoGDI3 en la línea celular pancreática con el fenotipo agresivo, es decir, PANC-1, en estos eventos celulares. La sobreexpresión de la proteína RhoGDI3 tiende a incrementar la capacidad de migración celular, contrario a lo observado en el *knockdown*. Esto hecho es discutible desde el punto de vista de localización subcelular en las transfectantes, ya que al haber un aumento de la proteína RhoGDI3 en el sistema, hay una evidente formación de protrusiones celulares que denotan un enriquecimiento de la proteína en ellas; por lo que es posible especular que el aumento de proteína RhoGDI3 podría estar translocando mayor GTPasa RhoG a la membrana, la cual activa a la GTPasa Rac-1, estimulando la formación de protrusiones celulares como filopodios y lamelipodios; indispensables para la migración celular. El grupo de Wang y cols. demostró que la sobreexpresión tienden a disminuir la expresión del mRNA de Rac-1, implicada en procesos migratorios [158]; sin embargo, este hecho no fue corroborado a nivel de proteína.

De esta manera, fue posible observar que la tasa de proliferación celular no fue significativa en las transfectantes; sin embargo, la tendencia de la proliferación es baja en el *knockdown*, este hecho es equiparable y permite discutir lo encontrado en los eventos de formación dependientes de anclaje, donde la formación de colonias sobre plástico también se vió decrementada, ya que se ha reportado que para la división celular, es necesaria la adhesión a un sustrato [159, 160]. Contrario a esto, la sobreexpresión de RhoGDI3 permitió una mayor formación de colonias. Por lo tanto,

es probable que la proteína RhoGDI3 participe en eventos celulares de migración y metástasis *in vivo*, mediante la activación de GTPasas como RhoG y RhoB, las cuales son piezas clave para la estabilización de prolongaciones celulares, como filopodios y lamelipodios.

Cuando las células adquieren un fenotipo maligno, estas son capaces de crecer y aislarse en un medio viscoso [161, 162]; y como se ha descrito, la línea celular-PANC-1 cumple con esta característica, por lo que era esperado que la sobreexpresión de la proteína RhoGDI3 diera un fenotipo más agresivo; encontrando que la capacidad de formación de colonias independientes de anclaje disminuyera, lo cual podría explicarse con el hecho de que las células al tener mayores niveles de la proteína RhoGDI3, son capaces de adaptarse a nuevos microambientes; sin embargo, dejan rápidamente a este para migrar hacia otros sitios, sugiriendo que RhoGDI3 mantiene el fenotipo agresivo, al menos en PANC-1. Este hecho fue corroborado con los datos en una dimensión; además que en los ensayos en tres dimensiones es posible tener un acercamiento más firme a la transformación y mantenimiento del fenotipo maligno celular, además de ser un buen predictor de actividad *in vivo*.

Los tejidos con PDAC moderadamente diferenciados nos han mostrado la pérdida de la expresión de la proteína RhoGDI3; sin embargo, al sobreexpresarla, las células adquieren mayor capacidad de migración; este evento molecular nos permite proponer que una célula tiene mecanismos de degradación de moléculas que podrían conferir un fenotipo mucho más agresivo; por lo tanto, es posible que esto suceda en el tejido pancreático canceroso como un mecanismo de regulación intracelular, disminuyendo así su fenotipo maligno.

18. CONCLUSIONES

- La proteína RhoGDI3 es una molécula de localización nuclear y citosólica en células normales de páncreas humano.
- La GTPasa RhoG es una proteína de localización nuclear y citosólica en las líneas celulares normal y cancerosas pancreáticas.
- La expresión de la proteína RhoGDI3 se abate en tejidos cancerosos, mientras que en células normales pancreáticas está presente.
- Los niveles de las GTPasas RhoB y RhoG están abatidos en tejido sano pancreáticos y con PDAC humano.
- El incremento en los niveles de la proteína RhoGDI3 promueve un comportamiento más invasivo en una línea celular metastásica de PDAC.

Por lo tanto, nuestros hallazgos nos permiten proponer a estas tres proteínas como posibles marcadores de agresividad en el PDAC.

19. PERSPECTIVAS

Hasta ahora, es posible sugerir a las moléculas analizadas en este trabajo como posibles biomarcadores de progresión tumoral; sin embargo, es necesario indagar en un plano horizontal, analizando en el cómo es que esta molécula RhoGDI3 estaría impactando en vías de señalización y por supuesto, el efecto en la formación de tumores; por lo que los futuros objetivos para responder estas incógnitas son los siguientes:

- Analizar el efecto del *knockdown* y la sobreexpresión de RhoGDI3 en la expresión de diversos genes, a través de ensayos de seqRNA.
- Evaluar la capacidad tumorigénica de las transfectantes de *knockdown* y sobreexpresión en ratones desnudos nu/nu.
- Determinar el patrón de modificaciones postraduccionales de la proteína RhoGDI3 en la línea celular normal pancreática hTERT-HPNE, mediante la purificación de la proteína endógena.
- Elucidar las posibles funciones nucleares de la proteína RhoGDI3, tanto de líneas celulares pancreáticas como en tejido pancreático sano.
- Conocer las moléculas que interaccionan con la proteína RhoGDI3 en células normales y cancerosas pancreáticas humanas, mediante espectrometría de masas.

20. REFERENCIAS

1. Gray, H., et al., *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. 39th ed. 2005, Edinburgh ; New York: Elsevier Churchill Livingstone. xx, 1627 p.
2. Kumar, V., et al., *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. xv, 1525 p.
3. Bardeesy, N. and R.A. DePinho, *Pancreatic cancer biology and genetics*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(12): p. 897-909.
4. Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, *Color atlas of histology*. 5th ed. 2009, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins. xv, 459 p.
5. Lowy, A.M., S.D. Leach, and P.A. Philip, *Pancreatic cancer*. M.D. Anderson solid tumor oncology series. 2008, New York ; London: Springer. xviii, 744 p.
6. Heiken, J.P., *Pancreatic cancer*. Contemporary issues in cancer imaging. 2009, Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press. xii, 196 p.
7. Geneser, F., *Color atlas of histology*. 1st ed. 1985, Copenhagen Philadelphia: Munksgaard ; Lea & Febiger. 231 p.
8. Berne, R.M., et al., *Berne & Levy physiology*. 6th ed. 2008, Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier. xii, 834 p.
9. Guyton, A.C., *Anatomy and physiology*. 1985, Philadelphia: Saunders College Pub. xiii, 869 p.
10. Hidalgo, M., *Pancreatic cancer*. N Engl J Med. **362**(17): p. 1605-17.
11. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(6): p. 457-80.
12. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
13. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer. **127**(12): p. 2893-917.
14. Anderson, K.E., et al., *Pancreatic cancer risk: Associations with meat-derived carcinogen intake in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO) cohort*. Molecular Carcinogenesis, 2012. **51**(1): p. 128-137.
15. Tempero, M.A., et al., *Pancreatic adenocarcinoma*. J Natl Compr Canc Netw. **8**(9): p. 972-1017.
16. Prokopczyk, B., et al., *Identification of tobacco-derived compounds in human pancreatic juice*. Chem Res Toxicol, 2002. **15**(5): p. 677-85.
17. Patel, A.V., et al., *Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(2): p. 459-66.
18. Pannala, R., et al., *Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus*. Gastroenterology, 2008. **134**(4): p. 981-7.
19. Giovannucci, E., et al., *Diabetes and cancer: a consensus report*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1674-85.
20. Batty, G.D., et al., *Diabetes status and post-load plasma glucose concentration in relation to site-specific cancer mortality: findings from the original Whitehall study*. Cancer Causes Control, 2004. **15**(9): p. 873-81.
21. Steer, M.L., I. Waxman, and S. Freedman, *Chronic pancreatitis*. N Engl J Med, 1995. **332**(22): p. 1482-90.
22. Gartner, S., et al., *Nutrition in Pancreatic Cancer: A Review*. Gastrointest Tumors, 2016. **2**(4): p. 195-202.
23. de Braud, F., S. Cascinu, and G. Gatta, *Cancer of pancreas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(2): p. 147-55.
24. Corbo, V., G. Tortora, and A. Scarpa, *Molecular pathology of pancreatic cancer: from bench-to-bedside translation*. Curr Drug Targets. **13**(6): p. 744-52.

25. Vincent, A., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet. **378**(9791): p. 607-20.
26. Lillemoe, K.D., *Current management of pancreatic carcinoma*. Ann Surg, 1995. **221**(2): p. 133-48.
27. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol. **17**(6): p. 1471-4.
28. John, T.G., et al., *Carcinoma of the pancreatic head and periampullary region. Tumor staging with laparoscopy and laparoscopic ultrasonography*. Ann Surg, 1995. **221**(2): p. 156-64.
29. Dalton, R.R., et al., *Carcinoma of the body and tail of the pancreas: is curative resection justified?* Surgery, 1992. **111**(5): p. 489-94.
30. Brennan, M.F., R.D. Moccia, and D. Klimstra, *Management of adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas*. Ann Surg, 1996. **223**(5): p. 506-11; discussion 511-2.
31. Zhang, Q., et al., *Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management*. Gastroenterol Res Pract, 2016. **2016**: p. 8962321.
32. Soares, K.C., et al., *Vaccines for pancreatic cancer*. Cancer J, 2012. **18**(6): p. 642-52.
33. Yue, W., et al., *Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2*. Oncotarget, 2015. **6**(25): p. 21208-24.
34. Chai, X., et al., *Metformin Increases Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Reducing CD133+ Cell Populations and Suppressing ERK/P70S6K Signaling*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14404.
35. Lillemoe, K.D. and S.A. Barnes, *Surgical palliation of unresectable pancreatic carcinoma*. Surg Clin North Am, 1995. **75**(5): p. 953-68.
36. Jemal, A., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(23): p. 1672-94.
37. Jones, S., et al., *Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1801-6.
38. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 153-208.
39. Wittinghofer, A., K. Scheffzek, and M.R. Ahmadian, *The interaction of Ras with GTPase-activating proteins*. FEBS Lett, 1997. **410**(1): p. 63-7.
40. Baccarini, M., *Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase"*. FEBS Lett, 2005. **579**(15): p. 3271-7.
41. Mihaljevic, A.L., et al., *Molecular mechanism of pancreatic cancer--understanding proliferation, invasion, and metastasis*. Langenbecks Arch Surg, 2010. **395**(4): p. 295-308.
42. Chien, Y. and M.A. White, *RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival*. EMBO Rep, 2003. **4**(8): p. 800-6.
43. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
44. Massague, J., *A very private TGF-beta receptor embrace*. Mol Cell, 2008. **29**(2): p. 149-50.
45. Hezel, A.F., et al., *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1218-49.
46. Maitra, A., et al., *Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(16 Pt 1): p. 5988-95.
47. Maitra, A., et al., *Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray*. Mod Pathol, 2003. **16**(9): p. 902-12.
48. Kurahara, H., et al., *Impact of p53 and PDGFR-beta Expression on Metastasis and Prognosis of Patients with Pancreatic Cancer*. World J Surg, 2016. **40**(8): p. 1977-84.

49. Morton, J.P., et al., *Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 246-51.
50. Rozenblum, E., et al., *Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma*. Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1731-4.
51. Rocha, S., K.J. Campbell, and N.D. Perkins, *p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 15-25.
52. Bardeesy, N., et al., *Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5947-52.
53. Klieser, E., et al., *Differential role of Hedgehog signaling in human pancreatic (patho-) physiology: An up to date review*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2016. **7**(2): p. 199-210.
54. Xu, X., et al., *Sonic Hedgehog-GLI Family Zinc Finger 1 Signaling Pathway Promotes the Growth and Migration of Pancreatic Cancer Cells by Regulating the Transcription of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A2*. Pancreas, 2015. **44**(8): p. 1252-8.
55. Feldmann, G., et al., *Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer*. Gut, 2008. **57**(10): p. 1420-30.
56. Xiao, Y.F., et al., *Notch and Wnt signaling pathway in cancer: Crucial role and potential therapeutic targets (Review)*. Int J Oncol, 2016. **48**(2): p. 437-49.
57. Sundaram, M.V., *The love-hate relationship between Ras and Notch*. Genes Dev, 2005. **19**(16): p. 1825-39.
58. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
59. Esposito, I., et al., *Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer*. J Clin Pathol, 2007. **60**(8): p. 885-95.
60. Elnemr, A., et al., *Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway*. Int J Oncol, 2001. **18**(2): p. 311-6.
61. Hinz, S., et al., *Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis*. Oncogene, 2000. **19**(48): p. 5477-86.
62. Togawa, A., et al., *Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDIalpha*. Oncogene, 1999. **18**(39): p. 5373-80.
63. Guillemot, J.C., et al., *Targeted disruption of guanosine diphosphate-dissociation inhibitor for Rho-related proteins, GDID4: normal hematopoietic differentiation but subtle defect in superoxide production by macrophages derived from in vitro embryonal stem cell differentiation*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2722-31.
64. Fritz, G., et al., *Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters*. Br J Cancer, 2002. **87**(6): p. 635-44.
65. Jiang, W.G., et al., *Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6432-40.
66. Zhang, B., *Rho GDP dissociation inhibitors as potential targets for anticancer treatment*. Drug Resist Updat, 2006. **9**(3): p. 134-41.
67. Zhang, B., et al., *Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6054-62.
68. Li, Z., et al., *TrkBTL1 induces liver metastasis of pancreatic cancer cells by sequestering Rho GDP dissociation inhibitor and promoting RhoA activation*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7851-9.

69. Reimer, J., et al., *Reduced expression of Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor-alpha modulates the cytotoxic effect of busulfan in HEK293 cells*. *Anticancer Drugs*, 2007. **18**(3): p. 333-40.
70. Scherle, P., T. Behrens, and L.M. Staudt, *Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(16): p. 7568-72.
71. Gildea, J.J., et al., *RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6418-23.
72. Ota, T., et al., *LyGDI functions in cancer metastasis by anchoring Rho proteins to the cell membrane*. *Mol Carcinog*, 2004. **39**(4): p. 206-20.
73. Theodorescu, D., et al., *Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(11): p. 3800-6.
74. Danley, D.E., T.H. Chuang, and G.M. Bokoch, *Defective Rho GTPase regulation by IL-1 beta-converting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor*. *J Immunol*, 1996. **157**(2): p. 500-3.
75. Ota, T., et al., *RhoGDIbeta lacking the N-terminal regulatory domain suppresses metastasis by promoting anoikis in v-src-transformed cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2006. **23**(7-8): p. 323-34.
76. Zhang, Y. and B. Zhang, *D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness*. *Cancer Res*, 2006. **66**(11): p. 5592-8.
77. Hu, L.D., et al., *Biphasic expression of RhoGDI2 in the progression of breast cancer and its negative relation with lymph node metastasis*. *Oncol Rep*, 2007. **17**(6): p. 1383-9.
78. Schunke, D., et al., *Cyclooxygenase-2 is a target gene of rho GDP dissociation inhibitor beta in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(22): p. 10694-702.
79. Ma, L., et al., *Loss of expression of LyGDI (ARHGDI B), a rho GDP-dissociation inhibitor, in Hodgkin lymphoma*. *Br J Haematol*, 2007. **139**(2): p. 217-23.
80. Wu, Y., et al., *Neuromedin U is regulated by the metastasis suppressor RhoGDI2 and is a novel promoter of tumor formation, lung metastasis and cancer cachexia*. *Oncogene*, 2007. **26**(5): p. 765-73.
81. Nakata, Y., et al., *Mutated D4-guanine diphosphate-dissociation inhibitor is found in human leukemic cells and promotes leukemic cell invasion*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(1): p. 37-50.
82. Cho, H.J., et al., *RhoGDI2 expression is associated with tumor growth and malignant progression of gastric cancer*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(8): p. 2612-9.
83. Moissoglu, K., et al., *Rho GDP dissociation inhibitor 2 suppresses metastasis via unconventional regulation of RhoGTPases*. *Cancer Res*, 2009. **69**(7): p. 2838-44.
84. Wu, Y., et al., *Src phosphorylation of RhoGDI2 regulates its metastasis suppressor function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(14): p. 5807-12.
85. Zhang, Y., et al., *Silencing of D4-GDI inhibits growth and invasive behavior in MDA-MB-231 cells by activation of Rac-dependent p38 and JNK signaling*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(19): p. 12956-65.
86. Niu, H., et al., *Expression profile of RhoGDI2 in lung cancers and role of RhoGDI2 in lung cancer metastasis*. *Oncol Rep*, 2010. **24**(2): p. 465-71.
87. Stevens, E.V., et al., *RhoGDI2 antagonizes ovarian carcinoma growth, invasion and metastasis*. *Small GTPases*, 2011. **2**(4): p. 202-210.
88. Rivera Rosado, L.A., J. Rodriguez-Canales, and B. Zhang, *Association of D4-GDI expression with breast cancer progression*. *Cancer Biomark*, 2011. **10**(3-4): p. 163-73.
89. Agarwal, N.K., et al., *Rictor regulates cell migration by suppressing RhoGDI2*. *Oncogene*, 2013. **32**(20): p. 2521-6.
90. Li, X., et al., *Overexpression of RhoGDI2 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2012. **19**(1): p. 145-53.

91. Fujita, A., et al., *Clinical significance of Rho GDP dissociation inhibitor 2 in colorectal carcinoma*. Int J Clin Oncol, 2012. **17**(2): p. 137-42.
92. Said, N., et al., *RhoGDI2 suppresses lung metastasis in mice by reducing tumor versican expression and macrophage infiltration*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1503-18.
93. Zheng, Z., et al., *RhoGDI2 confers resistance to 5-fluorouracil in human gastric cancer cells*. Oncol Lett. **5**(1): p. 255-260.
94. Goto, T., et al., *Gene expression profiles with cDNA microarray reveal RhoGDI as a predictive marker for paclitaxel resistance in ovarian cancers*. Oncol Rep, 2006. **15**(5): p. 1265-71.
95. Jones, M.B., et al., *Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer*. Proteomics, 2002. **2**(1): p. 76-84.
96. Koide, N., et al., *Establishment of perineural invasion models and analysis of gene expression revealed an invariant chain (CD74) as a possible molecule involved in perineural invasion in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2419-26.
97. Abiatari, I., et al., *Consensus transcriptome signature of perineural invasion in pancreatic carcinoma*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(6): p. 1494-504.
98. Zalcmán, G., et al., *RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30366-74.
99. Adra, C.N., et al., *RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4279-84.
100. Adra, C.N., et al., *Human ARHGDI3, a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins: genomic structure, sequence, expression analysis, and mapping to chromosome 16p13.3*. Genomics, 1998. **53**(1): p. 104-9.
101. Brunet, N., A. Morin, and B. Olofsson, *RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 342-57.
102. Dransart, E., et al., *RhoGDI-3, a promising system to investigate the regulatory function of rhoGDIs: uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rhoGDIs*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 4): p. 623-6.
103. Dransart, E., et al., *Uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rho GDP dissociation inhibitors*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4674-83.
104. Ferland, R.J., et al., *Characterization of Rho-GDIgamma and Rho-GDIalpha mRNA in the developing and mature brain with an analysis of mice with targeted deletions of Rho-GDIgamma*. Brain Res, 2005. **1054**(1): p. 9-21.
105. Lu, W., J. Wang, and T. Wen, *Downregulation of Rho-GDI gamma promotes differentiation of neural stem cells*. Mol Cell Biochem, 2008. **311**(1-2): p. 233-40.
106. Morin, A., et al., *RhoGDI3 and RhoG: Vesicular trafficking and interactions with the Sec3 Exocyst subunit*. Small GTPases. **1**(3): p. 142-156.
107. Ohga, N., et al., *Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **163**(3): p. 1523-33.
108. Sasaki, T., et al., *Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(4): p. 2333-7.
109. Takai, S., et al., *Mapping of the human C3G gene coding a guanine nucleotide releasing protein for Ras family to 9q34.3 by fluorescence in situ hybridization*. Hum Genet, 1994. **94**(5): p. 549-50.
110. Regazzi, R., et al., *The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 17512-9.

111. Sasaki, T. and Y. Takai, *The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **245**(3): p. 641-5.
112. Lelias, J.M., et al., *cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1479-83.
113. Olofsson, B., *Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling*. Cell Signal, 1999. **11**(8): p. 545-54.
114. Dransart, E., B. Olofsson, and J. Cherfils, *RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation*. Traffic, 2005. **6**(11): p. 957-66.
115. Paduch, M., F. Jelen, and J. Otlewski, *Structure of small G proteins and their regulators*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 829-50.
116. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, *GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(7): p. 356-63.
117. Keep, N.H., et al., *A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm*. Structure, 1997. **5**(5): p. 623-33.
118. Liu, J., et al., *E3 ligase activity of XIAP RING domain is required for XIAP-mediated cancer cell migration, but not for its RhoGDI binding activity*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35682.
119. Yu, J., et al., *RhoGDI SUMOylation at Lys-138 increases its binding activity to Rho GTPase and its inhibiting cancer cell motility*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 13752-60.
120. Cao, Z., et al., *SUMOylation of RhoGDIalpha is required for its repression of cyclin D1 expression and anchorage-independent growth of cancer cells*. Mol Oncol, 2014. **8**(2): p. 285-96.
121. Takahashi, K., et al., *Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl*. Oncogene, 1998. **16**(25): p. 3279-84.
122. Yamashita, T. and M. Tohyama, *The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI*. Nat Neurosci, 2003. **6**(5): p. 461-7.
123. Ohira, K., et al., *A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1*. J Neurosci, 2005. **25**(6): p. 1343-53.
124. Bourmeyster, N., et al., *Copurification of rho protein and the rho-GDP dissociation inhibitor from bovine neutrophil cytosol. Effect of phosphoinositides on rho ADP-ribosylation by the C3 exoenzyme of Clostridium botulinum*. Biochemistry, 1992. **31**(51): p. 12863-9.
125. Chuang, T.H., B.P. Bohl, and G.M. Bokoch, *Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26206-11.
126. Ellerbroek, S.M., K. Wennerberg, and K. Burridge, *Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19023-31.
127. DerMardirossian, C., A. Schnelzer, and G.M. Bokoch, *Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase*. Mol Cell, 2004. **15**(1): p. 117-27.
128. DerMardirossian, C., et al., *Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(11): p. 4760-8.
129. Griner, E.M., et al., *PKCalpha phosphorylation of RhoGDI2 at Ser31 disrupts interactions with Rac1 and decreases GDI activity*. Oncogene, 2013. **32**(8): p. 1010-7.
130. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. Int J Cancer, 1975. **15**(5): p. 741-7.
131. Tan, M.H., et al., *Characterization of a new primary human pancreatic tumor line*. Cancer Invest, 1986. **4**(1): p. 15-23.
132. Samson, T., et al., *Endogenous RhoG is rapidly activated after epidermal growth factor stimulation through multiple guanine-nucleotide exchange factors*. Mol Biol Cell. **21**(9): p. 1629-42.

133. Paulo, J.A., et al., *Subcellular fractionation enhances proteome coverage of pancreatic duct cells*. *Biochim Biophys Acta*. **1834**(4): p. 791-7.
134. Tsujie, M., et al., *Human equilibrative nucleoside transporter 1, as a predictor of 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(4B): p. 2241-9.
135. Katoh, H. and M. Negishi, *RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo*. *Nature*, 2003. **424**(6947): p. 461-4.
136. Adini, I., et al., *RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development*. *Genes Dev*, 2003. **17**(21): p. 2721-32.
137. Yi, B., et al., *Depletion of RhoGDI2 expression inhibits the ability of invasion and migration in pancreatic carcinoma*. *Int J Mol Med*. **34**(1): p. 205-12.
138. Li, W., et al., *Loss of RhoGDI is a novel independent prognostic factor in hepatocellular carcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol*. **6**(11): p. 2535-41.
139. Yu, J., et al., *RhoGDI SUMOylation at Lys-138 increases its binding activity to Rho GTPase and its inhibiting cancer cell motility*. *J Biol Chem*. **287**(17): p. 13752-60.
140. Liu, A.X., et al., *RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(20): p. 6906-12.
141. Sahai, E. and C.J. Marshall, *RHO-GTPases and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(2): p. 133-42.
142. Fritz, G., I. Just, and B. Kaina, *Rho GTPases are over-expressed in human tumors*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 682-7.
143. Wang, L., et al., *A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44617-25.
144. Vega, F.M. and A.J. Ridley, *Rho GTPases in cancer cell biology*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(14): p. 2093-101.
145. Scheffzek, K., et al., *The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(2): p. 122-6.
146. Ali, S., et al., *Simultaneous targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways for pancreatic cancer therapy*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(12): p. 1943-51.
147. Adnane, J., et al., *Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(7): p. 2225-32.
148. Bousquet, E., et al., *RhoB loss induces Rac1-dependent mesenchymal cell invasion in lung cells through PP2A inhibition*. *Oncogene*.
149. Wang, S., et al., *Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line*. *Oncogene*, 2003. **22**(40): p. 6204-13.
150. Wherlock, M., et al., *Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 15): p. 3221-31.
151. Jahner, D. and T. Hunter, *The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(7): p. 3682-90.
152. Gampel, A., P.J. Parker, and H. Mellor, *Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB*. *Curr Biol*, 1999. **9**(17): p. 955-8.
153. Vega, F.M., et al., *RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics*. *Open Biol*. **2**(5): p. 120076.
154. Krieser, R.J. and A. Eastman, *Cleavage and nuclear translocation of the caspase 3 substrate Rho GDP-dissociation inhibitor, D4-GDI, during apoptosis*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(5): p. 412-9.
155. Kosugi, S., et al., *Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(1): p. 478-85.
156. Aznar, S., et al., *Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of STAT3 transcription factor is involved in Rho A GTPase oncogenic transformation*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(10): p. 3282-94.

157. Benitah, S.A., et al., *Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1705**(2): p. 121-32.
158. Wang, J., et al., *Overexpression of Rho-GDP-dissociation inhibitor-gamma inhibits migration of neural stem cells*. *J Neurosci Res*, 2013. **91**(11): p. 1394-401.
159. Akca, H., et al., *Erratum to "Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells" [Lung Cancer 73 (3) (2011) 302-309]*. *Lung Cancer*, 2016.
160. Wu, F., et al., *SATB2 expression increased anchorage-independent growth and cell migration in human bronchial epithelial cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016. **293**: p. 30-6.
161. Crowley, L.C. and N.J. Waterhouse, *Measuring Survival of Hematopoietic Cancer Cells with the Colony-Forming Assay in Soft Agar*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016. **2016**(8): p. pdb prot087189.
162. Kakuguchi, W., et al., *HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(4): p. 520-8.

21. ANEXO

Artículo enviados

PONE-D-16-27454

Immunological and Functional Characterization of RhoGDI3 and its Molecular Targets RhoG and RhoB in human Pancreatic Cancerous and Normal cells.

DR Miguel Vargas

Dear PhD, MD Mercedes Piedad de León-Bautista,

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to PLOS ONE and entitled "Immunological and Functional Characterization of RhoGDI3 and its Molecular Targets RhoG and RhoB in human Pancreatic Cancerous and Normal cells."

The corresponding author for the submission process is: DR Miguel Vargas
The full author list for the submission is: Mercedes Piedad de León-Bautista; Maria del Carmen Cardenas-Aguayo; Diana Casique-Aguirre; Sara Parraguirre-Martinez; Angelica Olivo-Diaz; Miguel Vargas

If you are not aware of this submission, or if you should not be listed as a co-author, then please contact the journal office at plosone@plos.org.

Kind regards,
PLOS ONE
<http://pone.edmgr.com/>