



Cinvestav

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Estudio de la participación de la isoforma H2A.Z.1 de la
variante de histona H2A.Z en el adenocarcinoma ductal
pancreático”**

TESIS

Que presenta

L.B.G. DAVID ALEJANDRO ALMAGUER MOLINA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de tesis

DRA. ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS

Ciudad de México.

Agosto, 2019

ASESORES

DR. MIGUEL ÁNGEL VARGAS MEJÍA

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS

INVESTIGADOR TITULAR 3D

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. JOSÉ EDUARDO PÉREZ SALAZAR

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

CINVESTAV-IPN

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado durante el desarrollo de este trabajo y otorgarme la beca con el número de registro 631049.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional y al Departamento de Biomedicina Molecular por brindarme el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo mi trabajo de maestría.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas por todo el conocimiento, observaciones y tiempo que compartió conmigo. Por haber mantenido su paciencia y confianza en mí a lo largo del proyecto, el cual sólo nosotros sabemos lo complicado que se volvió. Finalmente, por su apoyo, sus palabras de aliento y motivación para que encontrara mi camino dentro de la ciencia. Infinitas Gracias.

A mi comité asesor: Al Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por su disponibilidad, por sus invaluable consejos y por haber enriquecido mi proyecto de maestría con sus observaciones y opinión.

A mi amigo el M. C. Pedro Antonio Ávila López por tu disposición, tu ayuda y tus enseñanzas, contribuiste en gran medida para que llevara a cabo este proyecto de maestría y fuiste mi maestro durante mi estancia en el laboratorio. Sin embargo, te agradezco aún más por tus pláticas, tus consejos, tus bromas y por ser más que un compañero.

A mi amiga la Lic. Roxana Esmeralda Delgado Pérez por tu amistad sincera, por haber compartido estos más de dos años de maestría conmigo y por ayudarme a encontrar una razón para continuar aún en los momentos más difíciles.

A la M. C. Lissuly Álvarez, la M. C. Isabel Quintanilla y la Dra. Daniela Lozano por su asistencia, su experiencia, las horas de trabajo que compartimos y ayuda incondicional.

A José Luis Gómez Brito, nuestro técnico de laboratorio, quien sin tu ayuda y trabajo en el laboratorio hubiera sido muy difícil haber concluido este proyecto. Tu apoyo es esencial para el funcionamiento del laboratorio.

A mi amiga Maricela Medrano Silva por todos los momentos especiales que hemos creado, por todas las veces que me has escuchado y has sido un apoyo para mí, te has vuelto parte de mi familia y de mi corazón.

A mis sobrinos Leonardo y Zoé Barroso Almaguer por motivarme e inspirarme, pues su inocencia me recuerda que la vida siempre es mejor de lo que parece y que nuestros problemas los creamos nosotros mismos.

A mi hermano Miguel Ángel Almaguer Molina por enseñarme que nunca es en vano luchar por nuestros sueños, que no está mal ser diferente del resto y que la satisfacción propia vale más que cumplir con los estándares de otros.

A mi hermana Sandra Gisela Almaguer Molina por representar para mí la voz de la razón, la moral y la dedicación. Es a ti a quien le debo mi personalidad tan minuciosa y organizada, pues siempre me ha inspirado tu ejemplo y has sido mi modelo a seguir.

A mi madre Silvia Molina Rocha por enseñarme lo que es el trabajo duro, por tu fortaleza, por tu sacrificio y por haber luchado para que pudiera salir adelante. Todo lo que he logrado y lo que me falta por alcanzar te lo dedico a ti, porque me has apoyado ciegamente en cada paso y decisión que he tomado e incluso has confiado en mí cuando yo mismo he dudado de mis capacidades.

A Carlos Peralta de Lira por ser el pilar sobre el que cimenté mi camino, por ser mi compañero de aventuras y riesgos, tu compañía me ha dado la confianza y el valor para afrontar nuevos desafíos, pues nunca me siento solo a tu lado. GRACIAS POR IMPULSARME A SER LA MEJOR VERSIÓN DE MÍ.

ÍNDICE

Resumen	v
Abstract	vii
Índice de figuras y tablas	ix
Abreviaturas	xi
Introducción	1
Anatomía del páncreas	1
Relevancia del cáncer de páncreas	3
Manifestaciones clínicas (Síntomas)	5
Diagnóstico	5
Estadificación del PDAC	8
Tratamiento/Control de la enfermedad	10
Clasificación del cáncer de páncreas exocrino	10
Lesiones pre-neoplásicas del PDAC	11
Interacción entre mecanismos de regulación	15
Mecanismos genéticos alterados en PDAC	18
Mecanismos epigenéticos	24
Histona H2A.Z y sus funciones	40
Isoformas de la variante de histona H2A.Z	41
H2A.Z y su asociación al cáncer	43
Antecedentes directos	45
Justificación	47
Hipótesis	48
Objetivos	49
Diagrama general de trabajo	50
Materiales y métodos	51
Líneas celulares	51
Subcultivo celular	51
Extracción de RNA total	52

Cuantificación del RNA	53
Análisis de la integridad del RNA	53
Tratamiento con DNasa	54
RT-PCR/Síntesis de cDNA	54
qPCR	55
Generación de líneas celulares <i>knock down</i>	57
“ <i>Annealing</i> ” de oligonucleótidos y clonación del shRNA en el plásmido	59
pLL3.7-puro	
Realización de la MAXI-PREP	61
Obtención de partículas lentivirales	62
Transducción de células PANC-1	64
Obtención de clones <i>knock down</i> para H2A.Z.1 por dilución limitada	64
Cinética de crecimiento	64
Ensayo clonogénico	65
Ensayo metabólico	65
Incorporación de BrdU y análisis de ciclo celular	66
Western Blot	67
Análisis estadísticos	70
Resultados	71
Identificación de los niveles de expresión de H2A.Z.1	71
Generación de una línea celular PANC-1/KD-Z.1	73
El KD de H2A.Z.1 altera la proliferación celular	81
La línea celular PANC-1 y la línea celular C1/KD-Z.1 poseen perfiles transcripcionalmente distintos	87
Discusión	91
Conclusiones	107
Perspectivas	108
Bibliografía	109

RESUMEN

El Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC) se considera uno de los tipos de cáncer más letales, ya que se estima que alrededor del 96% de los pacientes diagnosticados mueren a causa de esta enfermedad, por lo que resulta imperativo comprender los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de este cáncer. En este sentido hemos encontrado que la variante de histona H2A.Z se encuentra sobreexpresada tanto en líneas celulares de cáncer de páncreas, así como en biopsias de pacientes con PDAC, mientras que a nivel de mRNA se observó que las tres isoformas (H2A.Z.1, H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2) se encuentran sobreexpresadas en líneas celulares cáncer de páncreas. Sin embargo, faltaba conocer cómo participa cada una ellas en el desarrollo del PDAC.

Como primer acercamiento, en el presente trabajo buscamos evaluar el papel de la isoforma H2A.Z.1 mediante la generación de una línea celular *knock down* para esta isoforma a la cual denominamos “C1/KD-Z.1”. En la línea C1/KD-Z.1 se observó una disminución en la proliferación celular al compararla con la línea parental de cáncer de páncreas PANC-1, sin que esta disminución se deba a la apoptosis. Además, al analizar el ciclo celular de nuestra línea C1/KD-Z.1, se observó un arresto en la transición de las fases G1/S del ciclo celular, atribuyendo a este fenómeno la alteración en la tasa de proliferación celular. Posteriormente, para conocer los genes que se desregulaban como consecuencia de decrecer los niveles de expresión de la isoforma H2A.Z.1, se realizaron microarreglos a partir del transcriptoma completo de las líneas C1/KD-Z.1 y PANC-1. De esta forma se identificaron 228 genes diferencialmente expresados en la clona C1/KD-Z.1 ($p < 0.005$ y un $FC < -1.5$ y > 1.5), de los cuales 59 genes están sobre expresados y 169 genes están disminuidos. Nuestros resultados mostraron que en la línea C1/KD-Z.1 hay una sobreexpresión de genes asociados a la transición G1/S, al inicio de la replicación, a la respuesta al daño del DNA, a la reparación de DNA, a la biosíntesis de DNA y al mantenimiento de los telómeros; con respecto a la

línea PANC-1. Lo que indicaría que H2A.Z participa directa o indirectamente en regular la expresión de genes implicados en el metabolismo del DNA.

Nuestros hallazgos y lo que ha sido reportado en la literatura sugieren que la sobreexpresión de varios genes implicados en la replicación y reparación del DNA, provocan un estrés replicativo, lo que conlleva a que las células se acumulen en la fase G1/S, lo cual incrementa el daño al DNA que activa los mecanismos de reparación del DNA. Tales respuestas pueden limitar la progresión de la lesión y conducir al proceso de transformación o de senescencia. Sin embargo, en el presente trabajo aún se mantiene la pregunta abierta sobre si el *knock down* de la isoforma H2A.Z.1 promueve la senescencia o conduce a las células a un proceso de transformación.

ABSTRACT

The Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is considered one of the most lethal cancer types, since it is estimated that about 96% of patients diagnosed with this disease die, that is the reason why it is imperative to understand the molecular mechanisms involved in the development of this cancer. In this sense, we have found that the histone variant H2A.Z is overexpressed in pancreatic cancer cell lines but also in biopsies of patients with PDAC, while at mRNA level the three isoforms (H2A.Z.1, H2A.Z.2.1 and H2A.Z.2.2) are overexpressed in pancreatic cell lines. However, it is still necessary to understand how each of these isoforms participate in the development of PDAC.

As a first approach, in the present work determined the role of H2A.Z.1 isoform, by generating a knock down cell line for this isoform, which we call "C1/KD-Z.1". In the C1/KD-Z.1 cell line, a decrease in cell proliferation was observed when we compare it to the parental pancreatic cancer cell line PANC-1, without this decrease being produced by apoptosis. In addition, when we analyze the cell cycle of C1/KD-Z.1 an arrest was observed in the transition between the G1/S phases of the cell cycle, attributing to this phenomenon the alteration in the cell proliferation rate. Subsequently, to know which genes are deregulated as a consequence of decreasing the expression levels of H2A.Z.1, microarrays were performed from the complete transcriptome of C1/KD-Z.1 and PANC-1 cell lines. From these microarrays 228 differentially expressed genes in clone C1/KD-Z.1 were identified ($p < 0.005$ and $FC < -1.5$ and > 1.5), of which 59 are upregulated and 169 are downregulated. Our results showed that in line C1/KD-Z.1 there is an overexpression of genes associated to the G1/S transition, to the beginning of replication, to the DNA damage response, to DNA repair, to biosynthesis of DNA and to maintenance of telomeres; regarding the PANC-1 cell line. These results would indicate that H2A.Z directly or indirectly controls the expression of genes involved in DNA metabolism.

Our findings and what has been reported in the literature suggest that the overexpression of several genes associated with DNA replication and DNA repair cause replicative stress, which leads the cells to accumulate in the G1/S checkpoint and increases the DNA damage activating DNA repair mechanisms. Such responses can limit the progression of the DNA damage and lead to the process of transformation or senescence. Nevertheless, in the present work we keep unanswered whether the H2A.Z.1 knock down promotes senescence or leads to a transformation process.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Anatomía del páncreas	2
Figura 2. Rutas morfológicas que conducen al desarrollo de un carcinoma pancreático invasivo	11
Figura 3. Desarrollo del PDAC a partir de una lesión PanIN	13
Figura 4. Lesiones precursoras y eventos genéticos envueltos en la progresión del PDAC	16
Figura 5. Cambios histopatológicos y moleculares en la patogénesis del adenocarcinoma pancreático (PDAC)	17
Figura 6. Actividades llevadas a cabo por el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (SNF2)	37
Figura 7. Variantes de las histonas canónicas humanas	39
Figura 8. Alineamiento de las isoformas de la variante de histona H2A.Z	43
Figura 9. Modelo del funcionamiento de H2A.Z.2-BRD2-E2F1 en células de melanoma	44
Figura 10. Evaluación de la expresión de la variante H2A.Z y sus distintas isoformas en líneas celulares de PDAC	46
Figura 11. Identificar la participación de la isoforma H2A.Z.1 en el desarrollo del PDAC	50
Figura 12. Sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos para la RT-qPCR de las isoformas de H2A.Z	56
Figura 13. Estructura de los shRNA diseñados en este proyecto	58
Figura 14. Estructura del plásmido pLL3.7-puro	59
Figura 15. PANC-1 es la línea celular que presenta mayores niveles de expresión de H2A.Z.1	72
Figura 16. Esquema general para desarrollar una línea celular PANC-1/KD-Z.1	73
Figura 17. Diseño de un shRNA que reconoce específicamente el mRNA de la isoforma H2A.Z.1	74
Figura 18. Clonación del shRNA-Z.1 en el vector lentiviral pLL3.7-puro	76
Figura 19. Resultado de la secuenciación del vector pLL3.7-puro-shRNA_H2A.Z.1	77
Figura 20. Evaluación del nivel de expresión de H2A.Z en la línea PANC-1/KD-Z.1 a nivel de población	78
Figura 21. Evaluación del patrón de expresión de H2A.Z en la clona C1/KD-Z.1	80
Figura 22. Diferencia en la densidad celular entre las líneas PANC-1 y C1/KD-Z.1	81
Figura 23. El KD de la isoforma H2A.Z.1 no induce la activación de la apoptosis	82
Figura 24. El KD de la isoforma H2A.Z.1 provoca una proliferación celular más lenta	84
Figura 25. El KD de la isoforma H2A.Z.1 induce un retraso en la progresión de la fase G1/S	86
Figura 26. Existe una expresión diferencial de genes entre las líneas PANC-1 y C1/KD-Z.1	87

Figura 27. Procesos y vías de señalización alteradas por la expresión diferencial de genes (DEG) en la C1/KD-Z.1	89
Figura 28. Una replicación aberrante puede desencadenar en uno de dos fenómenos distintos: Transformación o senescencia.	106
Tabla I. Estadificación del cáncer basado en el sistema “TNM”	9
Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos para determinar los niveles de expresión de las isoformas de H2A.Z mediante RT-qPCR	55
Tabla III. Secuencia del shRNA diseñado para hibridar específicamente con el mRNA de la isoforma H2A.Z.1	58
Tabla IV. Anticuerpos primarios a utilizar	69
Tabla V. Anticuerpos secundarios a utilizar	70

ABREVIATURAS

5mC	5-metilcitosina
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATR	ATM- y Rad3-relacionada
BrdU	Bromo-deoxiuridina
CDC6	<i>Cell division cycle 6</i>
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
cDNA	DNA complementario
DDR	Respuesta de daño a DNA
DEG	Genes diferencialmente expresados
DNMT	Metil-transferasa de DNA
DSB	Ruptura de doble cadena de DNA
dsDNA	DNA de doble cadena
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EMT	Transición epitelio mesénquima
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
EXO1	Exonucleasa 1
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GEM	Gemcitabina
HAT	Acetil-transferasa de histonas
HDAC	Deacetilasa de histonas
HDM	Desmetilasa de histonas
H&E	Tinción de hematoxilina y eosina
HMT	Metil-transferasa de histonas
HR	Recombinación homóloga
IPMN	Neoplasia intraductal papilar mucinosa
lncRNA	RNA largo no codificante
MCN	Neoplasia quística mucinosa
MMR	Reparación de <i>mismatch</i>
miRNA	MicroRNA
mTOR	Blanco mecanístico de la rapamicina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MUC	Mucina
ncRNA	RNA no codificante
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NF-κB	Factor nuclear-kappa B
NHEJ	Unión a extremos no homólogos
PanIN	Neoplasia intraepitelial pancreática
PARP	Polimerasa de poli-ADP-ribosa
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático

PI3K	Cinasa 3 del fosfatidilinositol
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
Pol θ	DNA polimerasa θ
PRC	Complejo represivo polycomb
pre-RC	Complejo pre-replicativo
PRMT	Proteína metiltransferasa de argininas
PSA	Persulfato de amonio
PTM	Modificación post-traducciona
qPCR	PCR cuantitativa
RB	Proteína de retinoblastoma
RFC	<i>Replication Factor C</i>
RIN	Número de integridad del RNA
RISC	Complejo inductor del silenciamiento de RNA
rRNA	RNA ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	RNA pequeño de interferencia
sncRNA	RNA pequeño no codificante
SRCAP	Proteína activadora CREBBP relacionada a Snf2
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UTR	Región no traducible
WB	Western Blot

INTRODUCCIÓN

Anatomía del páncreas

El páncreas es un pequeño órgano de forma alargada, que mide ~ 6 pulgadas de longitud y < 2 pulgadas de ancho y se ubica delante de los vasos prevertebrales y del riñón izquierdo, oculto detrás del estómago, en la cavidad retroperitoneal. El páncreas tiene una forma de gancho y en él se distinguen cuatro partes morfológicas: 1. La cabeza, que es una porción ensanchada y voluminosa que se adhiere al duodeno formando la ampolla hepatopancreática (Ampolla de Vater), 2. El cuello, que es la continuación de la cabeza, 3. El cuerpo, que es un segmento alargado que se va volviendo estrecho, 4. La cola, la cual contacta con el bazo **(Figura 1A)**¹. Su peculiar localización, muy posterior al abdomen, pero al mismo tiempo próximo al hígado, hace que esté en íntimo contacto con estructuras vasculares vitales como la vena cava inferior, la arteria aorta y las arterias que irrigan el intestino e hígado ².

El páncreas es considerado una glándula mixta, ya que está constituida por dos componentes glandulares estructuralmente distintos, uno de ellos es el componente exocrino y otro el otro es el componente endócrino. La porción exocrina del páncreas constituye la mayor parte del tejido pancreático (>95% de la masa total del órgano) y posee estructuras internas en forma de pequeños lóbulos, compuestos a su vez de los acinos pancreáticos, formados por conjuntos de células secretoras agrupadas, denominadas células acinares **(Figura 1C)**. Estos acinos se continúan con un conducto intralobular, constituidos por células ductales, el cual confluye en conductos interlobulares que drenan en dos conductos excretores: el conducto pancreático principal y el conducto pancreático accesorio **(Figura 1A)**. El conducto pancreático principal recorre el páncreas desde la cola hasta la cabeza, para desembocar en la ampolla de Vater **(Figura 1B)**. Mientras tanto, el conducto pancreático accesorio, que se origina en la parte inferior de la cabeza, sube por delante del conducto pancreático principal, al que se une por un conducto colateral y termina abriéndose al duodeno, en la región papilar duodenal menor ¹.

En lo que respecta a la función de la porción exocrina del páncreas, es la porción encargada de secretar el jugo pancreático hacia el duodeno. Dicho jugo está compuesto por enzimas digestivas hidrolíticas indispensables para la digestión en el intestino¹.

Mientras que la porción endocrina constituye no más del 5% de la masa total del órgano y está constituida por los islotes pancreáticos (Islotes de Langerhans). Estos islotes son agrupaciones formadas por conjuntos celulares entremezclados en una red capilar (**Figura 1C**). Hay aproximadamente un millón de islotes, formados por: células alfa (α), que secretan el glucagón; beta (β), que secretan la insulina y amilina; delta (δ), productoras de somatostatina; épsilon (ϵ), que producen la grelina; células PP, que secretan el polipéptido pancreático (PP), que inhibe las secreciones exocrinas; y células G, que producen la hormona polipéptida, gastrina¹.

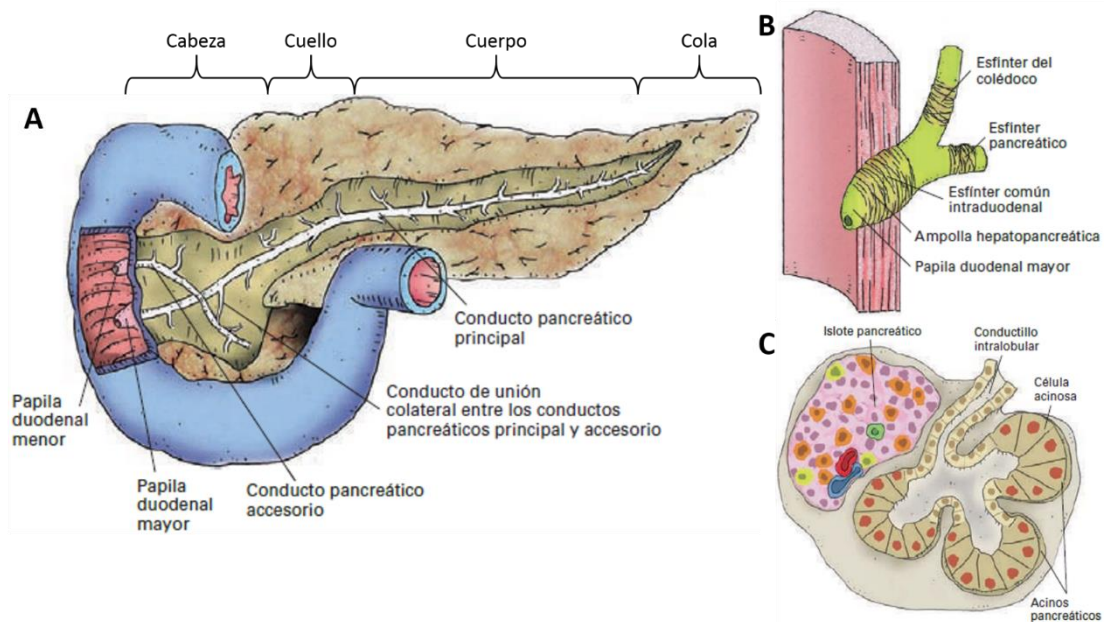


Figura 1. Anatomía del páncreas. A) Visión anterior del duodeno y del páncreas. Representación esquemática de una disección de los conductos pancreáticos y del interior de la segunda porción del duodeno. **B)** Esquema del complejo esfinteriano de Oddi. **C)** Estructura del páncreas mostrando un islote y un conjunto de acinos pancreáticos. Células beta (rosa); células alfa (naranja); células delta (amarillo); células PP (verde) (**Modificada**)¹.

Debido a la importante función que desempeña este órgano, alteraciones en el mismo llegan a repercutir gravemente en la homeostasis del organismo y conducen al desarrollo de enfermedades sumamente importantes con un alto impacto en la salud pública, como son: la pancreatitis, diabetes mellitus I o II y el cáncer pancreático ².

Relevancia del cáncer de páncreas

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), y tomando como base en las estadísticas más recientes del año 2018 ³, el cáncer de páncreas se ubicó en el 11^{vo} lugar en incidencia y en el 7^{mo} lugar en mortalidad a nivel mundial, lo cual se traduciría en una incidencia estimada de 458,000 individuos y una mortalidad de 432,000 individuos. En México, en el mismo año y de acuerdo con los datos estadísticos de la OMS, el cáncer de páncreas se ubicó como el 11^{vo} lugar en incidencia y en el 7^{no} lugar en mortalidad, siendo el 4^{to} país con mayor incidencia en el continente ³. Además, estadísticas nacionales reportan un índice de fatalidad de 0.96, es decir que casi el 100% de los pacientes diagnosticados en el país llegan a morir en un periodo menor a 1 año. Por lo que entonces, el pronóstico de los pacientes con cáncer de páncreas no es muy bueno, ya que tan solo el 26% de los pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas presentan una sobrevida de un año, mientras que el 5% de los pacientes presentan una sobrevida de 5 años.

El cáncer de páncreas más frecuente es el adenocarcinoma. Sus síntomas son variados e inespecíficos y cambian en función de la localización del tumor dentro de la glándula. La localización del tumor más frecuente (60-70%) es a nivel de la cabeza del páncreas y en ellos aparece pronto una ictericia obstructiva por compresión o infiltración de la vía biliar secundarias al crecimiento tumoral a su alrededor. En el 36-40% restante, el tumor se localiza en el cuerpo y cola del páncreas, donde no suele aparecer ictericia por lo que resulta más difícil sospechar su presencia.

La mayoría de las neoplasias de páncreas son adenocarcinomas, por su origen glandular (75-80%), seguido de los tumores neuroendocrinos (15-

20%), de forma muy rara se observa la aparición de los carcinomas coloides (2%), los tumores sólidos pseudopapilares (2%), carcinomas de células acinares (1%) y pancreatoblastomas (0.5%)⁴. A partir de lo anterior, se puede concluir que la gran mayoría de las neoplasias pancreáticas se asocian al tejido exocrino (95%) y solo un 5 % corresponden al tejido endócrino.

Dentro de las neoplasias pancreáticas provenientes del tejido exocrino, el Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC) es la más común de las malignidades de páncreas y representa el 90-95% de los cánceres de este órgano⁵. El PDAC representa un problema de salud substancial, con un estimado de 367,000 nuevos casos diagnosticados a nivel mundial en el 2015 y unas 359,000 muertes asociadas a esta enfermedad en el mismo año^{3 4}. Actualmente, el PDAC es la 4^{ta} causa de muerte por cáncer en países desarrollados y se predice que se convertirá en la 2^{nda} dentro de la próxima década.

El PDAC está asociado con un pronóstico extremadamente pobre. Entre las diversas razones se encuentra que usualmente es diagnosticado en etapas avanzadas, debido a que en etapas tempranas no se manifiestan síntomas específicos. Además, la falta de marcadores tumorales específicos y sensibles, así como la dificultad para visualizar los tumores en etapa temprana y la resistencia a los fármacos más comúnmente empleados [Gemcitabina (GEM)]⁴. Todos los anteriores son factores que conllevan a que los pacientes con PDAC presenten una supervivencia de solamente 2-8 meses, por lo que se hace inminente la identificación de nuevas estrategias para el mejoramiento del diagnóstico y tratamiento de este tipo de cáncer.

Hasta la fecha las estrategias emergentes para tratar el PDAC son: 1) La identificación de subgrupos de pacientes a los que se les proporcione terapias individualizadas⁶, 2) el desarrollo de terapias moleculares e inmunoterapias enfocadas en el microambiente tumoral como posible blanco⁷ y 3) realizar un mayor esfuerzo en el área de investigación que se enfoque en la detección temprana y validación de biomarcadores tumorales.

Manifestaciones clínicas (Síntomas)

Como ya se mencionó, el PDAC en etapas tempranas es usualmente silencioso y sólo se vuelve sintomático cuando el tumor invade tejidos circundantes o realiza metástasis a órganos distantes. A la mayoría de los pacientes que presentan síntomas se les atribuye un cáncer de etapa avanzada. En múltiples ocasiones, se han identificado anomalías sospechosas asociadas a cáncer de páncreas gracias a que los pacientes se han realizado tomografías por motivos no asociados al cáncer. Se estima que tales anomalías pueden surgir hasta un año antes de que el paciente desarrolle una sintomatología, lo que supone una posibilidad de detección en etapas tempranas para el paciente ⁸.

Entre los síntomas que suelen presentar los pacientes con PDAC avanzados se incluyen: el dolor abdominal o de espalda media, ictericia obstructiva, pérdida de peso y la generación de trombosis venosa. Ocasionalmente, la obstrucción del ducto pancreático puede resultar en una pancreatitis, y en algunos casos, alrededor del 25% de los pacientes con PDAC desarrollan diabetes, mientras que un 40% tienen una mala tolerancia a la glucosa ⁸.

Diagnóstico

Como se mencionó previamente, la baja tasa de sobrevivencia de los pacientes con PDAC se debe principalmente a que el diagnóstico ocurre en etapas avanzadas (80% de los casos), en las cuales, el tumor primario ha realizado metástasis, ocasionando la presencia de tumores secundarios en órganos como hígado y los pulmones, disminuyendo de esta manera las opciones de tratamiento ⁹.

Actualmente, en la clínica se cuentan con tres diferentes herramientas de diagnóstico, los cuáles, además de detectar la presencia del tumor, ayudan a la estadificación de la enfermedad. Los tres métodos de diagnóstico son: 1. Los estudios de imagenología, 2. El diagnóstico por empleo de antígenos y

marcadores moleculares, 3. La biopsia ^{5 8}. A continuación describiremos las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

a. Imagenología

La tomografía computarizada trifásica es la mejor prueba de diagnóstico para el cáncer de páncreas, ya que permite determinar el estado de la enfermedad y provee una precisión del 80% en la predicción de la capacidad de resección de la malignidad ⁸. Sin embargo, las lesiones precursoras al PDAC de tamaño muy pequeño (< 1cm) no son observable con este tipo de técnica, además de que estos estudios no son los primeros en realizarse cuando no existen síntomas específicos, perdiendo así la oportunidad de realizar la resección en estos pacientes. Por lo que, cada vez se están implementando estrategias y técnicas más sensibles, como es el caso de la “Tomografía de emisión de positrones” (PET), que van dirigidas a garantizar el diagnóstico y pronóstico para poder aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes.

Dado que la patología es requerida para establecer el diagnóstico de cáncer pancreático, a la mayoría de los pacientes se les somete a una “Ultrasonografía endoscópica” (EUS) con una aguja fina para la absorción de biopsia ⁴. A pesar de que la EUS provee una excelente resolución del páncreas, vasos pancreáticos y nódulos linfáticos, tiene como desventaja ser una técnica invasiva para el paciente.

b. Biomarcadores antigénicos y moleculares

Otra de las áreas de mayor investigación y desarrollo para el diagnóstico oportuno, es la identificación de biomarcadores de alta especificidad. El más utilizado es el antígeno de cáncer CA 19-9 (antígeno sializado de Lewis-a). El antígeno CA 19-9 es una glucoproteína producida por células tumorales y liberadas a la circulación sanguínea ⁴. Desafortunadamente, el CA 19-9 carece de suficiente sensibilidad o especificidad para ser usado en un diagnóstico temprano, ya que: 1. no todos los pacientes con cáncer pancreático presentan

niveles elevados de este antígeno, 2. otras enfermedades pancreáticas no cancerígenas pueden aumentar los niveles de CA 19-9 y 3. este antígeno también ha sido observado en cáncer colorrectal, cáncer esofageal y hepatocarcinoma.

En lo que respecta a los biomarcadores moleculares. Se ha empleado como templado el DNA tumoral presente en torrente sanguíneo, el cual está presente en el 43% de los pacientes, para realizar ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar genes como *K-RAS* o *TP53*, los cuales normalmente se encuentran mutados ⁴. Sin embargo, aunque esta estrategia no es invasiva para el paciente, la amplificación de estos genes no es exclusiva de PDAC, ya que *KRAS* y *TP53* se encuentran mutados en varios tipos de cáncer, por lo que, aunque es una técnica sensible, no es específica ¹⁰.

Por otro lado, también se han logrado obtener exosomas que acarrean proteínas, ácidos nucleicos y microRNAs, a partir de sangre periférica de pacientes con PDAC, que podrían ser empleados para su diagnóstico ⁴. De manera particular, se ha propuesto usar firmas de microRNAs para el diagnóstico específico de cáncer pancreático ¹⁰. De igual manera, se ha propuesto buscar la presencia de complejos nucleosomales circulantes como biomarcadores, ya que se ha encontrado que en sangre periférica también se hallan los nucleosomas que proceden de células cancerosas, a los cuales se les puede estudiar modificaciones post-traduccionales (PTMs) específicas para cada tipo de cáncer, así como estudiar a las histonas o variantes de histonas que constituyen a estos nucleosomas. Por ejemplo, la liberación de nucleosomas que presentan la marca H4K16ac y H4K20me3 ha sido observada en estadios tempranos de procesos tumorigénicos, junto con la hipometilación global del DNA, obtenidos a partir de muestras sanguíneas de pacientes ¹¹. Sin embargo, estas estrategias aún se encuentran en desarrollo.

c. Biopsias

Sin embargo, para la mayoría de los tipos de cáncer, la biopsia es la única forma que permite formular un diagnóstico definitivo del cáncer. Esta consiste en la extirpación de una pequeña cantidad de tejido para su examen microscópico. Hay diversas maneras de extraer una muestra de tejido, una de ellas es la aspiración por aguja fina (FNA). En otro método se usa una biopsia con aguja gruesa, para extraer una porción más grande de tejido, el cual puede ser empleado para realizar pruebas moleculares o genéticas del tumor.

Finalmente, todas estas pruebas de diagnóstico permiten averiguar el estadio del cáncer, lo cual ayudará a determinar cuál es el mejor tratamiento y a predecir el pronóstico de un paciente.

Estadificación del PDAC

Una vez que el paciente ha sido diagnosticado, es necesario identificar la etapa del cáncer para la elección del tratamiento. El estadio busca reflejar qué tan grande es el tumor y la extensión del cáncer, pues permite determinar la gravedad y sobrevivencia, lo cual permitirá establecer un diagnóstico y un tratamiento más adecuado. El sistema TNM es el sistema de estadificación de cáncer de mayor uso, pues se puede aplicar a distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de páncreas. Este sistema toma en cuenta tres criterios diferentes: La **T**, la cual se refiere al tamaño del tumor principal. La **N** describe la extensión del cáncer, es decir, si éste ya se ha diseminado a los nódulos (O ganglios) linfáticos cercanos. Mientras que la **M** indica si el cáncer se ha extendido a otras partes del cuerpo (metástasis). De tal manera que la estadificación permite determinar el avance que presenta el cáncer ¹². Dependiendo de lo avanzado que se encuentre el cáncer en el momento del diagnóstico, se pueden asignar diferentes grados a estas categorías.

Posterior a la asignación de las categorías, al cáncer se le puede englobar en una de las etapas generales que van de la 0 a la IV, subdividiendo la etapa I en IA y IB, así como la II en IIA y IIB ^{8 12}. Partiendo de la

determinación del estadio del cáncer al momento del diagnóstico, el médico toma la decisión sobre el tratamiento que se le va a dar al paciente.

En la **Tabla I** se detallan las características de cada etapa, así como el porcentaje de sobrevivencia a 5 años para cada una de ellas ⁵.

Tabla I. Estadificación del cáncer basado en el sistema “TNM” (Modificada)^{5 8}.

ESTADIFICACIÓN DEL PDAC			
Etapa	Categoría TNM	Características	Sobrevivida a 5 años
0	Tis, N0, M0	El tumor está confinado a las capas superiores de células del conducto pancreático y no ha invadido los tejidos más profundos. No se ha propagado fuera del páncreas.	
IA	T1, N0, M0	El tumor está confinado en el páncreas y mide menos de 2 cm. No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes ni a sitios distantes.	14%
IB	T2, N0, M0	El tumor está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm. No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes ni a sitios distantes.	12%
IIA	T3, N0, M0	El tumor presenta crecimiento fuera del páncreas, pero no hasta los vasos sanguíneos o nervios principales. No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes.	7%
IIB	Tx-3, N1, M0	El tumor está confinado fuera del páncreas o fuera de él, pero no hacia los vasos sanguíneos o nervios principales. Se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes.	5%
III	T4, N1-3, M0	El tumor se presenta fuera del páncreas hacia los vasos sanguíneos o nervios principales adyacentes. Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes ni a sitios distales.	3%
IV	Tx-4, N1-3, M1	El cáncer se ha propagado a órganos distales, más allá de los nódulos linfáticos regionales. Tumores secundarios.	1%

Tratamiento/Control de la enfermedad

Una vez que el médico ha diagnosticado la etapa del PDAC que tiene el paciente, puede ofrecérsele un tratamiento adecuado. Debido a que el cáncer de páncreas es una enfermedad heterogénea a nivel molecular, patológica y clínica, su manejo requiere un enfoque multidisciplinario que incluya a un oncólogo, radiólogo, patólogo, cirujano e inclusive un experto en cuidados paliativos ⁸.

El plan idóneo a seguir es la cirugía, lo cual tiene como ventaja que la mortalidad operatoria por resección de páncreas es muy baja y son pocas las complicaciones post-operatorias que se pueden presentar. Sin embargo, esta opción es específica para aquellos pacientes cuyos análisis y diagnósticos les sugieren que se les puede extirpar por completo el tumor (Lesiones pre-neoplásicas y estadio inicial I). Cuando el PDAC se encuentra en un estadio intermedio II, donde el tumor ha aumentado su volumen de forma local, se utiliza el tratamiento por radioterapia. Finalmente, la quimioterapia es el procedimiento usado para tratar a aquellos pacientes en los cuales el cáncer ha realizado metástasis, ya sea a nódulos linfáticos (PDAC estadio III) o a órganos próximos (PDAC estadio IV). Para realizar el tratamiento con quimioterapia, el fármaco más utilizado es la Gemcitabina (GEM), que es un análogo de nucleósidos. Sin embargo, tanto la radioterapia como la quimioterapia provocan la aparición de un gran número de efectos secundarios, al actuar de forma inespecífica sobre las células cancerígenas y sanas, así como la rápida generación de células resistentes ^{5 8}.

Clasificación del cáncer de páncreas exocrino

Basado en la malignidad del tumor, la organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado el cáncer de páncreas exocrino en 3 categorías:

- a. **Benigno:** Como el cistoadenoma seroso y el cistoadenoma mucinoso.
- b. **Limítrofe:** Con potencial maligno incierto, tales como: Neoplasia quística mucinosa (MCN) y neoplasia intraductal papilar mucinosa (IPMN).

c. Malignos: Como el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y el cistoadenoma carcinoma seroso.

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

Lesiones pre-neoplásicas del PDAC

La carcinogénesis pancreática, análoga a la de otros carcinomas, sufre una progresión por etapas, que comienza como una neoplasia intraepitelial para culminar en un cáncer invasivo (**Figura 2**). Se ha calculado que desde la mutación inicial hasta la generación de PDAC, y la subsecuente metástasis, puede tomar alrededor de 12 años. Es decir, es un cáncer que pasa por lesiones pre-neoplásicas antes de considerarse un PDAC. Mediante estudios clínicos e histológicos se han identificado tres lesiones precursoras (pre-neoplásicas) de PDAC, como son: La neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN), la neoplasia quística mucinosa (MCN) y la neoplasia intraductal papilar mucinosa (IPMN), de las cuales la PanIN es más común ¹³.

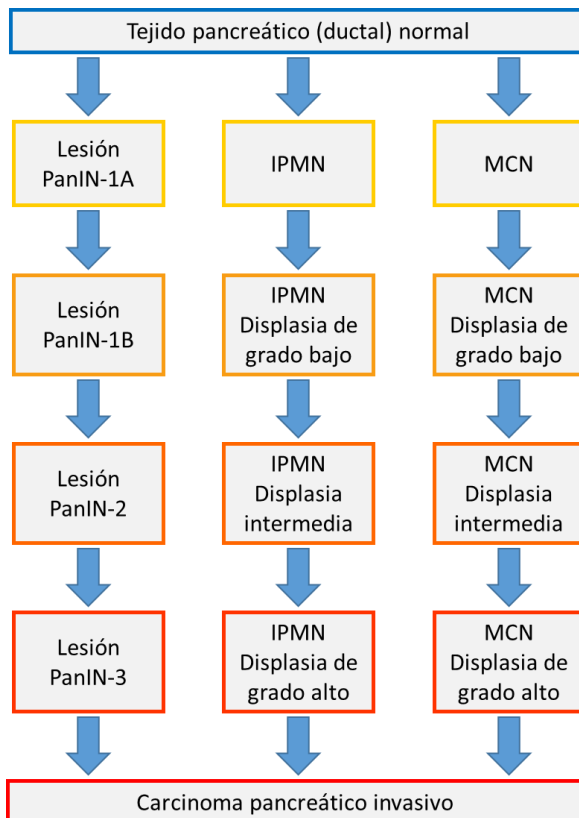


Figura 2. Rutas morfológicas que conducen al desarrollo de un carcinoma pancreático invasivo (Modificada) ¹³.

La neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) es la lesión más importante, ya que el 80% de los PDAC surgen como resultado de este tipo de neoplasia. Es una lesión plana o papilar, microscópica (Usualmente <0.5cmn), que surgen en los ductos pancreáticos intralobulares. En las PanIN el epitelio plano normal, característico del conducto secundario, muestra un aumento de su tamaño, adopta una atipia celular grave y se observa una mitosis celular frecuente ¹³.

Las PanINs están clasificados en tres grados: Lesiones de bajo grado, las cuales presentan una atipia celular mínima conocidas como PanIN-IA (Plana) y PanIN-IB (Papilar). Las PanIN de bajo grado parecen ser lesiones comunes que se encuentran del 16-80% del páncreas normal en ausencia de neoplasia. Las lesiones PanIN-II, de grado intermedio, presentan una atipia de ligera a moderada (caracterizada por una arquitectura alterada del núcleo) y papilas frecuentes. Finalmente, las lesiones de alto grado, PanIN-III, son caracterizadas por una atipia severa, a las que se les refiere como carcinoma *in situ*, y presentan una morfología papilar, pero también pueden presentar un patrón plano o cribiforme ¹³.

En el modelo de progresión del PanIN, la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas conllevan a la progresión neoplásica en estas lesiones precursoras de displasia de bajo grado a la displasia de alto grado (PanIN-III), para eventualmente conducirlo a un PDAC invasivo (**Figura 3**).

También las características inmunohistoquímicas de las PanINs varían mucho dependiendo del grado de displasia que presente. La MUC1 es típicamente expresada por los ductos pancreáticos y células acinares, pero de forma patológica es casi exclusivamente expresada en PanIN-II/PanIN-III y está frecuentemente ligado a un PDAC invasivo. En contraste, MUC5 no está presente en tejido pancreático normal, pero sí en carcinomas ductales desde lesiones PanIN tempranas (PanIN-IA y PanIN-IB) ¹³.

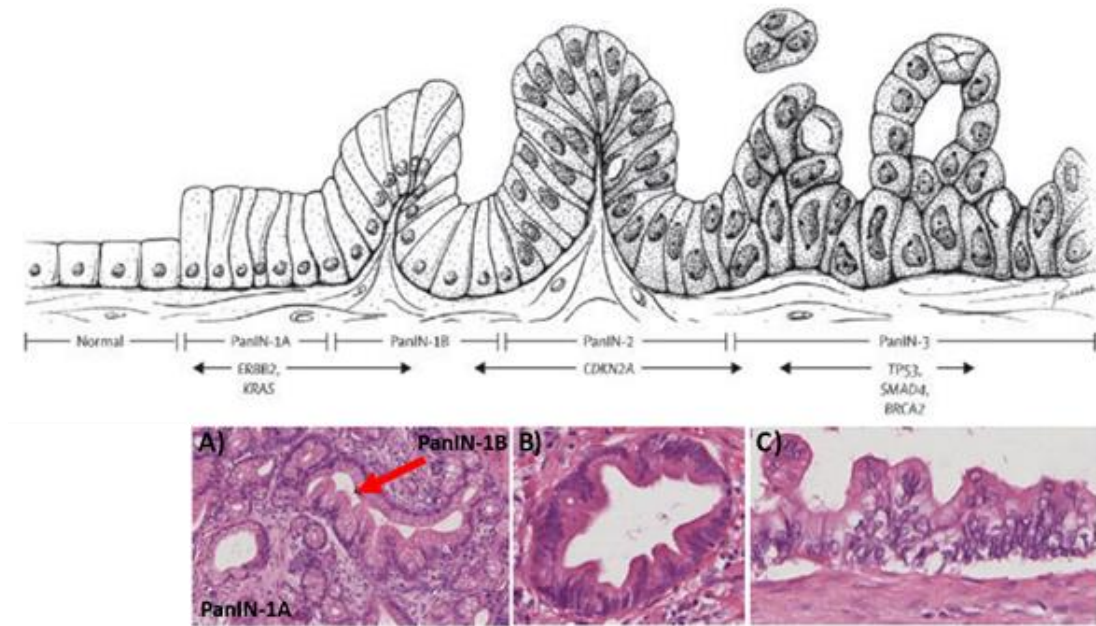


Figura 3. Desarrollo del PDAC a partir de una lesión PanIN. A) Lesión PanIN-IA y IB con arquitectura papilar y ligera atipia celular. **B)** Lesión PanIN-II con moderada atipia citológica, polaridad nuclear y arquitectura parcialmente papilar. **C)** Lesión PanIN-III con atipia citológica severa, pérdida de la polaridad nuclear y arquitectura papilar. (H&E) **(Modificada)**^{8 13}.

Otras lesiones pre-neoplásicas que pueden desencadenar el PDAC, pero que tienen una menor incidencia, son la neoplasia intraductal papilar-mucinoso (IPMN) con una frecuencia aproximada del 20%. Las IPMNs son tumores del epitelio ductal, que morfológicamente se subdividen en las de ductos principales (MD-IPMN) y las de ductos ramificados (BD-IPMN). Las IPMNs son lesiones grandes que miden >1cm y están delimitadas por epitelio columnar secretor de mucina. Algunas IPMNs pueden ser multifocales, por lo que incluso después de una resección pancreática parcial, existe el riesgo de que la lesión progrese ¹³.

En cuanto a la inmunohistoquímica, las IPMNs muestran la expresión de MUC1 y MUC5, pero el tipo oncogénico de las MD-IPMNs está caracterizado por un marcaje difuso de MUC5, MUC6 y un marcaje focal para MUC2. Es este marcaje diferencial lo que permite diferenciar entre PanINs e IPMNs, ya que las lesiones PanINs e IPMNs muestran características

histológicas y moleculares similares y se distinguen por su tamaño y ubicación ¹³. Por otro lado, la mayoría de estas células muestran un alto grado de atipia celular y un aspecto de carcinoma *in situ*.

A diferencia de las IPNMs, que se originan principalmente en la cabeza del páncreas, las neoplasias quísticas mucinosas (MCNs) se localizan típicamente en el cuerpo y cola del páncreas. Son las lesiones precursoras más infrecuentes (5%), teniendo una mayor prevalencia en mujeres. Estas lesiones quísticas son casi siempre solitarias, asintomáticas y su quiste parece septado y puede contener calcificaciones. Usualmente no presentan conexión con el ducto pancreático ductal, ni dilatación de este, por lo que el pronóstico de los pacientes es muy favorable, teniendo una supervivencia a 5 años casi del 100% cuando es una lesión no invasiva y cercana al 60% cuando se trata de una lesión invasiva ¹³.

Estas lesiones pueden tener un gran crecimiento, ya que miden desde 1 hasta 3 cm, presentar una superficie plana y una pseudo cápsula fibrosa. El subtipo no invasivo está clasificado en displasias de bajo grado, displasia moderada y displasia de alto grado. De todas estas lesiones, tan solo un tercio de las MCNs se vuelven invasivas ¹³. Una pista para su diagnóstico es la presencia de un estroma de tipo ovárico, es decir, expresa receptores de progesterona y estrógeno. Presenta los marcadores MUC5 y MUC2 desde un inicio, mientras que la MUC1 es expresada en lesiones de grado alto e invasivas ¹³.

Estas lesiones pre-neoplásicas son relevantes, pues su identificación temprana y tratamiento evita el desarrollo del cáncer invasivo.

En el caso de los PanINs, que son los de mayor frecuencia, desafortunadamente, por su pequeño tamaño no son observables por imagenología o ultrasonido. Por lo que se está tratando de implementar la expresión diferencial de mucinas como un perfil de diagnóstico, así como el empleo de muestras de jugo pancreático como una estrategia no invasiva para el diagnóstico de esta lesión.

Hasta la fecha no existe un consenso para el manejo de lesiones PanIN-III o de IPNMs/MCNs de alto grado, pero lo más recomendado es la resección. Sólo aquellos pacientes frágiles o ancianos, para quienes la cirugía presenta un muy alto riesgo, y que presenten lesiones IPNMs o MCN de bajo grado a moderado, se les aconseja mantenerse en vigilancia constante.

Finalmente, ha quedado claramente establecido que la evolución secuencial de lesiones precursoras a PDAC involucra la acumulación escalonada de diversos cambios moleculares, que conduce a la progresión neoplásica y al desarrollo de carcinoma invasivo maligno (**Figura 4**)¹⁴. Algunas de estas alteraciones genéticas ocurren tanto en PanIN y en menor medida en MCNs y en IPMNs. Ejemplos de estas alteraciones son: el acortamiento de telómeros, mutación en el gen *K-RAS* y pérdida de p16 (que ocurren en las etapas más tempranas), así como eventos tardíos acompañados por la disminución de p53 y SMAD4 (**Figura 4**)⁸.

Interacción entre mecanismos de regulación

Como ya se mencionó, el desarrollo y la progresión del cáncer de páncreas es un proceso multi-pasos, que comienza a partir de una lesión precursora no cancerígena, siendo las PanIN las lesiones de mayor frecuencia, que conducen a un carcinoma invasivo, en donde se ha encontrado que numerosos cambios genéticos y epigenéticos son acumulados a lo largo del tiempo y que son estos los que conducen a que un PanIN progrese hasta un PDAC^{15 19}.

El modelo del triple código es una hipótesis que considera que tres mecanismos, como los cambios genéticos, epigenéticos y la arquitectura nuclear, contribuyen al desarrollo y progresión de la enfermedad en la misma proporción. Indicando que un “*cross talk*” entre los tres mecanismos son capaces de retroalimentarse directamente, para llevar al desarrollo de un PDAC, dejando de considerar a las modificaciones genéticas como el único mecanismo conductor en el desarrollo del PDAC (**Figura 5**)^{10 15 19}. Por lo que

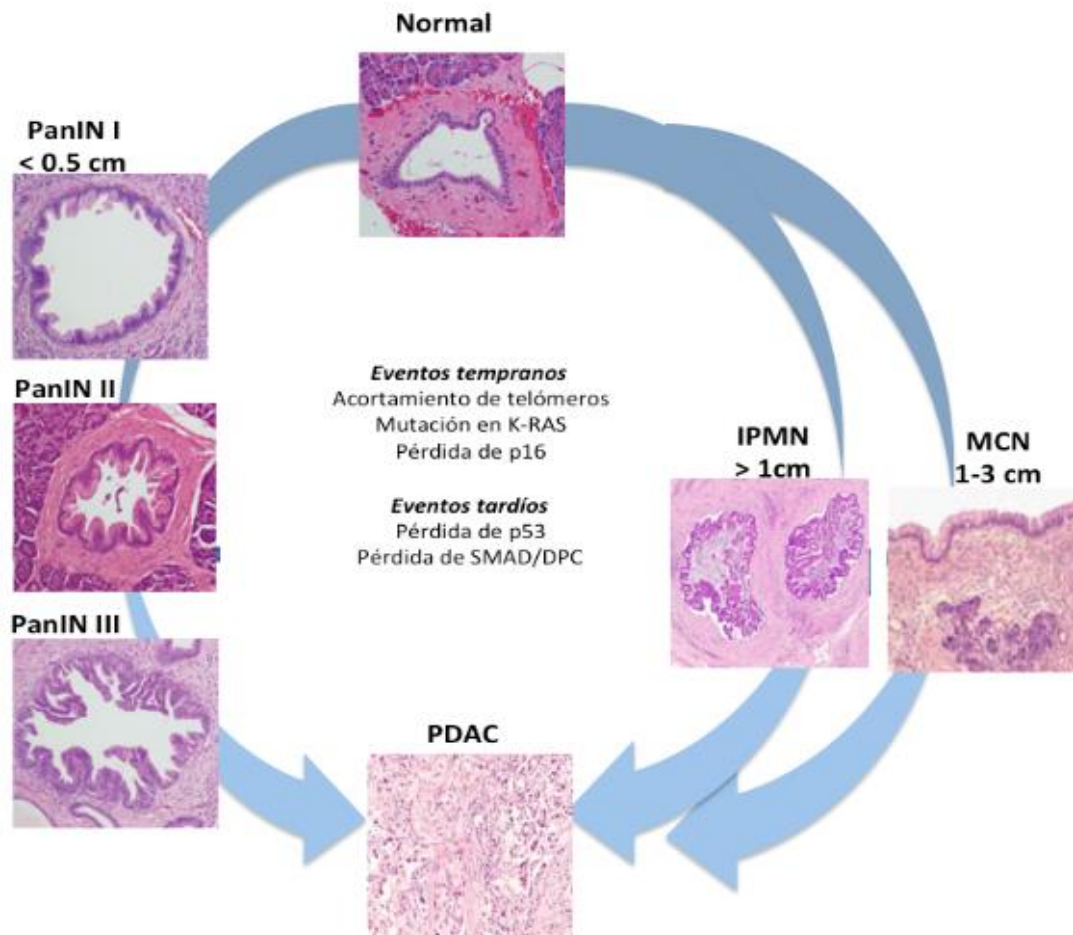


Figura 4. Lesiones precursoras y eventos genéticos envueltos en la progresión del PDAC. Se presenta la histología de las lesiones precursoras de PDAC, como son: PanIN, IPMN y MCN, y el tamaño promedio de cada una de las ellas. Se mencionan las alteraciones genéticas más comunes que permiten el desarrollo del PDAC, en una aparente secuencia temporal (**Modificada**)⁹.

a continuación, se describirán como las alteraciones genéticas y epigenéticas contribuyen al desarrollo del PDAC.

- **Lesiones PanIN tempranas de bajo grado (PanIN-1):** Desde esta etapa se puede encontrar a *KRAS* mutado. Existe una sobre expresión de *ERBB2* y la pérdida de *PTEN*. En cuanto a mecanismos epigenéticos, se ha observado una desregulación en los niveles de metilación del DNA, propiciando así la transcripción de oncogenes y silenciando a genes supresores de tumores.
- **Lesiones PanIN intermedias (PanIN-2):** Mutaciones inactivantes en el gen *p16/CDKN2A* son características. Desde etapas tempranas se ha

identificado una firma en el perfil de los miRNAs, facilitando el diagnóstico de la enfermedad. Se observa un característico aumento en la expresión de miR-21 y miR-155, así como la disminución de miR-217 y miR-296.

- **Lesiones PanIN tardías (PanIN-3):** Se asocian a mutaciones inactivantes o delección en los genes *TP53*, *BRCA2* y *SMAD4*. La pérdida de *SMAD4* ha sido asociada con la metástasis del tumor. En este grado de la lesión, el aumento en los niveles del miRNA “miR-196” sirve como un biomarcador de pronóstico de etapas avanzadas.

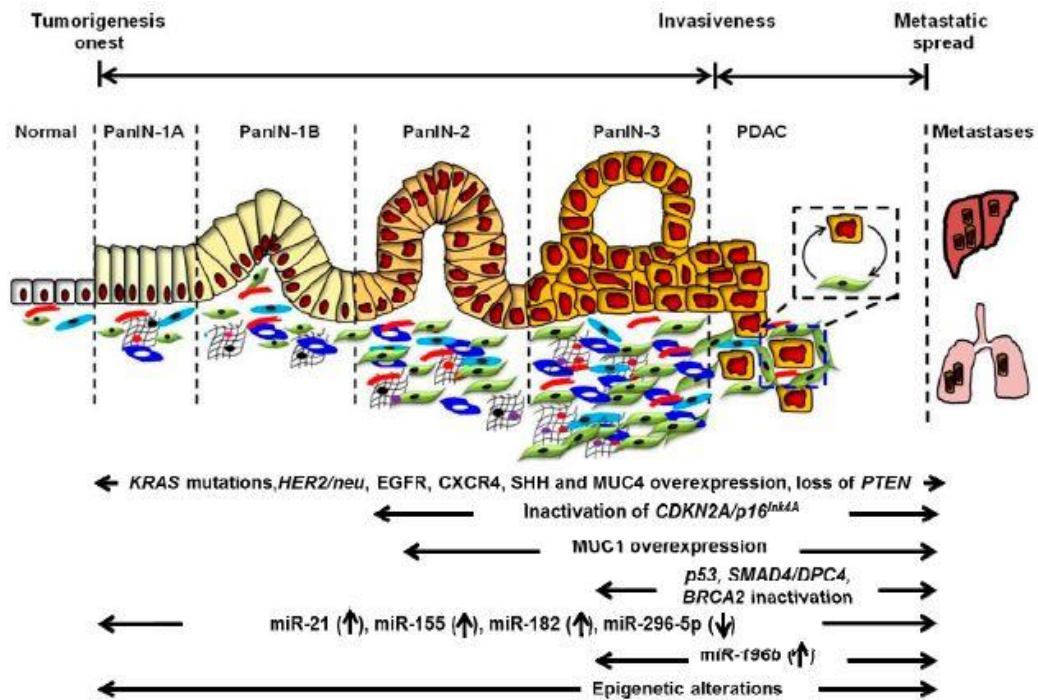


Figura 5. Cambios histopatológicos y moleculares en la patogénesis del adenocarcinoma pancreático (PDAC). Esquema detallado del desarrollo multi-pasos del PDAC. Durante la progresión, diversas alteraciones en genes clave son acumuladas. Además, se muestran miRNAs y alteraciones epigenéticas que contribuyen al desarrollo de un estado agresivo del cáncer (**Modificada**)¹⁵.

Mecanismos genéticos alterados en PDAC

El inicio y la progresión del cáncer de páncreas están asociados con la acumulación sucesiva de alteraciones en múltiples genes críticos para la tumorigénesis, principalmente la inactivación de genes supresores de tumor, la activación de oncogenes y genes involucrados en la reparación del daño al DNA, lo que conduce a la desregulación de diversas vías de señalización oncogénicas ¹⁵. Gracias al modelo de progresión del PDAC descrito por Hruban R. H. *et al.*, se sabe que existen alteraciones en ciertos genes que están fuertemente relacionados con el inicio y progresión de la enfermedad. Estos genes sufren mutaciones activadoras y silenciadoras con las cuales se favorece el fenotipo carcinogénico.

Algunos ejemplos de genes involucrados en el PDAC se describirán brevemente:

a. Activación de oncogenes

1. *K-RAS* oncogénico

Dentro de estos genes se encuentra el oncogén *K-RAS*, el cual es considerado uno de los genes más importantes en la iniciación del PDAC. Un evento temprano que ocurre en el PDAC es una mutación en el gen *K-RAS*, el cual codifica para una GTPasa del mismo nombre. Este gen es ampliamente estudiado en cáncer de páncreas a causa de la alta prevalencia de su mutación. Mutaciones en *KRAS* han sido detectadas en aproximadamente el 30% de los neoplasmas tempranos, con una tendencia al aumento en su frecuencia de hasta el 95% en PDAC avanzado ¹⁵.

Las mutaciones activadoras de *KRAS* se definen como mutaciones puntuales en el codón 12, que provocan un cambio del triplete GGT a GAT, resultando en la sustitución de un residuo de glicina (G) por ac. aspártico (D) (G12D), valina (GGT/GTT → G12V) o arginina (GGT/CGT → G12R). Dichas mutaciones en el codón 12 son las principales mutaciones que ocurren en este gen, en alrededor del 98% de los casos. Aunque también

ocurren mutaciones en los residuos 13 y 61 de esta proteína, las cuales representan el 2% de estas mutaciones.

Estas mutaciones son importantes para el inicio del PDAC, ya que el fenotipo de KRAS mutado da como resultado la activación constitutiva de su vía de señalización, activando la vía de las MAP cinasas y PI3K, lo que conduce a un incremento en la proliferación, supervivencia y migración celular, lo cual conlleva a un fenotipo oncogénico ¹⁵.

2. Protooncogén *c-MYC*

Es un importante regulador de múltiples funciones celulares, tanto en células normales como en cancerígenas. La alteración de este gen se ha visto que afecta la expresión de proteínas, facilitando la transformación celular, la progresión del ciclo celular, la troncalidad celular y el metabolismo celular. Sin embargo, la sola alteración en *c-MYC* no es suficiente para el desarrollo de tumores pancreáticos, por lo que se requiere que ocurra en sincronía con otras mutaciones, como la de *KRAS*, para incrementar la tumorigénesis. El gen que codifica para *c-MYC* se encuentra amplificado en 20-30% de los casos de PDAC ¹⁵. De tal forma, la sobreexpresión de *c-Myc*, que es un factor de transcripción, resulta en cambios en los niveles de expresión de familias de genes implicados en la proliferación celular. Por otro lado, la familia de factores transcripcionales NFAT se encuentran sobre expresadas en tumores pancreáticos, los cuales también son responsables de incrementar la expresión del gen *c-MYC*, lo que conduce al desarrollo de un fenotipo tumoral.

3. *PAK4*

Se ha reportado que el gen que codifica para la “Cinasa 4 activada por p21” (*PAK4*) se encuentra frecuentemente amplificado en el cáncer pancreático, lo que conduce a una sobre expresión del gen, promoviendo la proliferación y supervivencia de células de cáncer de páncreas, a través de la activación de la vía de señalización del “Factor nuclear-kappa B” (NF-

κB) dependiente de AKT y ERK. Así mismo, se sabe que PAK4 potencia la inducción de troncalidad, la resistencia a fármacos y la motilidad en células de PDAC ¹⁵.

4. Protooncogén *MYB*

Este gen codifica para el factor transcripcional MYB, que induce la expresión de múltiples genes, regulando así la proliferación, diferenciación y apoptosis. El gen se encuentra amplificado en aproximadamente el 10% de las muestras de tumor de pancreático, siendo predominante su expresión en tumores avanzados, mostrando una fuerte correlación con la progresión y las propiedades malignas. De manera similar a *c-MYC* y *PAK4*, *MYB* es sobreexpresado en la mayoría de los tejidos de pacientes con PDAC, así como en líneas celulares de cáncer pancreático. Finalmente, se le ha asociado un papel crítico en la histopatología de los tumores pancreáticos, ya que aquellos tumores que presentan una sobreexpresión de MYB exhiben una mayor desmoplasia, que se refiere al crecimiento del tejido fibroso y conectivo ¹⁵.

5. Oncogén *ERBB2*

Este gen que codifica para el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2), es un receptor transmembranal con actividad intrínseca de cinasa. Se encuentra envuelto en una amplia gama de funciones celulares, incluyendo el crecimiento celular, sobrevivencia y diferenciación. La amplificación de *ERBB2* se ha reportado en alrededor del 2% de los casos de PDAC, lo cual correlaciona con la metástasis a pulmón y/o cerebro ¹⁵.

b. Inactivación de genes supresores de tumores

1. *p16^{INK4A}*

El gen *p16* codifica para el Inhibidor 2A de la cinasa dependiente de ciclina, que participa en la regulación del ciclo celular. *p16* regula la progresión del ciclo celular mediante la unión a CDK4 y CDK6 para abatir

la interacción de estas con la ciclina D1, lo que previene la fosforilación activadora de la proteína de retinoblastoma (RB), e impide la entrada a la fase S del ciclo celular ¹⁶. Por lo tanto, la pérdida de función de p16 resulta en la progresión del ciclo celular de manera descontrolada, provocando un incremento en la proliferación celular.

La inactivación de p16 puede deberse a mutaciones o deleciones en el gen, la cual puede incidir de forma moderada desde lesiones PanIN tempranas a avanzadas (PanIN-IB) e ir incrementando su frecuencia de inactivación conforme las lesiones progresan a carcinomas invasivos ¹⁵. Esta se ha considerado como una mutación que repercute de forma significativa en el estado del PDAC, pues la pérdida de expresión de p16 ha sido observada en el 67% de las muestras clínicas que presentan invasión de nódulos linfáticos y metástasis. Como una estrategia terapéutica, se ha sugerido la restauración del gen para controlar e inhibir, de esta forma, el crecimiento tumoral pancreático.

2. Gen TP53

Codifica para la “Proteína tumoral p53”, que se encuentra mutada en alrededor del 50-75% de los pacientes con PDAC ¹⁵. Se ha demostrado que es una mutación intragénica, en combinación con la pérdida del segundo alelo, resulta en la inactivación del gen *TP53*. Tal inactivación conduce a la desregulación del ciclo celular en el punto de control G1/S y a la alteración en la inducción de apoptosis.

En PDAC la mutación de p53 ocurre generalmente en el dominio de unión a DNA. Esta mutación permite la progresión del ciclo celular, aún en presencia de daño al DNA, lo que conduce a la acumulación de más alteraciones genéticas. La inactivación de p53 ocurre en lesiones precursoras avanzadas (PanIN III), en las cuales hay presencia significativa de displasia celular. Por lo tanto, la pérdida de la función de p53 podría permitir el crecimiento y la supervivencia de las células con alteraciones carcinogénicas ⁹.

La alteración en el gen p53, acoplado a otras anomalías genéticas, da lugar a una morfología distinta de los tumores pancreáticos; por ejemplo, la delección de una copia del gen *APC* (Poliposis adenomatosa coli), un gen de desarrollo pancreático, junto con la delección de p53, inducen a un precursor distinto del PDAC, la “Neoplasia quística mucinosa” (MCN) ¹⁵. Por lo que entonces, la expresión de p53 mutante se considera esencial para el mantenimiento del fenotipo pro-metastásico.

3. Gen *SMAD4/DPC4*

El gen *SMAD4* codifica para la proteína que transduce señales extracelulares del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) al núcleo, actuando como un regulador transcripcional. *SMAD4* es un actor clave en la ruta de señalización de TGF- β , y activa la transcripción de factores inhibidores del ciclo celular, en particular p21 ¹⁷. Por lo tanto, la pérdida de *SMAD4* conduce a la disminución de la inhibición del crecimiento y a una proliferación incontrolada ¹⁸. Se ha reportado que la expresión *SMAD4* es normal en PanINs de bajo grado (PanIN-I y PanIN-II) y que la inactivación se produce en la etapa tardía, en el 31% de los PanIN-III ¹⁷. Del mismo modo, la expresión *SMAD4* es normal en adenomas e IPMNs limítrofes, produciéndose en tan sólo un 38% de los IPMC ¹⁸.

Se ha encontrado que en cáncer de páncreas puede ocurrir tanto la delección, como la mutación de *SMAD4*, causando un funcionamiento aberrante ¹⁵. En diferentes estudios se ha propuesto a *SMAD4* como un factor de pronóstico, pues se le ha correlacionado con la progresión tumoral, transición epitelio-mesénquima (EMT), fallo en la terapia y como consecuencia una baja supervivencia del paciente. Además, se cree que la restauración de *SMAD4* conduciría a la sensibilización de las células de PDAC a la quimioterapia.

4. Homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN)

Este gen codifica para una fosfatasa que regula negativamente la vía de PI3K-AKT-mTOR, la cual promueve el crecimiento celular y la supervivencia. En esta vía la cinasa PI3K fosforila al lípido de membrana PIP-2 (fosfoinositol-4,5 bifosfato) generando PIP-3 (fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato). Este lípido es capaz de reclutar a la serina-treonina cinasa AKT a la membrana plasmática, desencadenando una cascada intracelular que conduce a la activación de varios efectores como mTORc1, el cual impacta en el crecimiento celular. PTEN regula negativamente la vía al desfosforilar PIP-3, terminando de esta forma la señalización, por lo que la pérdida de PTEN lleva a la activación constitutiva de la cinasa AKT y sus efectores ¹⁵. Se ha evidenciado su delección o pérdida de expresión en cáncer de páncreas, que, junto con la presencia de KRAS mutante, induce la activación de NF-κB. Además, se le ha correlacionado con metástasis y reducción en la sobrevida general de pacientes con PDAC ¹⁵.

5. Genes *BRCA1/2*

Codifican para las *Breast cancer type 1/2 susceptibility protein* (BRCA1, BRCA2). Esta proteína participa en la regulación de la transcripción y reparación del DNA. Los individuos que portan mutaciones en dichos genes tienen, aproximadamente, entre 2.2 y 3.5 veces más riesgo de desarrollar PDAC. Se ha estudiado la frecuencia de afección de este gen y mientras que en lesiones PanIN de bajo grado (PanIN-I) aún podía observarse el gen activo, en lesiones PanIN de alto grado (PanIN-III) se reportó la inactivación o pérdida bialélica del gen ¹⁵. Aunado a la alteración directa de *BRCA2*, el producto del gen *PALB2* (*Partner and localizer of BRCA2*), que participa en la reparación del DNA dañado al estabilizar a BRCA2, también puede presentar mutaciones en cáncer pancreático familiar, resultando en un incremento de la acumulación del DNA dañado.

Mecanismos epigenéticos

Afortunadamente, con el conocimiento de la epigenética, se ha logrado una mayor comprensión de los mecanismos que favorecen la progresión del PDAC, y se han logrado proponer nuevas herramientas para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad ¹⁹.

Los mecanismos epigenéticos regulan el encendido y el apagado de los genes sin que se modifique la secuencia del DNA, los cuales son heredables y reversibles ²⁰.

Estos mecanismos epigenéticos ocurren tanto a nivel de DNA como a nivel de la cromatina y en conjunto constituyen el código epigenético que modula la expresión del genoma en diferentes tipos celulares, a través de etapas de desarrollo y en diversos estados de enfermedad, incluyendo el cáncer ²⁰. A continuación se describirán brevemente cada uno de estos mecanismos epigenéticos y se detallará cómo algunos de ellos participan en la biología del PDAC.

a. Metilación del DNA

La metilación del DNA corresponde al único mecanismo epigenético que ocurre directamente sobre el DNA. Fue la primera modificación epigenética en descubrirse, observada en los dinucleótidos CpG. La metilación puede ocurrir tanto en los promotores, así como a lo largo del cuerpo del gen. La forma más conocida de la metilación del DNA se lleva a cabo por la adición covalente de un grupo metilo (CH₃) en el C5 del anillo de la citosina, resultando en la formación de la 5-metilcitosina (5mC) ¹⁹. En este proceso, al igual que en otros mecanismos epigenéticos, también existen ciclos activos de metilación-desmetilación.

Cuando la metilación del DNA ocurre en promotores y elementos reguladores, esta tiene lugar principalmente en el surco mayor del DNA, el cuál es la principal región de reconocimiento por parte de maquinaria molecular que regula la expresión de genes, por lo que la metilación en las regiones

promotoras inhibe la transcripción de genes. Sin embargo, en el cuerpo del gen, la metilación del DNA se asocia con transcripción activa, el “*splicing*” y la elongación ¹⁹.

Las enzimas encargadas de llevar a cabo la metilación del DNA son las “DNA Metiltransferasas” (DNMT) y en mamíferos se han encontrado, funcionalmente activas, tres de ellas, conocidas como DNMT1, DNMT3a y DNMT3b ^{19 20}. La DNMT1 funciona como una metiltransferasa de mantenimiento y es la responsable de conservar el patrón de metilación durante la síntesis de la cadena complementaria del DNA. Mientras que la DNMT3a y DNMT3b participan en la metilación “*de novo*”, en particular durante la diferenciación y desarrollo celular. También se encuentra la DNMT3L (3-Like), la cual no tiene una actividad enzimática, pero funciona como compañera de las otras DNMTs estimulando la metilación ^{19 20}.

La metilación es un proceso reversible, por lo que existen desmetilasas que llevan a cabo este proceso y se les denomina “TET” (TET1, TET2 y TET3) ¹⁹.

Para que se lleve a cabo la reacción de metilación las DNMTs usan un aminoácido derivado de la metionina, llamado S-adenosilmetionina, como donador del grupo metilo. Debido al uso de este cofactor, y sus intermediarios, las reacciones de metilación están influenciados por el metabolismo y la ingesta nutricional, por lo que la alimentación influye indirectamente en la expresión génica ¹⁹. Esto es importante, en el caso del cáncer, porque se ha observado que en esta enfermedad los procesos metabólicos son aberrantes, lo cual se relaciona directamente con hiper- y/o hipometilación de distintas regiones del DNA.

De todos los mecanismos epigenéticos descritos, la metilación del DNA en el PDAC ha sido la más estudiada, pues la metilación aberrante del DNA ha sido reportada tanto en PDAC como en lesiones precursoras. Estas observaciones sugieren fuertemente que alteraciones en el proceso de metilación del DNA juegan un papel importante en la iniciación y propagación del PDAC.

Las alteraciones en el proceso de metilación del DNA se pueden dividir en, aquellas donde existe una metilación excesiva de las islas CpG presentes en las regiones promotoras (hipermetilación), y otras en donde la metilación de las regiones promotoras es deficiente (hipometilación). Por un lado, la hipermetilación se ha asociado con silenciamiento génico, principalmente en genes supresores de tumores, mientras que la hipometilación se asocia con una sobreexpresión génica, afectando en su mayor parte a oncogenes ²¹.

Un análisis de metilación global del genoma demostró que aproximadamente en el 60% de los casos de PDAC existe silenciamiento génico resultado de la hipermetilación en diferentes genes. Además, se ha considerado a la metilación aberrante como un evento temprano en el proceso carcinogénico, principalmente en lesiones precursoras del PDAC. Por ejemplo, el gen supresor *CDKN2A/p16* es inactivado por hipermetilación de su promotor en el 15% de los casos de PDAC, lo cual favorece la progresión de la enfermedad ²¹. Por otro lado, el gen *FOXA1/2*, asociado con la inhibición de la EMT, al regular positivamente la transcripción de E-cadherina. Se ha demostrado que *FOXA1/2* se encuentra silenciado en PDAC, por hipermetilación del promotor, lo cual favorece el fenotipo invasivo de la enfermedad ²².

También se ha detectado alteración en el patrón de metilación del DNA en lesiones precursoras. Por ejemplo, en IPMNs se ha identificado hipermetilación en el promotor de *CDKN1C/p57KIP2*, cuya función es regular negativamente la proliferación celular ²³. Además, la hipermetilación de *PENK*, un opioide endógeno, ha sido detectada en PanINs e IPMN, donde también se asocia con el silenciamiento de *CDKN2A/p16* ²². En PanIN-I se ha asociado la sobreexpresión de DNMT1 con el estado global de hipermetilación, por lo que entonces, todos estos resultados resaltan el importante papel que la hipermetilación juega en la progresión de las lesiones precursoras. Adicionalmente, ejemplos de hipometilación han sido reportados en los promotores de varios oncogenes en PDAC. Por ejemplo, ocurre una

hipometilación en la región promotora de la mucina 4 (MUC4) que conduce a su sobreexpresión, lo cual promueve el crecimiento y proliferación tumoral, así como la resistencia a apoptosis ²².

Todas estas evidencias, refuerzan el importante papel que la metilación del DNA (hipometilación e hipermetilación) tiene sobre el desarrollo del cáncer pancreático.

b. Modificación post-traducciona de nucleosomas (PTMs)

En lo que respecta a los mecanismos epigenéticos que ocurren a nivel de la cromatina, se encuentran las PTMs. Pero para comprender cómo la cromatina participa en estos mecanismos epigenéticos, necesitamos entender cómo se encuentra organizado el DNA en el núcleo.

Los nucleosomas están compuestos de 147 pares de bases de DNA que se organizan alrededor de un octámero de histonas, el cual está constituido por dos moléculas de cada histona (H2A, H2B, H3 y H4). Todas las histonas tienen un extremo amino terminal flexible que se extienden fuera de los nucleosomas. De esta forma, los extremos amino-terminal de las histonas se vuelven accesibles para sufrir una serie de PTMs tales como: acetilación, metilación, fosforilación, adenosín difosfato-ribosilación, ubiquitinación y sumoilación. La adición de estos grupos químicos a las regiones amino-terminal de las histonas, presentes en los nucleosomas, conducen a cambios en la compactación de la cromatina ¹⁹.

Las señales epigenéticas, conocidas como “marcas de histonas”, son modificaciones químicas covalentes y hasta la actualidad se han reconocido una gran diversidad de modificaciones. La combinación de todas estas marcas sirve como instrucción para regular la expresión génica. Estas PTMs pueden actuar individualmente o en combinación, e impactar en la transcripción de genes, en la inactivación del cromosoma X, en la formación de heterocromatina, en la mitosis y en la replicación y reparación del DNA.

Este concepto es fundamental porque apunta a la existencia de un código epigenético, un código de histonas, que es usado para interpretar instrucciones establecidas por las células. Sin embargo, cuando ocurren patrones aberrantes de las marcas de histonas esto conlleva al desarrollo de diversos tipos de cáncer ¹⁹.

Dos de las PTMs más estudiadas que ocurren en las histonas son la metilación y la acetilación, las cuales describiremos a continuación, así como su participación en el desarrollo del PDAC.

1. Metilación/Desmetilación de histonas

La metilación de las histonas es un proceso bifuncional, pues dependiendo del residuo que sea metilado este puede inducir la activación o silenciamiento transcripcional. Esta actividad enzimática es llevada a cabo por enzimas denominadas “Metiltransferasas de histonas” (HMT), las cuales actúan sobre residuos de lisina (K) y arginina (R), presentes en el extremo amino terminal de las histonas. Las “Lisinas Metiltransferasas de Histonas” (HKMT) funcionan por agregar uno, dos o tres grupos metilo (Mono-, Di-, Tri-metilación) al residuo de lisina. En el caso de la metilación de las argininas metiltransferasas (PRMT) se caracterizan por adicionar grupos metilo a las argininas y esta adición, normalmente, conduce a la activación transcripcional ²⁰.

En pacientes con cáncer pancreático se ha encontrado que las HMTs SMYD3, MLL5, EZH2, SETD5 y WHSC1L1 están sobreexpresadas, con respecto a individuos sanos, por lo que se sugiere que propician un fenotipo cancerígeno al inducir la desregulación transcripcional ¹⁹.

La metilación, como ya se mencionó, es también un importante componente del código de histonas, una de las enzimas que realiza esta PTM es la subunidad catalítica EZH2 del complejo represivo polycomb (PRC2), la cual se encuentra sobreexpresada en el PDAC. De manera normal el complejo PRC2 realiza la metilación de la histona H3 en la lisina

K27 localizada en las regiones promotoras, subsecuentemente la marca depositada (H3K27) por PRC2 recluta al complejo PRC1, completando el silenciamiento transcripcional.

La sobreexpresión de EZH2 en PDAC conduce al silenciamiento de genes supresores de tumores como la E-cadherina, CDK1C, BRCA1 y CDKN2A. Por lo que en el caso del gen *p16/CDKN2A* es regulado no sólo por metilación del DNA en su región promotora, sino también por la metilación de las histonas H3 de los nucleosomas que están presentes en su región promotora ^{7 24}. Adicionalmente, se ha reportado que en PDAC hay una relación directa entre los elevados niveles de EZH2 y la pobre diferenciación de las células tumorales ¹⁹.

Al igual que la metilación del DNA la metilación de las histonas también es reversible, por lo que las enzimas que remueven grupos metilo se denominan “Desmetilasas de histonas” (HDM). Un ejemplo de estos son KDM2B y LSD1. En el caso de PDAC se ha observado que la sobreexpresión de estas HDM contribuye al desarrollo del cáncer pancreático. Mientras que, la pérdida de la expresión de KDM6B se asocia con la agresividad del PDAC ¹⁹. También, en el PDAC se ha encontrado que bajos niveles de marcas epigenéticas como la lisina 4 di-metilada de la histona H3 (H3K4me2), así como la reducción de la di-metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2), son predictores de una pobre supervivencia en paciente con PDAC ¹⁹.

2. Acetilación/Desacetilación de histonas

La acetilación de lisinas es llevada a cabo por las “Acetiltransferasas de histonas” (HATs), las cuales transfieren un grupo acetilo proveniente de una molécula de acetil-CoA hacia las lisinas (K) presentes en el extremo amino de las histonas, de manera histona y residuo específico. La acetilación de las histonas se encuentra relacionada directamente con la activación transcripcional y la formación de eucromatina ²⁰. Se cree que la acetilación de los residuos de lisina neutraliza la carga positiva de las

histonas, reduciendo de esta forma la afinidad entre las histonas y el DNA, lo cual permite una mayor accesibilidad de los factores de transcripción.

La actividad antagonista a las HATs la realizan las “Desacetilasas de histonas” (HDAC) que, como su nombre lo dice, eliminan los grupos acetilo de los residuos de lisina. Su eliminación conduce a que se restaure la carga positiva de las histonas y se reestablezca la interacción del nucleosoma con el DNA, reprimiendo de este modo la transcripción, lo que nuevamente genera una cromatina cerrada transcripcionalmente inactiva (Heterocromatina) ²⁰.

Las HDAC fueron la primera clase de enzimas modificadora de histonas que se encontraron desreguladas en el PDAC, principalmente las HDACs de la clase I como HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, las cuales están sobreexpresadas. Para el caso de las HDAC1 y HDAC2 se ha establecido que sus niveles elevados conducen a un tumor poco diferenciado, con respecto al tejido normal, disminuyendo así la supervivencia de los pacientes. Por otra parte, se ha encontrado que la HDAC7 se encuentra incrementada en muestras de pacientes con PDAC y que HDAC7 tiene niveles bajos en pancreatitis crónica, en cistadenoma seroso y en tumores papilares mucinosos intraductales. Por lo que entonces, los niveles elevados de la HDAC7 permiten discriminar al PDAC de otras enfermedades pancreáticas ¹⁹.

Además, se ha demostrado que el silenciamiento de la E-cadherina en el PDAC se debe a que al promotor de este gen se le une un complejo represor, constituido por EMT-Snal y dos HDACs (HDAC1 y HDAC3). La unión de este complejo represor conduce al silenciamiento de la E-cadherina en el PDAC, lo que conlleva a la EMT.

c. RNAs no codificantes (ncRNAs)

A parte de la acetilación y metilación de las histonas, los RNA no codificantes (ncRNAs) juegan un papel importante en regular la expresión génica.

El RNA se considera como el mensajero entre el gen y la proteína codificada por este gen. Algunos años atrás, se encontró que la minoría de los RNAs transcritos, (solamente el 2%), codificaban para proteínas, y que el 98% al no producir proteínas se consideró como “RNA basura”. Ahora se sabe que este RNA basura da origen a transcritos que no codifican para proteínas, por lo que estos son denominados “RNA no codificantes” (ncRNAs), los cuales tienen una participación muy importante en regular la expresión de genes a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Con base al tamaño del transcrito, los ncRNAs pueden dividirse en 2 clases principales: Los ncRNAs pequeños, con un tamaño menor a 200nt (por ejemplo, microRNAs, siRNAs o piRNAs) y los ncRNAs largos, con tamaño mayor a 200nt (por ejemplo, ncRNAs intergénicos o intrónicos largos, pseudogenes o regiones ultraconservadas transcritas).

1. RNAs cortos no codificantes

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de cadena sencilla, con una longitud de 20-25nt. Estos son generados como pre-miRNAs, por la RNA Pol II, los cuales se caracterizan por tener una estructura de “tallo-asa”¹⁹. Los pre-miRNAs son procesados dentro del núcleo por el complejo Drosha-DGCR8. Posteriormente, este precursor se transporta al citoplasma por acción de la exportina XPO5, donde es procesada por el complejo DICER-AGO2-TRBP, resultando en miRNAs maduros, los cuales se acoplan al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), el cual lleva a cabo los mecanismos de regulación. El miRNA va a hibridar de forma complementaria a su mRNA blanco, a través de su extremo 3' UTR. Si la complementariedad es completa, se induce la escisión del mRNA. Sin

embargo, si la complementariedad es incompleta, sólo ocurre el secuestro del mRNA ¹⁹.

De todos los RNA cortos no codificantes, los miRNAs han capturado la atención, ya que regulan aproximadamente el 30% del genoma que codifica para proteínas, incluyendo procesos celulares importantes tales como: el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis.

Estos miRNAs pueden funcionar en las células cancerosas como supresores de tumores o como oncogenes, o en algunos casos como ambos, teniendo la capacidad de reprogramar las vías moleculares en el cáncer.

A través de líneas celulares de PDAC, muestras de tejido y sangre de pacientes con cáncer pancreático se han evaluado los perfiles de miRNAs y se compararon con muestras de individuos sanos y pacientes con pancreatitis crónica, buscando determinar una firma de expresión de miRNAs específica del PDAC. Dicho análisis reveló una firma de 7 miRNAs que están sobreexpresados (miR-155, miR-196, miR-21, miR-221, miR-31, miR-143, miR-23a) y 3 miRNAs disminuidos (miR-217, miR-148a, miR-375) en PDAC ^{19 20}. Además, se encontró que alteraciones en los niveles de miRNAs puede modular la quimio- y/o radio-sensibilidad de células de PDAC.

Los miRNAs no solo se encuentran implicados en la tumorigénesis pancreática, sino también juegan un papel importante en el proceso de metástasis. En este sentido, se ha reportado la sobreexpresión de un grupo de miRNAs dirigidos a EP300, una HAT, tales como: el miR-194, miR-200b, miR-200c y miR-429, en PDAC invasivo comparado con PDAC no invasivo ²⁵. También se ha observado que la sobreexpresión de los miR-224 y miR-486 promueve la metástasis en PDAC, al dirigirse específicamente al transcrito de CD40, una molécula importante para la respuesta inmune antitumoral.

Por otro lado, se han reportado miRNAs con función antimetastásica en PDAC, por ejemplo, la expresión ectópica del miR-146a inhibe la capacidad invasora de las células de cáncer de páncreas, por regulación negativa del EGFR y de IRAK1 ²⁵. El miR-96 se ha considerado un potencial supresor de tumores, debido que se dirige específicamente a K-RAS. En PDAC, miR-96 se encuentra silenciado en comparación con tejidos normales y su expresión ectópica logra inducir apoptosis e inhibición de la proliferación, de la migración e invasión de las células cancerosas. Por su parte, los miembros de la familia miR-200 también se consideran posibles supresores de tumores ²⁵. El miR-200 dirige el silenciamiento de ZEB1/2 (regulador negativo de la expresión de E-cadherina), reduciendo el potencial de EMT ²⁵.

También existe asociación entre algunos miRNAs y la resistencia a la quimioterapia. Por ejemplo, el miR-21 se encuentra sobreexpresado en PDAC con mal pronóstico. Es encontrado en células cancerosas presentes después de la quimioterapia con Gemcitabina. En líneas celulares con expresión ectópica del miR-21 se observa un incremento en la proliferación e invasión celular, así como la inhibición de PTEN, de PDCD4 e inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y de las metaloproteasas de matriz 2 y 9 ²⁵.

2. RNAs no codificantes largos (lncRNAs)

Los RNAs no codificantes largos tienen un tamaño mayor a 200 nt de longitud y sufren *splicing* y poli-adenilación. Un subgrupo de estos lncRNA es los “RNAs largos no codificantes intergénicos” (lincRNAs), los cuales participan en el silenciamiento de genes, como es el caso de la inactivación de uno de los dos cromosomas X en mujeres ¹⁶.

Los lncRNAs regulan la expresión de genes a través de 5 distintos mecanismos ¹⁹:

1. **Señal:** Funcionan como señales moleculares de la actividad transcripcional. Permiten obtener información celular espaciotemporal, del desarrollo y específica de estímulo, dependiendo de la activación transcripcional de genes específicos.
2. **Señuelo:** Unen y elimina otros RNAs o proteínas reguladoras, ya que pueden secuestrar a distintas proteínas: Factores de transcripción, proteínas del “*splicing*”, modificadores de la cromatina; formando así complejos de ribonucleoproteínas, evitando de esta forma el acceso de dichas proteínas a su gen blanco.
3. **Guía:** Conducen complejos ribonucleoproteicos hacia sus genes blancos, de manera específica, para que lleven a cabo su función, ya sea la activación o la represión. De igual forma, también pueden conducir a complejos modificadores de la cromatina.
4. **Andamio:** Al proveer una plataforma estructural para el ensamblaje de proteínas y/o componentes de RNA.
5. **Potenciador:** RNAs de longitud promedio de 800 nt, con aparente capacidad de activadores transcripcionales.

Un ejemplo de cómo estos lncRNAs participan en el PDAC es la expresión de HOTAIR, un lncRNA que se asocia con el complejo represivo Polycomb 2 y cuya sobre expresión correlaciona con una pobre sobrevivencia de diversos tipos de cáncer. HOTAIR fue encontrado sobreexpresado en tumores pancreáticos., en especial en los más agresivos, ya que el “*knock down*” de HOTAIR resulta en una disminución en la proliferación celular y en la progresión alterada del ciclo celular, aumento de la apoptosis inducida y una reducida invasión celular ¹⁹.

A partir de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) se ha sugerido a LINC00673 como un potencial lncRNA supresor de tumor, ya que se encuentra disminuido en muestras de PDAC, con respecto a muestras de tejido sano. Del mismo modo, se sugirió a H19 como un lncRNA con actividad oncogénica, al estar

sobreexpresado en PDAC y presentar una asociación con el grado del tumor y metástasis. Como conclusión de dichos estudios, se propusieron 4 lncRNA como posibles marcadores de cáncer pancreático: HOTAIR, HOTTIP y PVT1 que se encontraban con niveles significativamente incrementados durante el PDAC; mientras que Linc-pint, un lncRNA inducido por p53, era menos abundante en tejido y plasma de pacientes con PDAC, en comparación con pacientes sanos y aquellos que presentaban otros tipos de carcinomas ²⁰.

De manera similar, la sobre expresión de los lncRNAs oncogénicos MALAT1, HULC y PVT1 ha sido asociada con una pobre expectativa en sujetos con PDAC ²⁶. Por otro lado, pacientes con elevados niveles de BC008363 presentaron una mayor supervivencia; así como con el lncRNA ENST00000480739 que se identificó como un supresor de invasión tumoral a partir de la regulación del factor inducible por hipoxia 1 α ¹⁹.

d. Maquinaria de remodelamiento de la cromatina

Al contrario de lo que se había pensado durante años, la cromatina es una estructura enormemente dinámica. Una extensa familia de complejos multiproteicos capaces de alterar las interacciones entre el DNA y las histonas, donde dicha maquinaria requiere de ATP como fuente de energía ²⁷. La función de estos complejos consiste en: a) desplazar nucleosomas a lo largo del DNA, b) reposicionar los nucleosomas en la misma hebra (*cis*) o en una hebra de DNA diferentes (*trans*) o c) intercambiar histonas canónicas por variantes de histonas ²⁷. Y es a través de estos tres mecanismos, que los complejos remodeladores de la cromatina permiten que regiones de DNA queden accesibles y recluten factores de transcripción que conllevarán o no a la transcripción del gen en cuestión.

Los complejos remodeladores de la cromatina han sido clasificados en 4 grupos, de acuerdo a la subunidad de ATPasa que poseen y estos son ¹⁹:

1. SWI/SNF, también conocida como SNF2

2. ISWI
3. INO80
4. NuRD/Mi2/CHD

Si bien, todos estos complejos participan activamente en la modificación de la arquitectura de la cromatina, solamente se ha demostrado la participación del complejo SWI/SNF en el desarrollo del cáncer.

El complejo SWI/SNF se caracteriza por activar la expresión de genes, como resultados de su capacidad de remodelar la cromatina. Una de las subunidades del complejo SWI/SNF de levaduras, denominada *Snf2/Swi2*, es una ATPasa que constituye el núcleo catalítico del complejo ¹⁹. Dos miembros principales de esta familia en humanos son BAF y PBAF, los cuales están compuestos de 12-15 subunidades que constituyen a un complejo de ~ 2 MDa ^{20 28}.

El complejo SWI/SNF usa la energía de la hidrólisis del ATP para desestabilizar las interacciones entre el DNA y el octámero de histonas para remodelar la cromatina a través de la movilización de los nucleosomas por diferentes mecanismos: 1. Deslizándolo a lo largo de la cromatina, 2. Cambiando la composición de histonas del octámero (integración de variantes de histonas), 3. Retirando y/o insertando (Reposicionamiento) el octámero de histonas en nuevos sitios de la cromatina y 4. A través de la pérdida parcial (H2A-H2B) o total del octámero (**Figura 6**) ²⁷. Como consecuencia de su actividad, los complejos remodeladores de la cromatina permiten la regulación de la transcripción génica al crear una cromatina menos compacta donde pueden interactuar los factores de transcripción con el DNA, ya que existen evidencias de que el complejo SWI/SNF tiene como blanco a los nucleosomas presentes en los promotores y *enhancers*.

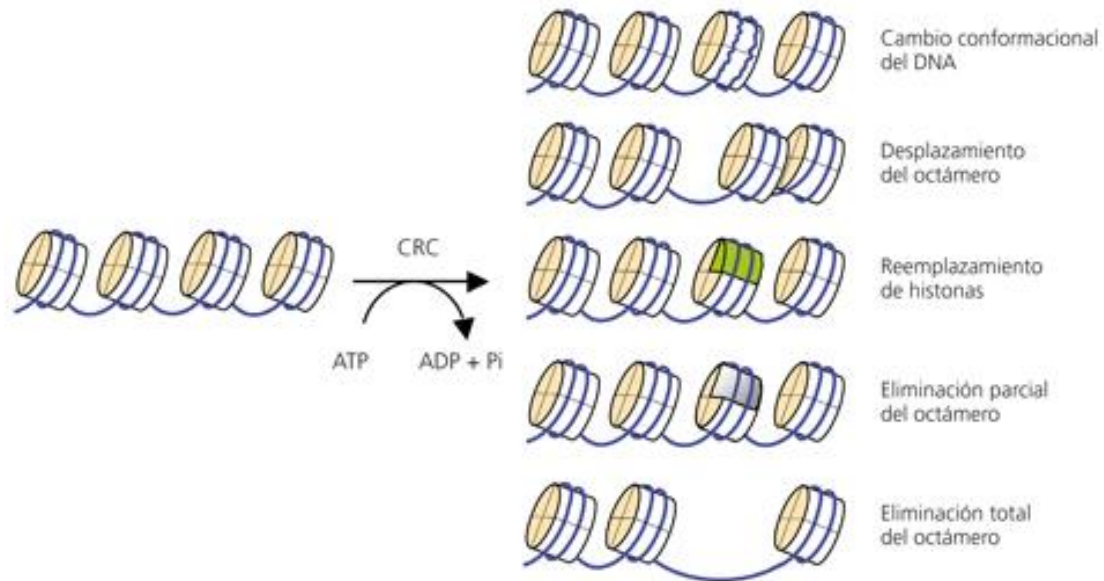


Figura 6. Actividades realizadas por el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (SNF2) ²⁷.

Además del dominio central de ATPasa, las proteínas de la familia SNF2 presentan otros dominios como: “*Chromo*”, “*Bromo*”, “*Sant*”, motivos “*AT-hook*”, etc. Estos son dominios de interacción con las histonas o con las PTMs presentes en las histonas, así como de interacción con el DNA y es a través de estos dominios que se regula la actividad del complejo SWI/SNF. Por ejemplo, en ausencia de histonas, los dominios chromo interaccionan con el dominio de ATPasa, impidiendo su asociación con el DNA y la hidrólisis del ATP. En presencia de histonas, la interacción del dominio chromo con el extremo amino terminal de la histona H4 libera el dominio catalítico, activando la enzima. De esta manera se evita la hidrólisis de ATP en ausencia del sustrato ²⁷.

Existen evidencias de que en diferentes tipos de cáncer ocurren mutaciones en algunas de las subunidades que constituyen al complejo SWI/SNF ^{19 28}.

En el cáncer pancreático, el promedio de mutaciones que ocurren en el complejo SWI/SNF es cercano al 20%, y se han reportado mutaciones en

diversos componentes del complejo, tales como: ARID1A, ARID1B y PBRM1 (Subunidades de unión a DNA); SMARCA2, SMARCA4, SMARCB1 (Subunidades enzimáticas) ^{19 28}. Al complejo SWI/SNF se le asocia una función de supresor de tumores, sugiriendo que de forma normal permite la transcripción de genes reguladores del ciclo celular y supresores de tumores, mientras que promueve el silenciamiento de oncogenes, todo ello al propiciar el reposicionamiento de los nucleosomas en las regiones reguladoras de los genes ²⁰.

e. Variantes de histonas

El último de los mecanismos que se encuentra asociado con los nucleosomas, y por ende con la cromatina, es la integración de variantes de histonas. Como ya se explicó, existen histonas canónicas que interactúan para formar el octámero de histonas sobre el cuál se van a enrollar 147 pares de bases de DNA para formar el nucleosoma, que es la unidad básica de la cromatina.

Las histonas canónicas H2A, H2B y H3, cuentan con distintas variantes que difieren en un número limitado de aminoácidos en su secuencia. Sin embargo, estas diferencias son suficientes para que alteren la estructura, estabilidad y dinámica del nucleosoma. **(Figura 7)** ²⁹. Además, que las variantes de histonas pueden reemplazar a las histonas canónicas en dominios específicos de la cromatina para llevar a cabo funciones específicas, tales como: regular la transcripción, inducir la formación de hetero- o eucromatina, promover la segregación de los cromosomas y propiciar la reparación del DNA ³⁰.

En organismos eucariontes, la deposición de las histonas canónicas está acoplada a la síntesis del DNA. En cambio, la incorporación de las variantes de histonas al DNA puede ocurrir a lo largo de todo el ciclo celular e independientemente de la replicación del DNA ³⁰.

El reemplazo de histonas canónicas por las variantes de histonas altera la composición y distribución de los nucleosomas y las proteínas de unión al DNA, lo cual influye directamente en el panorama de la cromatina ³⁰. Estos cambios permiten agregar un nuevo nivel de regulación a nivel de la cromatina.

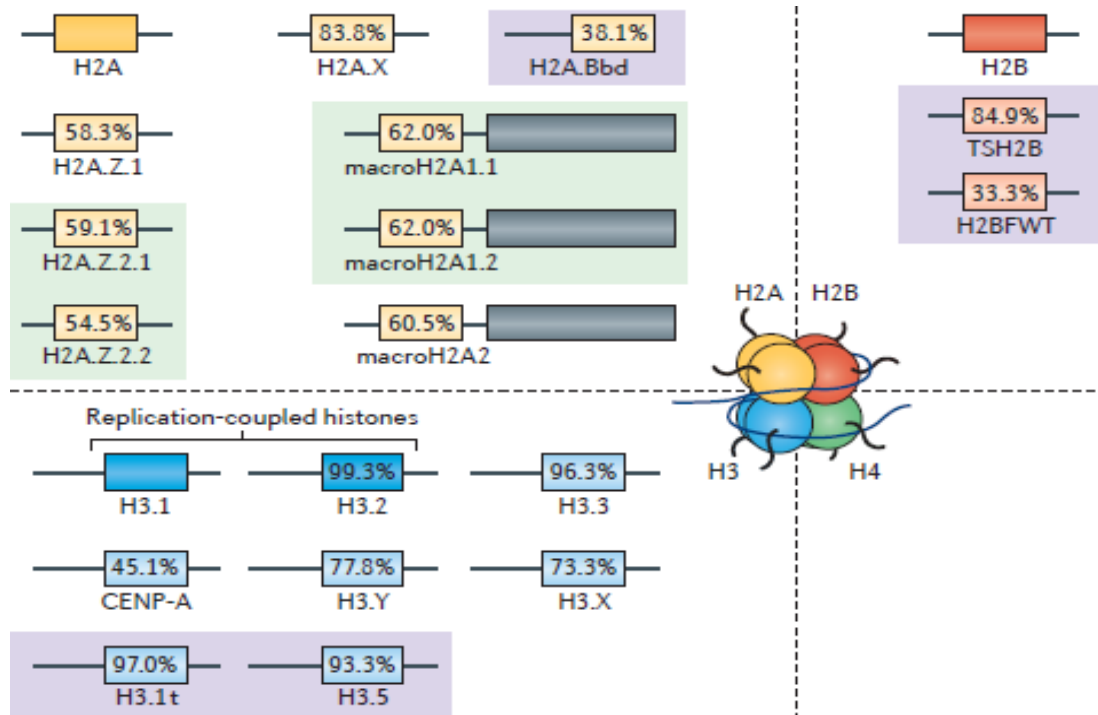


Figura 7. Variantes de las histonas canónicas humanas. Representación de las variantes de histonas H2A, H2B y H3. No se han encontrado variantes para la histona H4 en humanos. Variantes específicas de testículos resaltadas en morado, e isoformas producidas por *splicing* alternativo en verde claro. El porcentaje indica la identidad de la secuencia de aminoácidos entre la secuencia de la histona canónica de la histona H2A, H2B y H3 y sus variantes ²⁹.

En algunas ocasiones el impacto del intercambio de una histona canónica por una variante de histona puede ser muy profundo. Un ejemplo de esto es la incorporación de la variante H3 centromérica (CENP-A) que propicia la formación de los centrómeros del cromosoma. En otros casos, el cambio puede ser sutil; por ejemplo, el remplazo por la variante H3.3, que es muy similar a la histona canónica y tiene un papel importante en la reparación del DNA y en la activación transcripcional. Otros ejemplos pueden ser las

variantes de la histona H2A, que particularmente influyen en la expresión de genes: H2A.Z y H2A.B implicadas en el inicio de la transcripción, mientras que macroH2A puede ser asociada con la inmovilidad de los nucleosomas y el silenciamiento transcripcional. También se puede mencionar a la variante H2A.X, asociada a regiones del DNA donde han ocurrido rupturas de doble cadena, que al ser fosforilada específicamente en la serina 139 (γ H2A.X) (**Figura 7**), permite el reclutamiento de la maquinaria de reparación del DNA ³⁰.

Por su parte, la variante H2A.Z ha sido asociada a la regulación transcripcional, memoria epigenética, estabilidad del genoma, segregación de cromosomas y formación de límites o fronteras. ³¹.

Por lo que entonces, la función desregulada de las variantes de histonas puede contribuir al desarrollo de la carcinogénesis, por lo que se ha tratado de encontrarles un papel potencial como biomarcadores. Por ejemplo, en el cáncer de mama, vejiga, hepatocarcinoma y melanoma se ha encontrado que la sobreexpresión de H2AZ conduce al desarrollo de todos estos tipos de cánceres. Por lo que a continuación ahondaremos más en esta variante de histonas y como participa en el desarrollo de diferentes tipos de canceres ³².

Histona H2A.Z y sus funciones

La histona H2A.Z representa, aproximadamente, el 5-15% del total de las variantes de histonas de la histona canónica H2A. De todas las variantes de la histona H2A, H2A.Z es una de las más conservadas, ya que posee un 60% de homología con la histona canónica H2A (**Figura 7**). Esta variante de histona ha despertado un gran interés, ya que se le ha encontrado particularmente presente en fracciones transcripcionalmente activas de la cromatina, asociándola así con la transcripción de genes constitutivos o en estados embriogénicos con capacidad celular pluripotencial ³³.

El intercambio de la histona H2A por la variante H2A.Z es realizado por complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, tales como: *Snf2-Related CREBP activator* (SRCAP) y el complejo p400/Tip60 ^{35 37}.

Sin embargo, no se le puede atribuir directamente a H2A.Z el papel de activador de la transcripción, ya que en múltiples estudios se ha visto que para que H2A.Z active la transcripción de un gen requiere que el nucleosoma también contenga a la variante H3.3³⁴. Se cree que el mecanismo de acción de ambas variantes en un mismo nucleosoma conduce a la desestabilización del nucleosoma, haciendo accesible la secuencia del DNA asociada a estos nucleosomas, lo que permite que se unan los factores de transcripción y se inicie la transcripción del gen.

También se ha visto que H2A.Z se encuentra enriquecida en las regiones ocupadas por las proteínas de unión a “*Insulators*” (CTCF). De este modo, H2A.Z contribuye a la prevención de la extensión de la heterocromatina (actividad de barrera), lo que permite delimitar los sitios donde se mantendrá una transcripción activa³⁴.

Finalmente, se ha encontrado que, en varios tipos de cáncer, la sobreexpresión de la variante de histona H2A.Z modifica el perfil transcripcional de genes asociados al ciclo celular, la proliferación, oncogenes y genes supresores de tumores³². Por lo que a continuación ahondaremos un poco más acerca de todas las isoformas que tiene esta variante de histona y su participación en el desarrollo del PDAC.

Isoformas de la variante de histona H2A.Z

Hasta el momento, se ha identificado la presencia de dos isoformas no alélicas de la proteína H2A.Z, la *H2AFZ* (también denominada H2A.Z.1) y la *H2AFV* (conocida como H2A.Z.2), las cuales sólo difieren entre sí en tres residuos de su secuencia peptídica. Sin embargo, a pesar de esta ligera variación, se considera que estas isoformas surgieron a partir de un evento de duplicación durante la evolución de los vertebrados y que se han sometido a eventos de diferenciación, por lo que no presentan un papel redundante y compensatorio en el funcionamiento celular. A pesar de esto, se ha identificado una distribución idéntica dentro de la eucromatina³⁴.

Por otro lado, análisis de niveles de transcripción de ambas isoformas han establecido que no existe una forma dominante, ya que ambas se expresan en una amplia variedad de tejidos humanos, presentándose una ligera variación en sus niveles de expresión dependiendo de la etapa de desarrollo. Por ejemplo, hay mayor expresión de ambas isoformas en tejido hepático durante la etapa fetal, con una consecuente disminución durante la etapa adulta. Así mismo, hay una mayor expresión de la isoforma H2A.Z.1 en tejido de cerebro, mientras que la isoforma H2A.Z.2 se encuentra sobreexpresada en tejido pancreático. Estos patrones de expresión probablemente reflejan una variación en la composición de sus regiones promotoras de H2A.Z.1 y H2AZ.2, que podrían explicar esta expresión temporal y tejido específica ³⁴.

En los últimos años, se ha identificado una nueva variante de la isoforma H2A.Z.2, generada a partir del *splicing* alternativo del gen que codifica para la histona H2A.Z.2, para dar origen a dos formas: la H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2. El mRNA de Z.2.2 está expresado en diferentes grados en distintas líneas celulares humanas, aunque su mayor nivel de expresión se encontró en el cerebro. La isoforma H2A.Z.2.2 se encuentra dispersa en el núcleo y sólo una pequeña parte se encuentra incorporada a la cromatina. Esto puede deberse a que al producirse el *splicing* alternativo se altera el sitio de interacción que posee la histona H2A.Z.2 con la histona H2B, lo que genera nucleosomas mucho más inestables ³⁷.

La mayor variación entre la isoforma H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2 se ubica en el extremo C-terminal de ambas proteínas como consecuencia del *splicing* alternativo ³⁸. Lo que ha llevado a pensar que las diferencias en estructura y función biológica se atribuyen a este dominio (**Figura 8**). A pesar del avance en el conocimiento de las formas de la histona H2A.Z.2, aún no se logra establecer cuál de las dos (si H2A.Z.2.1 o H2A.Z.2.2) es la que juega el papel más importante en el desarrollo del cáncer.



Figura 8. Alineamiento de las isoformas de la variante de histona H2A.Z. Secuencia de aminoácidos de la variante de histona H2A.Z de humano. Alineamiento de las isoformas H2A.Z.1 con H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2. Las α -hélices están indicadas debajo de la secuencia en recuadros blancos. Las isoformas H2A.Z.1 y H2A.Z.2.1 difieren en tres aminoácidos (Encerrados en rojo). La isoforma H2A.Z.2.2 presenta una deleción de 14aa en el extremo amino-terminal y cuenta con seis residuos diferentes ³⁸.

H2A.Z y su asociación al cáncer

En cuanto a su asociación con el cáncer, se ha demostrado que H2A.Z se encuentra incrementada en cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de vejiga, donde en algunos casos, se le ha encontrado que participa en promover la proliferación celular ³².

En un estudio de cohortes de pacientes con hepatocarcinoma, se encontró que solamente la isoforma H2A.Z.1 estaba sobreexpresada, no así en muestras hepáticas no-cancerosas. Se demostró que el incremento en los niveles de H2A.Z.1 promueve la expresión de CDK4, CDK6, la ciclina D1, CDK2 y suprime, simultáneamente, a los moduladores del ciclo celular p21 y p27, lo que conduce a que se pierda el punto de control de la fase G1 a S, lo que conlleva a la proliferación celular de manera descontrolada ³⁵.

Finalmente, se estableció que la sobreexpresión de la isoforma H2A.Z.1 promueve un aumento en los niveles de fibronectina y disminuye la expresión

de E-cadherina, lo que le proporciona a las células cancerígenas una mayor motilidad, invasividad y propicia la EMT ³⁵.

Por otra parte, se ha demostrado que ambas isoformas de la histona H2A.Z están altamente expresadas en melanoma, que es la forma más letal del cáncer de piel. En contraste al hepatocarcinoma, en el melanoma se demostró que H2A.Z.2 es la isoforma que participa más activamente en el desarrollo de este tipo de cáncer, pues se observó que BRD2 (miembro de la familia de las proteínas BET) interacciona a través de su bromodominio con los residuos de lisina acetilados de la histona H2A.Z.2 ³⁶. Una vez que se ha establecido la interacción BRD2-H2A.Z.2, BRD2 recluta a factores transcripcionales, como E2F, que inducen la expresión de la ciclina E, la ciclina A y otros genes que propician la proliferación celular, regulando de esta forma la expresión transcripcional de genes blanco de E2F (**Figura 8**). Para validar que el mecanismo es dependiente de H2A.Z.2, se usó un inhibidor de proteínas BET, que interrumpe esta interacción proteica, lo que condujo al arresto de la progresión del ciclo G1/S, fomentó la muerte por apoptosis y se sensibilizó a las células de melanoma a la quimioterapia (**Figura 9**) ³⁶.

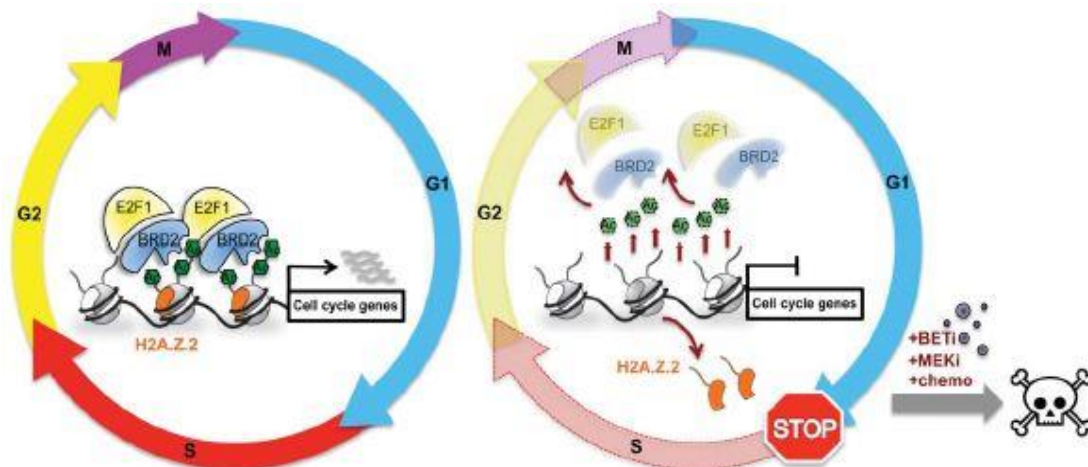


Figura 9. Modelo del funcionamiento de H2A.Z.2-BRD2-E2F1 en células de melanoma. H2A.Z.2 estabiliza la acetilación de las histonas, facilitando el reclutamiento de BRD2 y E2F1. En tumor, promueve la expresión de genes reguladores del ciclo celular y la progresión ³⁶.

Antecedentes directos

En el caso del PDAC se ha encontrado que la metilación del DNA, PTMs de las histonas y microRNAs se encuentran alterados en este tipo de cáncer, pero se desconocía si las variantes de histonas también influían en el desarrollo de esta enfermedad. Por lo que, en nuestro laboratorio, se dieron a la tarea de identificar si existía un patrón de expresión alterado en dos variantes de histonas (H2A.X y H2A.Z). De estas 2 variantes se encontró un incremento en los niveles de la variante H2A.Z en tres líneas celulares de cáncer de páncreas (Capan-1, BxPC-3 y PANC-1), con respecto a la línea control de páncreas no transformado (hTERT-HPNE) (**Figura 10A, 10B**), no así para la variante H2A.X. Esto permitió crear la hipótesis de que la variante H2A.Z podría participar en la biología del PDAC al alterar la transcripción de genes implicados en la proliferación celular, la tumorigénesis y la quimio-resistencia ³⁹.

Adicionalmente, se estudió la sobreexpresión de la variante de histona H2A.Z y su relación con la tumorigénesis en PDAC, al analizar inmunohistoquímicamente 57 biopsias de pacientes con PDAC y 17 muestras de páncreas normal, encontrando que los niveles de H2A.Z son hasta 3 veces más altos en las biopsias de pacientes con PDAC. Además de ser específica de PDAC, ya que, en muestras de pacientes con diabetes, pancreatitis (Aguda o crónica) u otro tipo de cáncer de páncreas diferentes al PDAC los niveles de H2A.Z son cercanos a los respectivos de las biopsias control ³⁹.

Finalmente, para averiguar cuál de las 3 isoformas de H2A.Z se encontraba alterada en PDAC se analizaron los niveles de transcripción de las tres variantes: H2A.Z.1, H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2, por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y Capan-1. Los resultados mostraron una clara sobreexpresión de las tres variantes, normalizadas con base en la línea celular de páncreas no transformada (hTERT-HPNE) (**Figura 10C**) ³⁹. Este hallazgo resultó ser sumamente interesante, ya que es la primera vez que se reporta la sobreexpresión de las tres isoformas para cualquier tipo de cáncer.

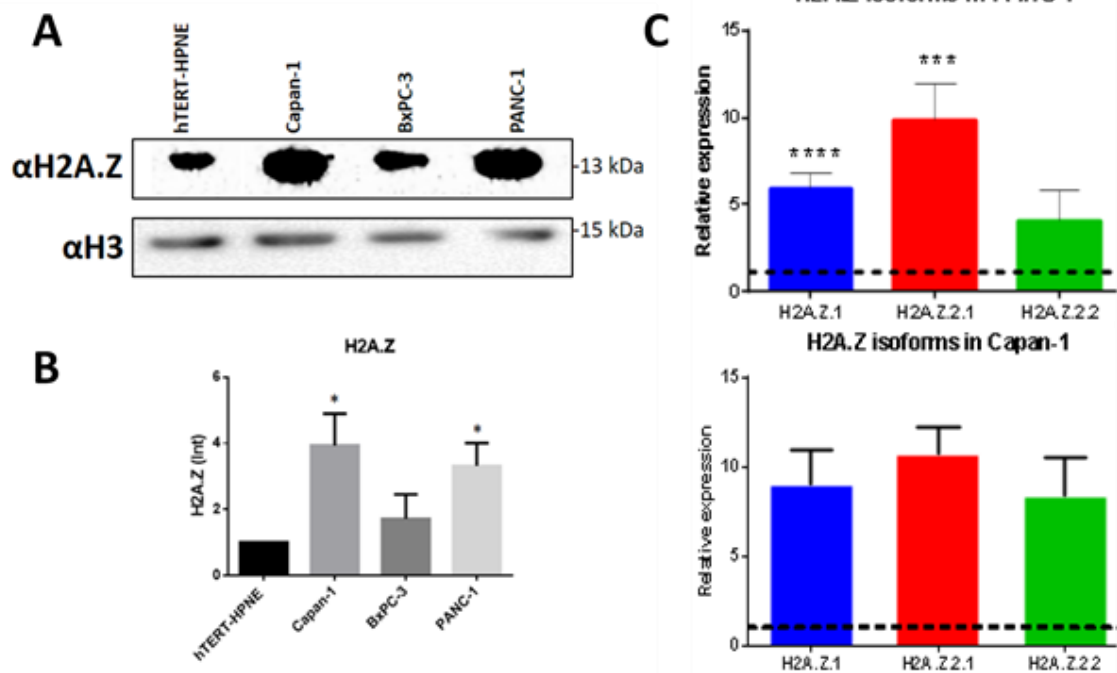


Figura 10. Evaluación de la expresión de la variante H2A.Z y sus distintas isoformas en líneas celulares de PDAC. A) Evaluación de los niveles de expresión de H2A.Z en línea celular normal (hTERT-HPNE) y líneas celulares de cáncer de páncreas (Capan-1, BxPC-3 y PANC-1) mediante WB. **B)** Densitometría de la señal obtenida para cada una de las líneas celulares. Valores normalizados con respecto a la señal obtenida de hTERT-HPNE. **C)** Evaluación de los niveles de expresión de las tres isoformas de H2A.Z (H2A.Z.1, H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2) en dos líneas celulares de cáncer de páncreas (PANC-1 y Capan-1) ³⁹.

JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo del PDAC no se debe únicamente a alteraciones genéticas, sino que también hay una participación importante de mecanismos epigenéticos, que contribuyen al inicio y progresión del PDAC. Sin embargo, de ambos mecanismos, las alteraciones genéticas siguen siendo las más estudiadas. En la última década se han estudiados algunos mecanismos epigenéticos en el PDAC como son: modificaciones post-traduccionales de las histonas, RNAs no codificantes, tanto cortos como largos, y la metilación del DNA; los cuales participan tanto en el inicio como en la progresión de este tipo de cáncer. En contraste, nada se conoce acerca de la participación de las variantes de histonas en el PDAC.

Recientemente se ha demostrado que existe una asociación entre la función de la variante de histona H2A.Z y la aparición de diversos tipos de cáncer, como son: el cáncer de colon, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el hepatocarcinoma y el melanoma.

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que la expresión de cada isoforma de H2A.Z parece ser órgano específica (H2A.Z.1 → Hepatocarcinoma, H2A.Z.2 → Melanoma), es que creemos que en el caso del páncreas la sobreexpresión de estas tres isoformas nos estaría sugiriendo que cada una de ellas contribuye en el desarrollo del PDAC y, posiblemente, de manera independiente.

Por lo que entonces, para comenzar a conocer la función de cada una de las isoformas, consideramos de gran transcendencia realizar el estudio de la participación de H2AZ.1 en el desarrollo del PDAC y así determinar si esta isoforma es una molécula prometedora para ser empleada en la propuesta de estrategias que podrían ayudarnos para la terapia y/o el establecimiento de un diagnóstico específico, así como la generación de nuevos tratamientos contra el PDAC, cuya prevalencia e incidencia van en aumento.

HIPÓTESIS

La isoforma H2A.Z.1 regula la expresión de genes diferentes a los que son regulados por la isoforma H2A.Z.2.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de la isoforma H2A.Z.1 en el desarrollo del adenocarcinoma ductal pancreático.

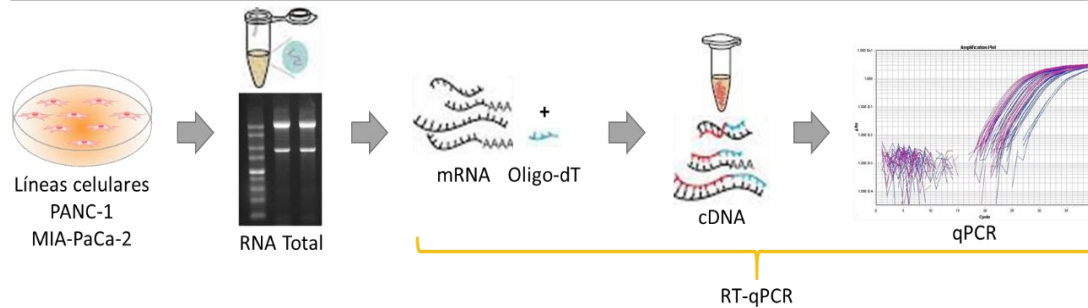
Objetivos particulares

1. Identificar la línea celular de PDAC que presente la mayor sobreexpresión de H2A.Z.
2. Identificar los genes que son desregulados por la sobreexpresión de H2A.Z.1.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

ESTUDIAR LA PARTICIPACIÓN DE LA ISOFORMA H2A.Z.1 EN EL ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO

A) Identificar la línea celular de PDAC que presente la mayor sobreexpresión



B) Identificar los genes que son desregulados por la sobreexpresión de H2A.Z.1

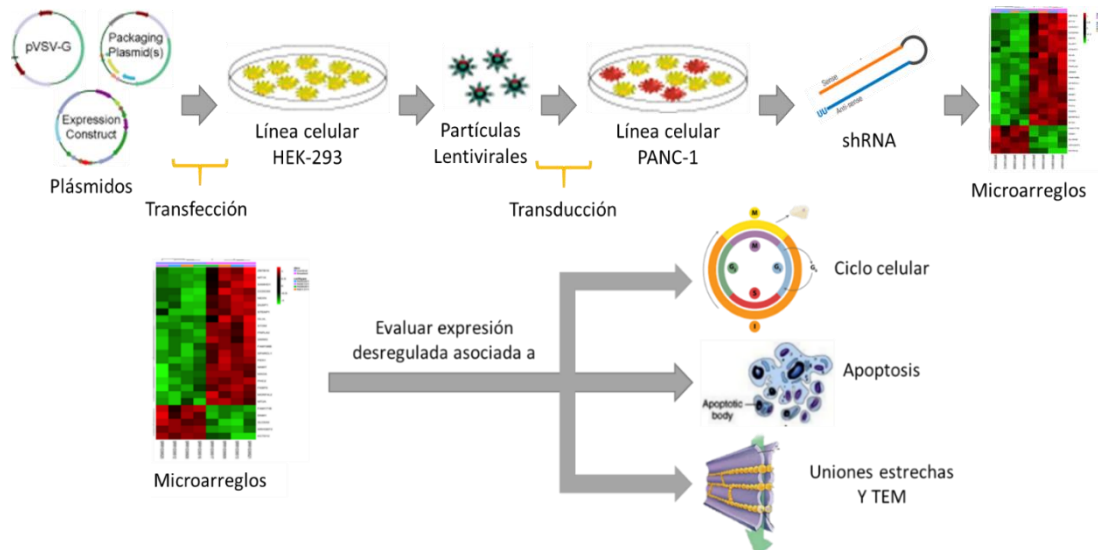


Figura 11. Identificar la participación de la isoforma H2A.Z.1 en el desarrollo del PDAC. El diagrama muestra la estrategia que se empleó. **A)** Para identificar la línea celular con mayor sobreexpresión de H2A.Z, se utilizaron las líneas celulares (PANC-1, MIA-PaCa-2 y hTERT). A partir de estas líneas celulares se midieron los niveles de mRNA de las isoformas de H2A.Z mediante RT-qPCR. **B)** Para conocer los genes desregulados por la sobreexpresión de H2A.Z.1, se generó una línea *knock-down* para H2A.Z.1 mediante partículas lentivirales que portan un shRNA. A partir del RNA total de esta línea *KD-Z.1*, se evaluaron los genes diferencialmente expresados con respecto a la línea parental PANC-1. Esta comparación se realizó mediante microarreglos haciendo uso del chip “Clariom D Assay, human”. Para validar si genes implicados en el ciclo celular, apoptosis o TEM están desregulados, se realizaron ensayos de WB contra proteínas características de cada proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron tres líneas celulares, una de ellas proveniente de páncreas normal y dos procedentes de cáncer pancreático de grado 3 de progresión. La línea celular hTERT-HPNE (ATCC® CRL-4023™), perteneciente a páncreas normal e inmortalizada con la subunidad de la telomerasa hTERT. Además, se usaron las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) y MIA-PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™). Todas las líneas celulares fueron proporcionadas por el Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, profesor del Departamento de Biomedicina Molecular CINVESTAV.

La línea celular hTERT-HPNE se creció en medio DMEM sin glucosa (Sigma D-5030), suplementado con 25% de medio M3 Base (Incell Corp M300F-500), 2 mM de L-Glutamina, 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 5% de suero fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de EGF recombinante humano, 5.5 mM de D-Glucosa y 750 ng/mL de puromicina. Las líneas celulares PANC-1 y MIA-PaCa-2 se cultivaron en medio DMEM (ATCC® 30-2002™) suplementado con 10% de SFB. Las líneas celulares fueron sembradas en placas P-100 con 8 mL de medio y/o botellas de 75 cm² con 10 mL de medio, incubadas en una atmósfera húmeda, con CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C hasta alcanzar una confluencia del 80 al 90%.

Subcultivo celular

Para realizar el subcultivo celular, así como para obtener una suspensión celular de trabajo se procedió de la siguiente manera. Una vez alcanzada la confluencia del 80 al 90%, se eliminó el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con 4 mL de PBS 1X estéril (137 mM de NaCl, 27 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄), para remover las trazas del medio de cultivo. Posteriormente, se agregaron 2 mL de una solución de Tripsina-EDTA (BIOWEST L0931-500) y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Una vez que la monocapa se desprendió, se agregaron 5 mL del medio de

cultivo (suplementado con SFB), correspondiente para cada línea celular con el fin de inactivar la acción de la tripsina. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el botón celular. Para la realización del subcultivo celular, se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo fresco, para finalmente distribuir de manera equitativa en placas de cultivo con medio fresco (Aproximadamente 4 placas con 10×10^5 células por placa).

Extracción de RNA total

Para determinar qué isoformas de H2A.Z se encuentran sobreexpresadas, se realizó la extracción de RNA total usando el método de TRIZOL, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras haber alcanzado la confluencia esperada (~ 80 al 90%), a la monocapa de células se le retiró el medio DMEM y se le realizó un lavado con 4 mL de buffer PBS 1X. Posteriormente, a la misma caja se le adicionó 1mL de Trizol (Invitrogen™, 12034977), las células se lisaron por pipeteo y la muestra se incubó con durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se recuperó el homogenizado (células + Trizol) en un tubo eppendorf, se le agregaron 0.2mL de cloroformo, por cada 1mL de Trizol, y se sometió a vortex durante 15 segundos. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y, finalmente, se centrifugó a 12,000g a 4°C durante 30 minutos. Se recuperó la fase acuosa (fase incolora), que contiene el RNA, y se transfirió a un tubo nuevo. El RNA se precipitó al adicionar 0.5mL de isopropanol por cada 1mL de Trizol usado. La muestra se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 12,000g a 4°C durante 30 minutos para empastillar el RNA. El botón que contiene el RNA se lavó suavemente agregando 1mL de etanol 70-80% por cada 1mL de Trizol usado. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 12,000g a 4°C y se retiró el sobrenadante. El botón se secó brevemente al aire y se resuspendió en agua DEPC.

Cuantificación del RNA

Una vez resuspendido el RNA, se determinó su concentración por espectrofotometría. Para esto, se tomó 1µL de RNA y se realizó una medición de la absorbancia a longitudes de onda de 260nm y 280nm para determinar su pureza y concentración. La muestra de RNA con una buena pureza deberá tener una relación 260/280 por encima de 1.8. Las mediciones se realizaron en el *Eppendorf BioSpectrometer*, el cual es capaz de determinar los ng/µL de RNA presentes en la muestra.

Análisis de la integridad del RNA

Para verificar la integridad del RNA, la muestra se corrió en un gel desnaturante de agarosa al 1.2%, de acuerdo con el protocolo descrito por Sue K. ⁴¹. Dicho protocolo se basa en utilizar formamida, la cual es capaz de romper los enlaces de puente de hidrógeno entre los nucleótidos del RNA y evitar que este forme estructuras secundarias. De esta manera se propicia la separación del RNA monocatenario.

Para preparar el gel de agarosa, se pesaron 0.36g de agarosa *UltraPure* (Invitrogen, 15510-019), los cuales se disolvieron en 30mL de buffer TBE 1X (89 Mm Tris-ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8.0), el cual fue preparado con agua DEPC. Por separado, para generar las condiciones desnaturantes se pesaron 17mg de tiocianato de guanidina, los cuales se disolvieron en 200 µL de agua DEPC. Una vez que la agarosa alcanzó una temperatura de 55 °C, se le agregó el tiocianato de guanidina y la agarosa se dejó polimerizar durante al menos 30 minutos antes de correr las muestras.

Por otra parte, 3µg de RNA se mezclaron con un volumen igual de formamida (Invitrogen, 15515-026) (Relación 1:1). La muestra se calentó a 65 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 12,000rpm por 1 minuto. Finalmente, la muestra se cargó en los pocillos gel de agarosa y en un pocillo libre se agregó buffer de carga para poder seguir la migración de las muestras en el gel. El gel se corrió en una cámara de electroforesis (Bio-Rad), usando TBE 1X/DEPC

como buffer de corrida hasta cubrir el gel, a 110 Volts durante 15 minutos y posteriormente a 80 Volts hasta que la muestra haya migrado $\frac{3}{4}$ del gel. El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (1 μ L de bromuro 0.5-1 μ g/mL por cada 10mL de buffer TBE 1X) durante 10 minutos. Finalmente, el gel se observó en el transiluminador.

Tratamiento con DNasa

Una vez obtenido el RNA total, se hizo un tratamiento con la enzima Ambion *DNaseI (RNase-free)* (Invitrogen™, AM2222) para eliminar las trazas de DNA contaminante que pudiera contener la preparación de RNA. 4 μ g de RNA total se ajustaron a 43 μ L con agua DEPC, se trataron con 5 μ L de buffer 10X DNasa I y 2 μ L de DNasa I libre de RNasa (2U/ μ L). La mezcla se incubó por 30 minutos a 37 °C. Tras este periodo, se agregó 1 μ L más de DNasa I libre de RNasa y se incubó en las mismas condiciones. Posteriormente, con el fin de eliminar el DNA de la preparación, a la mezcla se le agregaron 5.5 μ L de perlas inactivadoras de DNasa y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos con agitación leve. La mezcla se centrifugó a 1000g por 1 minuto a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual contiene el RNA. El sobrenadante, que contiene el RNA libre de DNA, se cuantificó.

RT-PCR/Síntesis de cDNA

Para la generación del cDNA necesario para las reacciones de RT-qPCR se realizaron los siguientes pasos. A partir de 1.5 μ g de RNA tratado con DNasa I, se agregaron 1.5 μ L de oligo-dT 0.5 μ g/ μ L, 1 μ L de dNTPs 25 mM y se incubó a 70°C durante 5 minutos. Después de este tiempo el vial se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente, a esta muestra se le agregaron 2.5 μ L de DTT 0.1 M como agente reductor para eliminar las estructuras secundarias del RNA, 8 μ L de Buffer 5X y se aforó a un volumen final de 40 μ L con agua DEPC. Esta mezcla se incubó a 42°C por 2 minutos. Para sintetizar el cDNA, se agregó 1 μ L de enzima *SuperScript II* (Invitrogen™, 18064014) y se incubó la mezcla de reacción a 42°C durante 90 minutos y posteriormente

a 70°C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Finalmente, el cDNA se cuantificó y se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

qPCR

Sintetizado el cDNA, este fue empleado como templado para determinar los niveles de expresión de las isoformas de H2A.Z en las líneas celulares de PDAC, empleando oligonucleótidos específicos para esta isoforma **Figura 12**. Como control positivo se amplificó el cDNA de un gen constitutivo que codifica para la enzima “gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa” (GAPDH). **Tabla II**.

Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos para determinar los niveles de expresión de las isoformas de H2A.Z mediante RT-qPCR.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5'→3'	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)
H2A.Z.1. FWD	GGCAGGAAATGCATCAAAAG	138
H2A.Z.1 RVS	TGGCTGTGTGGAATGACACC	
H2A.Z.2.1 FWD	GAGCTGGCAGGTCCTGCTTC	147
H2A.Z.2.1 RVS	TTTGTGGATGTGAGGGATCA	
H2A.Z.2.2 FWD	ATCAAGGCTACCATAGCTGG	133
H2A.Z.2.2 RVS	GGTTCAGCTCAGCACACATC	
GAPDH FWD	TTTGTCAAGCTCATTTCTGG	287
GAPDH RVS	TGATGGTACATGACAAGGTGC	

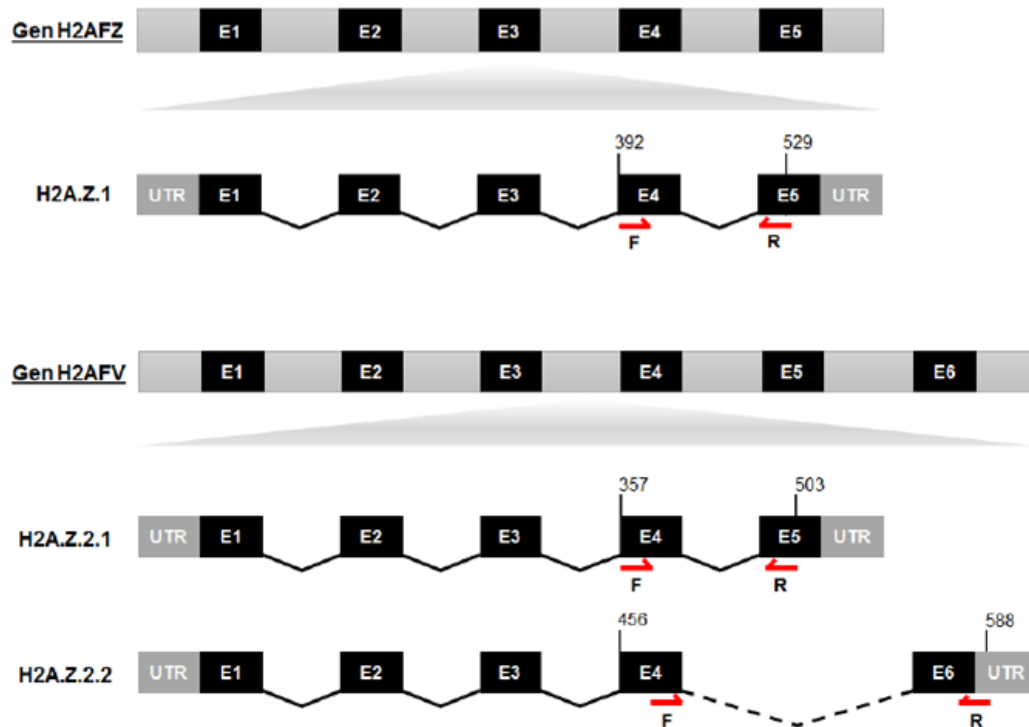


Figura 12. Sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos para la RT-Qpcr de las isoformas de H2A.Z. Representación esquemática de las isoformas de H2A.Z y de la localización de los oligonucleótidos que se emplearon para determinar la expresión de las 3 isoformas de H2A.Z en las líneas celulares de PDAC mediante RT-qPCR. Se muestra la estructura exón/intrón de los genes *H2AFZ* y *H2AFV*. Las líneas tojas muestran los

Los ensayos de RT-qPCR se realizaron utilizando la *POWER SYBR® Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems™, 4367659). Para cada reacción se utilizó 1µL de cDNA (100ng/µL), 0.5µL de oligonucleótidos 10 mM, 5µL de *Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X* y 3.5µL de agua. Se realizaron 3 réplicas por corrida y 3 ensayos independientes para tener una significancia estadística. Las condiciones de corrida fueron: 95 °C por 10 minutos para activar la enzima, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 5 minutos.

Generación de líneas celulares *knock down*

Se generaron líneas celulares *knock-down* para la isoforma de H2A.Z.1, y para GAPDH como control, en la línea celular PANC-1 mediante la transfección de *short hairpin "shRNA"*, por emplear un sistema lentiviral.

Para diseñar los shRNA candidatos para la isoforma de H2A.Z.2.2 se siguió el protocolo reportado por Reynolds A.⁴² Para el diseño de la cadena sentido, hay dos aspectos que se deben tomar en cuenta: 1. La termodinámica entre la estructura de la cadena sentido del shRNA y el complejo RISC, la cual debe ser favorecedora para el reconocimiento entre ambas moléculas; 2. La secuencia nucleotídica de la cadena sentido.

Para obtener una termodinámica apropiada se deben cumplir tres criterios: 1. La cadena sentido debe de contener entre un 30% y un 52% de contenido G/C; 2. Los nucleótidos de la posición 15 a la 19 deben de ser en su mayoría A/U y 3. La Tm deber ser menor a 20°C. Del mismo modo, se deben cumplir cinco criterios asociados a la secuencia: 1. La cadena sentido debe tener una "A" en la posición 3; 2. Tener una "A" en la posición 19; 3. Tener una "U" en la posición 10; 4. No tener "G/C" en la posición 19; 5. No tener una "G" en la posición 13. Estos ocho preceptos garantizan una correcta capacidad de interferir la traducción del mRNA.^{42 43}

Posterior al diseño de la cadena sentido, es necesario agregar la secuencia *loop*, la cual favorece la formación del shRNA. La secuencia *loop empleada se basó en* la reportada por Brummelkamp⁴³, cuya secuencia nucleotídica es 5'-TTCAAGAGA-3'. Enseguida de la secuencia *loop* debe agregarse la secuencia antisentido y, finalmente, una secuencia terminadora de la transcripción (Específica para la RNA polimerasa III), la cual fue 5'-TTTTTTGGAAA-3' **Tabla III, Figura 13A/13B.**

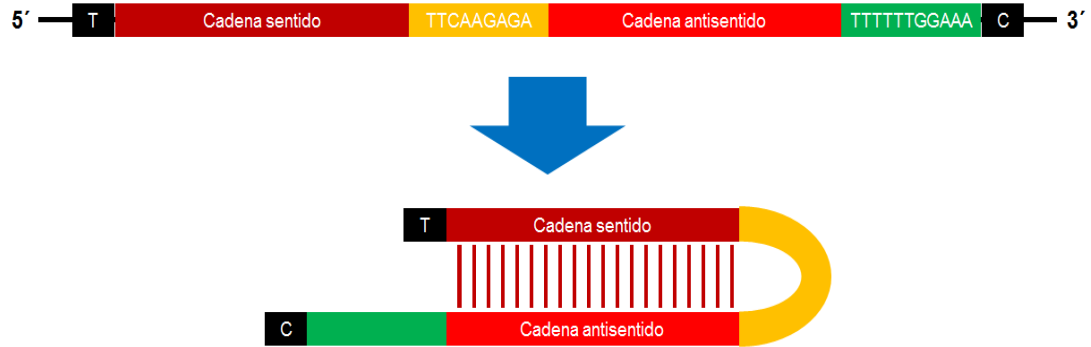


Figura 13. Estructura de los shRNA diseñados en este proyecto. Esquema que muestra la organización estructural de los shRNA. En cajas rojas representan las secuencias sentido y antisentido. La secuencia sentido es la que se une directamente al mRNA favoreciendo su degradación por el complejo RISC. La caja amarilla muestra la secuencia loop. La caja verde representa la secuencia terminadora de la transcripción para la RNA pol III. La caja negra presente en el extremo 5' corresponde a una T la cual es necesaria para recuperar la posición -1 del promotor U6, presente en el vector pLL3.7 en el cual se clonarán los shRNA.

Tabla III. Secuencia del shRNA diseñado para hibridar específicamente con el mRNA de la isoforma H2A.Z.1.

shRNA	Cadena sentido 5'→3'	Secuencia loop 5'→3'	Cadena antisentido 5'→3'	Cadena terminadora 5'→3'
H2A.Z.1	TGCTTCAAAGAAGCTATTGATT	TTCAAGAGA	AATCAATAGCTTCTTTGAAGC	TTTTTGGAAAC

“Annealing” de oligonucleótidos y clonación del shRNA en el plásmido pLL3.7-puro

Los shRNA fueron clonados río abajo del promotor U6 presente en el plásmido pLL3.7-puro, en los sitios de restricción *Hpa* I y *Xho* I **Figura 14**. Con este paso obtuvimos el plásmido pLL3.7-puro-H2AZ.1 con las secuencias de los shRNAs bajo el control del promotor U6 ⁴⁴. El protocolo se describirá a detalle a continuación.

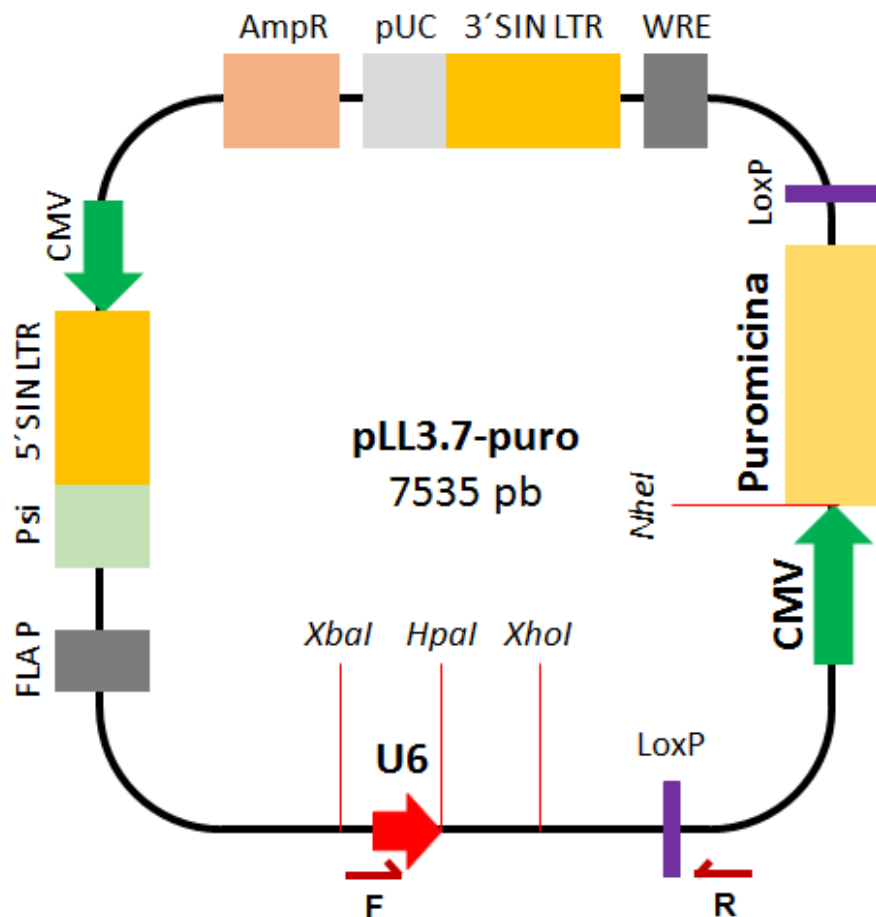


Figura 14. Estructura del plásmido pLL3.7-puro. En este esquema se muestra la estructura del plásmido pLL3.7-puro, en el cual fueron clonados los shRNA. El promotor U6 dirige la producción de los shRNA, los cuales se clonaron entre los sitios únicos *Hpa* I y *Xho* I. En la imagen se muestran las regiones en la cual interaccionan los oligonucleótidos que fueron utilizados para la verificación de la inserción de las secuencias shRNA.

Los oligonucleótidos correspondientes a los shRNA fueron hibridados en una proporción 1:1 (60pmol/uL de cada oligonucleótido), en buffer de alineamiento (100 mM K-acetato, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 2 mM Mg-acetato), a 95 °C por 4 minutos, seguidos de una incubación a 70 °C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó la suspensión a temperatura ambiente por al menos 3 horas, con el fin de permitir que los oligonucleótidos hibridaran perfectamente.

A continuación, el plásmido pLL3.7-puro fue linealizado con las enzimas de restricción XhoI y HpaI. Para esto, se digirieron 5 µg del plásmido pLL3.7-puro con 25 U y 50 U de las enzimas de restricción HpaI y XhoI, respectivamente, en buffer NEBuffer™ 4 a 37°C por 2 horas. Después de este tratamiento se recomienda incubar el plásmido con 15 U/µL de la fosfatasa CIP, para desfosforilar los sitios de corte y de esta manera evitar la auto-ligación del mismo.

Una vez que contamos con el plásmido linealizado, este se corrió en un gel preparativo de agarosa al 0.8% durante ~2 horas a 120 volts. Al terminar de correr el gel deben de poderse identificar 3 bandas: el plásmido linealizado, el plásmido enrollado y el plásmido super enrollado. El fragmento linealizado se purificó mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, D4001), por lo que se cortó el fragmento del gel de agarosa donde se encuentra el plásmido linealizado y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Al tubo se agregaron 300 µL del *ADB buffer* por cada 100 mg de agarosa y la muestra se incubó a 65 °C por 10 minutos, agitando el tubo cada 2 minutos. La solución que contiene la agarosa disuelta se transfirió a una *Zymo-spin™ Column*, la cual debe de estar dentro de un tubo colector. La columna se centrifugó por 60 segundos a máxima velocidad (13,400 rpm), se tomó el sobrenadante y este se pasó por la columna dos veces más. A la columna se añadieron 200 µL del *DNA Wash Buffer* y se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se repitió el paso de lavado. Se cambió la columna a un tubo nuevo, se le agregaron 20 µL de agua al centro

de la columna, el tubo se calentó a 65 °C por 3 minutos y se centrifugó a 10,400 rpm para recuperar el DNA. Finalmente, se repitió el paso de elución, pero agregando 10 µL de H₂O. Una vez que se concluyó la purificación y se tiene los dos productos de elución, se estimó la concentración de los mismos mediante el equipo *Eppendorf BioSpectrometer*.

Una vez que se conoce la concentración del inserto y vector, se procede a ligar los fragmentos, para lo que se utilizaron concentraciones 3:1 de los shRNA con respecto al vector linealizado. Esta ligación se incubó a 16 °C toda la noche y al día siguiente fue empleada para transformar las cepas de *Escherichia coli* XL10 Gold. Para verificar la correcta construcción del vector y la transformación realizamos PCR de la colonia, por emplear los primer M13 forward (5'-3': ggaaactcaccctaactgtaaag) y M13 primer reverse (5'-3': cgcttaagcttgaaccc), esto nos permitió identificar qué colonia de bacteria contiene nuestra construcción de interés. Una vez identificada la colonia se obtuvo el plásmido, el cual fue digerido con las enzimas *Nhe* I y *Xba* I con el propósito de liberar el inserto clonado. Adicionalmente se secuenció el plásmido para corroborar que las secuencias de los shRNA sean correctas y que no hayan sufrido cambios de bases que puedan alterar el reconocimiento de su mRNA blanco.

Realización de la MAXI-PREP

Una vez corroborado esto último, se procedió a realizar una maxi-prep a partir del *QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)* (QIAGEN, 12163) para recuperar el DNA plasmídico en grandes cantidades. Se seleccionó una colonia de las colonias que tenían el vector con la secuencia del shRNA y a partir de ella se inocularon 500 mL de medio LB-Ampicilina 0.1 mg/mL y se incubaron a 37 °C por 16 horas en agitación vigorosa (Aproximadamente 250 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se centrifugó a 6000 g por 15 minutos a 4 °C y la pastilla de bacterias se resuspendió en 10 mL de Buffer P1 (Al cual previamente se le agregó RNasa A y el reactivo *LyseBlue*). Se agregaron 10 mL del Buffer de lisis P2, se mezcló invirtiendo el tubo de 4-6 veces y se incubó

a temperatura ambiente por 5 minutos. La suspensión celular debe de tornarse de color azul una vez que se le agregue el buffer de lisis y mezclarse hasta que se alcance una coloración homogénea. Posteriormente, se agregaron 10 mL de Buffer P3 pre-enfriado, la suspensión se mezcló por inversión de 4-6 veces hasta que desapareció el color azul y se incubó en hielo por 20 minutos. El tubo se centrifugó a 20,000 g por 30 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico, se repitió la centrifugación del sobrenadante centrifugando ahora sólo por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se equilibró una columna *QIAGEN-tip 500* agregando 10 mL de Buffer QBT y se dejó que la columna se vaciara por gravedad. Una vez equilibrada, se agregó el sobrenadante a la columna y se dejó eluir por gravedad. La columna se lavó por duplicado agregando 30 mL de Buffer QC y finalmente se eluyó el DNA agregando a la columna 15 mL del Buffer QF. El DNA se precipitó agregando 10.5 mL (0.7 volúmenes) de isopropanol, se mezcló, centrifugó inmediatamente a 15,000 g por 30 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. La pastilla de DNA se lavó con 5 mL de etanol 70%, se centrifugó a 15,000 g por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla se dejó secar al aire por 5-10 minutos y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Se estimó la concentración del DNA plasmídico mediante el equipo *Eppendorf BioSpectrometer*.

Obtención de partículas lentivirales

El DNA plasmídico se empleó para co-transfectar a las células embrionarias de riñón humano HEK293, para lo que previamente se habrán crecido 6×10^6 células HEK293 en cajas de 6 pozos 24 horas antes de la transfección. Para realizar la co-transfección se utilizarán 20 µg del vector pLL3.7_shRNA, junto con otros tres plásmidos (10 µg del plásmido de expresión RRE, 10 µg del plásmido de expresión REV y 10 µg del plásmido de expresión PMD.G), los cuales se encargarán de generar las proteínas estructurales de los lentivirus ⁴⁵.

Todos estos plásmidos se resuspendieron en 400 uL de CaCl₂ al 1.5 M, 2 mL de buffer HeBS 2X (Dextrosa 12 mM, HEPES 50 mM, KCl 10 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄•2H₂O 1.5 mM). Esta suspensión se agregó por goteo a la caja de cultivo que contiene a las células HEK293. Hecho lo anterior, se incubaron las células durante 6 horas a 37 °C, para posteriormente retirar el medio de cultivo y lavar con PBS 1X estéril. Se agregó medio nuevo a las células y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Después de la transfección, se recuperó el sobrenadante, que contiene las partículas lentivirales, y se centrifugó a 4500 rpm durante 7 minutos a 4 °C. Posteriormente el sobrenadante (el cual contiene las partículas virales), se guardó a -80 °C.

Para la concentración de las partículas virales, se centrifugó el sobrenadante de las 48 horas en una ultracentrífuga a 27000 rpm durante 90 minutos a 4 °C. Después de este paso, el sobrenadante se decantó y al tubo se le agregaron 100 uL de PBS estéril frío, procurando lavar todas las paredes. Esta suspensión se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se resuspendieron los virus y se realizaron alícuotas en volúmenes de 20 µL, los cuales se guardaron a -80 °C.

El título del virus se determinó para realizar la transducción en la línea celular PANC-1. Para esto fue necesario crecer 4×10^5 células HEK293/pozo en placas de 6 pozos. Adicionalmente, se agregaron 8 µg/mL polybrene (El cual mejora la infección retroviral de 100 a 1000 veces). Las células se dejaron incubar con las partículas virales a 37 °C toda la noche. Al día siguiente fue reemplazado el medio por medio fresco y se incubaron 24 horas más para permitir la infección de las células. Después de este periodo de incubación, se despegaron las células y se analizó por citometría de flujo la expresión de EGFP para estimar el porcentaje de EGFP positivas, el cual corresponderá al porcentaje de células infectadas. Con estos datos se obtuvo el título viral para infectar la línea PANC-1 y poder obtener un alto porcentaje de infección con las partículas virales cargando el shRNA_H2A.Z.1.

Transducción de células PANC-1

Para esto es necesario crecer 10×10^6 células en placas de 6 pozos (considerar 1 pozo por construcción, 1 pozo por control de vector vacío, más un pozo como control de células no infectadas). Se realizaron tres diluciones del virus (1:100, 1:1000 y 1:10000). Adicionalmente se debe agregar polybrene a una concentración final de 8 $\mu\text{g/mL}$. Las células se dejaron incubar con las partículas virales a 37 °C por 2 o 3 días para permitir la expresión

Posteriormente, para generar las líneas celulares knock-down estables, se realizó la selección con puromicina (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 3 semanas, lo cual permitió mantener sólo a las células que integraron la secuencia del vector pLL3.7-puro. Una vez que se obtuvieron las células estables con el RNA interferente, se procedió a evaluar a nivel de RNA, por RT-qPCR, si hubo una disminución del mensajero de H2A.Z.1. Como control negativo, células PANC-1 fueron transducidas con partículas lentivirales acarreando un shRNA contra GAPDH, un gen no relacionado.

Obtención de clonas *knock down* para H2A.Z.1 por dilución limitada

Una vez que se corroboró que tenemos una población de células *knock-down* para H2A.Z.1, se procedió a obtener clonas por dilución limitada. Para esto, 200 células de la línea celular que tiene el *knock-down* para H2A.Z.1, se resuspendieron en 20mL de medio de cultivo y 200 μL de esta mezcla se colocaron en cada pocillo de una caja de cultivo de 96 pozo. Se cultivaron a 37°C y dos semanas después, con la ayuda del microscopio, se observó la presencia de las clonas. Éstas se recuperaron y se crecieron para caracterizarlas. Con las clonas que se obtuvieron, se repitieron los ensayos de qRT-PCR para elegir la o las clonas que mantuvieron el fenotipo *knock-down* para la isoforma H2A.Z.1.

Cinética de crecimiento

Para evaluar la proliferación de las líneas celulares (PANC-1, PANC-1/KD-Z.1, PANC-1/KD-GAPDH) se contaron las células en una cámara de

Neubauer. Brevemente, se sembraron 5×10^3 células en placas de 24 pozos y se incubaron por 5 días. Cada 24 horas las células se recuperaron por tripsinización y se tiñeron con azul tripano (0.4% de azul tripano en PBS).

Ensayo clonogénico

Para respaldar los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento, 200 células fueron sembradas en placas de 6 pozos y se les dejó crecer por 2 semanas. Las células se lavaron con 2 mL de PBS 1X por 5 minutos en agitación, se fijaron en paraformaldehído al 4% (4 g de paraformaldehído, 25 mL de PBS 1X, ajustar a pH 7.4 con NaOH 10 N, aforar a 100 mL con agua bidestilada) por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las células tres veces con PBS 1X por 2 minutos con agitación a temperatura ambiente. El buffer se eliminó por inversión y se colocó la caja sobre el papel absorbente/Whatman. Posterior al secado, las células se tiñeron con 500 μ L de cristal violeta al 0.5% (0.25 g de cristal violeta, 10 mL de metanol, 40 mL de agua) por 40 minutos a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron cuatro veces con PBS 1X por 2 minutos con agitación a temperatura ambiente, se eliminó el buffer por inversión y la placa se colocó sobre el papel filtro. A la placa se le quitó la tapa y se dejó secar al aire por al menos 2 horas a temperatura ambiente (Se recomienda dejar secar hasta 24 horas). En este punto se pudo observar la diferencia en el número de clonas presentes en los cultivos de la línea PANC-1 con respecto a las líneas *Knock-down*. A continuación, el cristal violeta que se mantuvo dentro de las células fue solubilizado al agregar 200 μ L de la solución "Isopropanol ácido" (40 mM HCl, 0.1% NP-40, isopropanol) y se incubó la placa por 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. La cantidad de cristal violeta se cuantificó al medir su absorbancia a 590 nm.

Ensayo metabólico

Para demostrar que nuestras células se mantienen viables y con actividad metabólica, el reactivo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma, M5655) fue usado siguiendo las instrucciones del

fabricante (Solución 5 mg/mL de MTT en agua). Brevemente, 1000 células/pozo fueron sembradas en una placa de 96 pozos e incubadas por 5 días. Cada 24 horas la actividad metabólica fue determinada al agregar a las células 10 μ L del reactivo de MTT por 4 horas a 37 °C. Después, se agregaron 100 μ L del reactivo detergente (40 mM HCl, 0.1% NP-40, isopropanol) y la placa se incubó en oscuridad durante toda la noche. Al día siguiente, se midió la absorbancia a 570 nm en el equipo *Tecan GENios Microplate Reader*.

Incorporación de BrdU y análisis de ciclo celular

Para determinar si existe alguna alteración en la replicación del DNA y en la progresión de alguna fase del ciclo celular, se sembraron 80×10^3 células en placas de 6 pozos y se incubaron por 24 horas (O hasta haber alcanzado ~50% de confluencia). Transcurrido este tiempo, se retiró el medio completo a las células y se les agregó medio DMEM sin SFB por 24 horas, con el propósito de sincronizar las células en la misma fase del ciclo celular. Posteriormente, se les cambió el medio sin suero a medio completo de nuevo y se evaluaron las células a 0, 24, 72 y 120 horas, incubándolas durante estos intervalos de tiempo a 37 °C. Para evaluar la alteración en la replicación, concluido el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS 1X, se les agregó medio DMEM completo con BrdU (Sigma, B9285) a una concentración final de 10 μ M y se incubaron por 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron con PBS 1X, se tripsinizaron y se fijaron con etanol frío al 70% por al menos 30 minutos. A continuación, las células se incubaron con una solución 2N de HCl, 0.5% de Tritón X-100 durante 30 minutos a temperatura ambiente en rotación. Esta solución permitirá que la doble hebra del DNA de las células se desnaturalice y así los anticuerpos tengan acceso a las bases nitrogenadas. Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS 1X y luego se resuspendieron en una solución 0.1M $N_2B_2O_7$ pH 8.5 por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 1X. Las células se incubaron con la solución de bloqueo (1% BSA, 0.05% Tween 20, PBS 1X) por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-BrdU (BD Pharmingen,

555627) en relación 1:100 a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X/BSA 1% y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón-FITC en relación 1:200 por 2 horas a 4 °C en oscuridad. Las células se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en PBS 1X con 0.025 µg/µL de RNasa A y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en PBS con yoduro de propidio 2.5 µg/mL. Al concluir, las células se leyeron en el citómetro BD LSRII Fortessa. El análisis de los datos fue realizado en el programa FlowJo v10.

Western Blots

Para determinar el nivel de alguna proteína (Incluyendo variante de histonas), se realizaron ensayos de western blot (WB) empleando electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli ⁴⁶.

Se prepararon geles SDS-PAGE a una concentración del 12% para migrar los extractos totales. Para la preparación del gel separador al 12% se agregaron 2 mL de una solución de acrilamida:bisacrilamida (30:0.08), 1.87 mL de Tris buffer pH 8.8, 50 µL de una solución de SDS al 10% y 1 mL de agua. Para la polimerización se agregaron 40 µL de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 8.3 µL de tetrametiletildiamina (TEMED). Una vez formado el gel separador, se preparó el gel concentrador al 5% empleando 390 µL de una solución de acrilamida:bisacrilamida (30:0.08), 370 µL de Tris buffer pH 6.8, 30 µL de SDS al 10%. Para la polimerización se agregaron 30 µL de PSA al 10% y 1.5 µL de TEMED.

Para la preparación de las muestras, Brevemente, el botón celular se resuspendió en buffer PBS 1X en una proporción 1:10 con respecto al volumen del botón. Para evitar la degradación de las proteínas por acción de las proteasas, se agregó el inhibidor de proteasas *cOmplete™*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (ROCHE, 1187358000). se utilizó buffer Laemmli (SDS al 4%, Glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al

0.004%, 0.125 M de Tris pH 6.8), el cual se agregó en una relación 4:1 con respecto a la muestra, se calentó a 95 °C durante 5 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos para remover los *debris* celulares y el sobrenadante se transfirió a un vial nuevo. Finalmente, se cargaron 50 µg de proteína en cada pozo y se corrieron a 120 Volts. Para su almacenamiento, los viales se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transferencia de las proteínas a analizar a un soporte sólido se utilizó la membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane* (GE Healthcare RPN303D) y buffer de transferencia (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, metanol al 20%)⁴⁷. Para preparar el casete de transferencia se colocó el soporte de la cámara, seguido de una esponja, tres piezas de papel Whatman, el gel con las proteínas resueltas, la membrana de nitrocelulosa, tres piezas de papel whatman y finalmente una esponja. El casete se cerró perfectamente, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana de nitrocelulosa, y se colocó dentro de la cámara de transferencia, dentro de la cual se colocó un bloque de hielo para evitar el sobrecalentamiento del buffer y, adicionalmente, la cámara fue colocada dentro de un recipiente con hielo. La transferencia se realizará a 100 Volts y 400 mA por 2 horas. Después de la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (2% de ácido acético, 0.5% de Ponceau en agua) para corroborar que la transferencia se haya realizado eficientemente. Una vez confirmado que la transferencia se realizó correctamente, las membranas fueron bloqueadas en PBS-Tween (PBS 1X conteniendo Tween-20 al 0.05%) con 5% de leche libre de grasas durante 2 horas a temperatura ambiente, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente **Tabla IV** diluido en PBS-Tween con 2% de leche a 4°C con agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron con PBS-Tween durante 10 minutos por triplicado en agitación. Al terminar los lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente **Tabla V** diluido en PBS-Tween con 2% de leche a temperatura ambiente durante 2

horas. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween durante 10 minutos cada uno en agitación.

Las imágenes fueron obtenidas en el ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad 1708280) usando como sustrato el *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher, 34095).

Tabla IV. Anticuerpos primarios a utilizar

Anticuerpo	Peso molecular	Especie	Título WB	No. de Catálogo
Actina	42 kDa	Ratón	1:5000	MAB-1501
H2A.Z	13 kDa	Conejo	1:500	CS-2718
Ciclo celular				
p16	16 kDa	Ratón	1:200	Sc1661
p53	53 kDa	Ratón	1:1000	Sc374067
Ciclina D1	37 kDa	Conejo	1:1000	Sc753
Apoptosis				
Caspasa 3	17,19,35 kDa	Conejo	1:1000	CS-9662
PARP	89, 116 kDa	Conejo	1:1000	CS-9542
Survivina	16 kDa	Conejo	1:1000	CS-2808
Transición epitelio-mesénquima				
E-cadherina	80, 120 kDa	Conejo	1:500	Sc8426
N-cadherina	130 kDa	Ratón	1:1000	Sc59987
Vimentina	57 kDa	Ratón	1:2000	Sc80975

Tabla V. Anticuerpos secundarios a utilizar

Anticuerpo	Especie	Título WB	Marca
Anticuerpos secundarios			
HRP anti-conejo	Cabra	1:7500	Zymed 81-6120
HRP anti-ratón	Cabra	1:7500	Zymed 81-6520

Preparación de muestras de RNA para su análisis mediante Microarreglos

Para comparar el perfil de expresión de la línea celular *KD* para H2A.Z.1 con la línea parental PANC-1, tres muestras de RNA total provenientes de cada línea celular fueron llevadas a la Unidad de Microarreglos en el INMEGEN. Para su análisis se llevaron 20 μ L de RNA total con una concentración de \sim 100 ng/ μ L y un RIN (RNA Integrity Number) de al menos 6.5. El chip de microarreglos que se utilizó fue el *Clariom™ D Assay, human* (Applied Biosystems™, 902922), el cual contiene sondas para transcriptoma completo.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPad Prism 6.01. Los datos fueron expresados como media \pm SEM. La correlación estadística de los datos entre los grupos fue analizada por análisis de varianza de una cola (ANOVA) o por la muestra de T de Student según fuera el caso. Los asteriscos muestran la significancia estadística de acuerdo con: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

RESULTADOS

Identificación de los niveles de expresión de H2A.Z.1

Con el propósito de determinar el papel de la isoforma H2A.Z.1 en la progresión del PDAC se emplearon tres diferentes líneas celulares pancreáticas. Una de ellas es la línea celular hTERT-HPNE, proveniente de tejido pancreático no transformado con fenotipo ductal, en la cual no han sido descritas alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores, por lo que pudo ser utilizada como línea control. También se emplearon dos líneas celulares de cáncer pancreático (PANC-1 y MIA-PaCa-2), consideradas líneas de alto grado de dediferenciación (grado 3)⁴⁸.

Por lo que con el propósito de identificar cuál de estas tres líneas podría ser el modelo sobre el cual se realizaría el proyecto, se realizaron ensayos de RT-qPCR. Inicialmente se realizó la extracción de RNA total de cada una ellas. Posteriormente, para evaluar la integridad de las muestras, el RNA total que se obtuvo se migró en un gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturizantes. Como se observa en la **Figura 15A**, se aprecian dos bandas bien definidas que corresponden al RNA ribosomal (rRNA) 28S y 18S, lo que indica que el RNA de cada una de las líneas celulares tiene la calidad adecuada para ser empleada en los ensayos de RT-qPCR. Una vez confirmada la integridad del RNA se realizó el tratamiento con *DNase I* para eliminar las trazas de DNA. Hecho lo anterior, se realizó la síntesis del cDNA para realizar la PCR, lo que nos permitiría definir los niveles de expresión de las tres isoformas de H2A.Z en cada línea celular.

En la gráfica que se muestra en la **Figura 15B**, podemos observar que en ambas líneas celulares provenientes de cáncer de páncreas (PANC-1 y MIA-PaCa-2), existe una sobreexpresión de las tres isoformas de H2A.Z con respecto a la línea celular de páncreas no transformado (hTERT-HPNE). La mayor sobreexpresión se observa para la isoforma H2A.Z.2.1, seguida por la isoforma H2A.Z.1 y finalmente la isoforma H2A.Z.2.2. Sin embargo, aunque existe una clara sobreexpresión de las tres isoformas de H2A.Z en PANC-1 y

MIA-PaCa-2, al comparar los niveles de expresión entre ellas se observa una mayor sobreexpresión en la línea PANC-1.

Debido a que PANC-1 es la línea celular que presenta los mayores niveles de expresión de H2A.Z.1 es que fue la línea celular que decidimos emplear para el desarrollo de este trabajo.

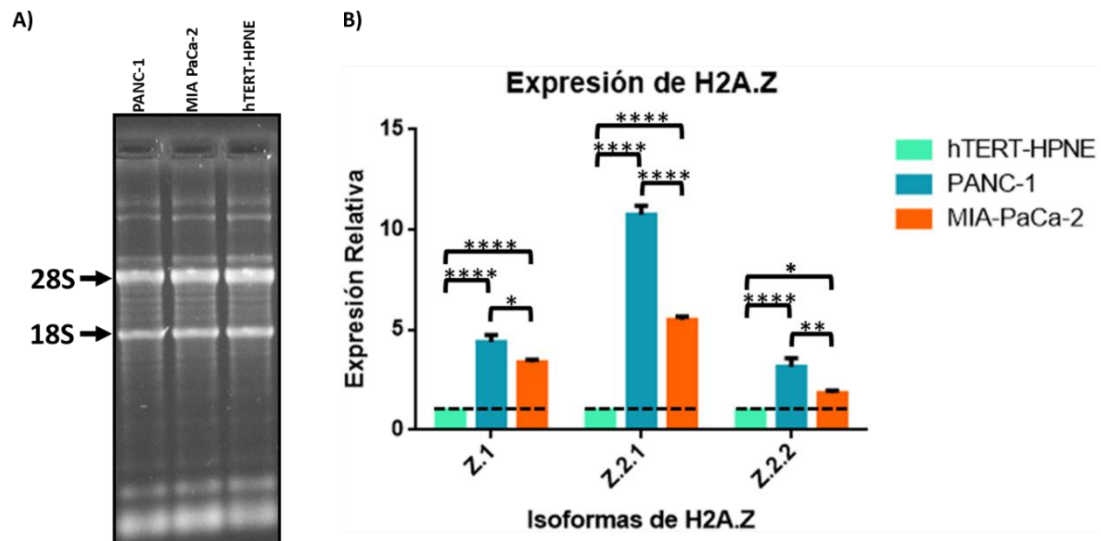


Figura 15. PANC-1 es la línea celular que presenta mayores niveles de expresión de H2A.Z.1. **A)** En la imagen de la derecha se muestra la integridad de las muestras de RNA usados para la síntesis del cDNA, correspondientes a cada una de las líneas celulares. **B)** En la gráfica se observan los niveles de expresión de cada una de las isoformas de H2A.Z (Z.1, Z.2.1, Z.2.2) para cada una de las líneas celulares. Los niveles de expresión se reportan como “Expresión relativa” y los valores fueron normalizados con respecto a los niveles de expresión obtenidos en la línea hTERT-HPNE. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de dos experimentos independientes con triplicados de cada muestra.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Generación de una línea celular PANC-1/KD-Z.1

Una vez que ya escogimos a PANC-1 como modelo para el desarrollo de este trabajo y con el propósito de identificar los genes que son específicamente desregulados por la sobreexpresión de la isoforma H2A.Z.1, se planteó generar una línea celular *knock down* en PANC-1 mediante el uso de un “short hairpin RNA” (shRNA) que reconociera específicamente al transcrito de la isoforma H2A.Z.1., por emplear un sistema lentiviral **Figura 16**.

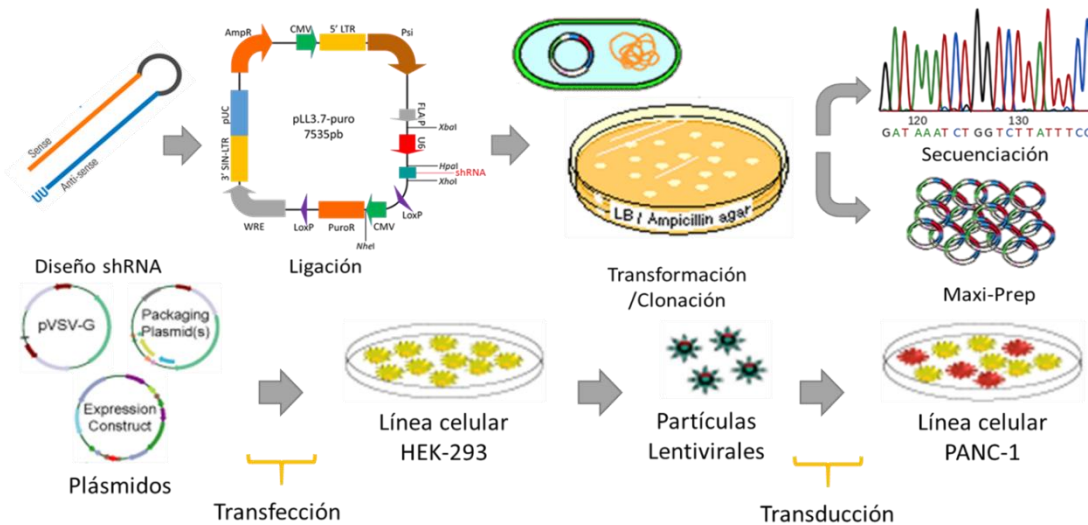


Figura 16. Esquema general para desarrollar una línea celular PANC-1/KD-Z.1. En la imagen se observan los pasos más importantes para generar las partículas lentivirales que portan el shRNA_H2A.Z.1, que se usaron para transducir la línea celular PANC-1 y generar la línea PANC-1/KD-Z.1.

El shRNA usado para generar el KD de H2A.Z.1 se basó en la secuencia reportada por Vardabasso⁴⁹, el cual reconoce específicamente el extremo 3' UTR del RNA mensajero de la isoforma Z.1, como se aprecia en la **Figura 17A**. La secuencia de este shRNA estuvo compuesta por distintas regiones importantes para su función, como fueron: en el extremo 5' la secuencia para el sitio de restricción de la enzima *XhoI*, seguido de la “secuencia sentido” que reconoce específicamente al extremo 3' UTR del RNA mensajero de la isoforma Z.1, después la “secuencia loop” que permite el plegamiento para que adopte su forma de “*hairpin*”, seguida de la “secuencia antisentido” que es complementaria a la secuencia sentido, después la “secuencia terminadora”

que será reconocida por la RNA Polimerasa III para terminar la transcripción y finalmente en el extremo 3' la secuencia para el sitio de restricción de la enzima *HpaI* **Figura 17B**. Además de este oligonucleótido se sintetizó otro con la secuencia complementaria al oligo anterior, para realizar la reacción de alineamiento y generar un fragmento de DNA de doble cadena de 70 pb para clonarlo en el vector lentiviral **Figura 17C**.

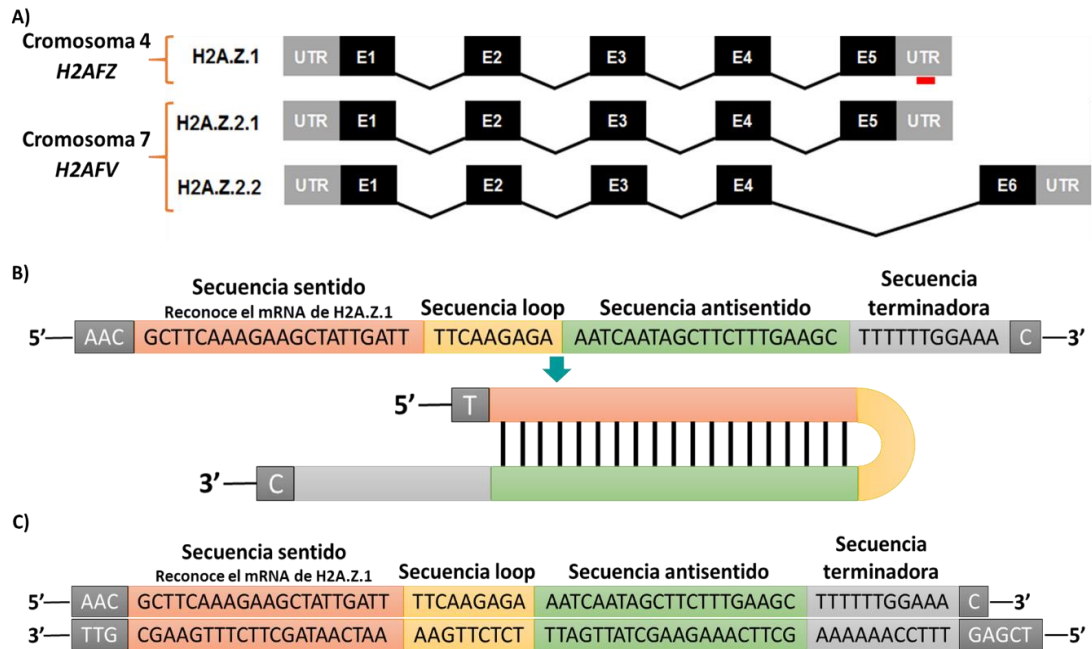


Figura 17. Diseño de un shRNA que reconoce específicamente el mRNA de la isoforma H2A.Z.1. A) Representación esquemática del sitio de reconocimiento del shRNA en la región 3' UTR del mRNA de H2A.Z.1. En rojo se muestra el sitio donde hibrida el shRNA. **B)** Representación gráfica de la secuencia y regiones que componen al shRNA. En naranja: la secuencia sentido, en amarillo: la secuencia loop, en verde: la secuencia antisentido, en gris: la secuencia terminadora. **C)** Representación gráfica del DNA de doble cadena que fue clonado en el vector lentiviral pLL3.7-puro.

El fragmento de DNA de 70 pb que contiene la secuencia del shRNA para la isoforma H2A.Z.1 se ligó en el vector lentiviral pLL3.7-puro, en los sitios de restricción *XhoI* y *HpaI* de este vector **Figura 18A**, y esta ligación se usó para transformar a las bacterias *Escherichia coli* XL10 Gold. Posteriormente, para poder discernir entre las colonias de bacterias que tenían el inserto ligado

al vector de aquellas que poseían el vector vacío, se realizó una PCR de colonia con oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación como se muestra en la **Figura 18A, B**. El tamaño del amplicón que esperaba para aquellas colonias que poseían el vector vacío debería de ser de 213 pb, mientras que aquellas colonias que poseían el vector con el inserto de interés generarían una banda de 275 pb **Figura 18B**. Como se aprecia en la **Figura 18C**, de las cuatro colonias seleccionadas tres fueron positivas y amplificaron el producto de 275 pb, mientras que en el cuarto carril se observa un amplificado de 213 pb, lo que indicaría que esta colonia no tiene nuestro inserto de interés. Como control positivo de esta reacción de PCR, se usó como DNA molde el producto de la ligación del vector con el shRNA.

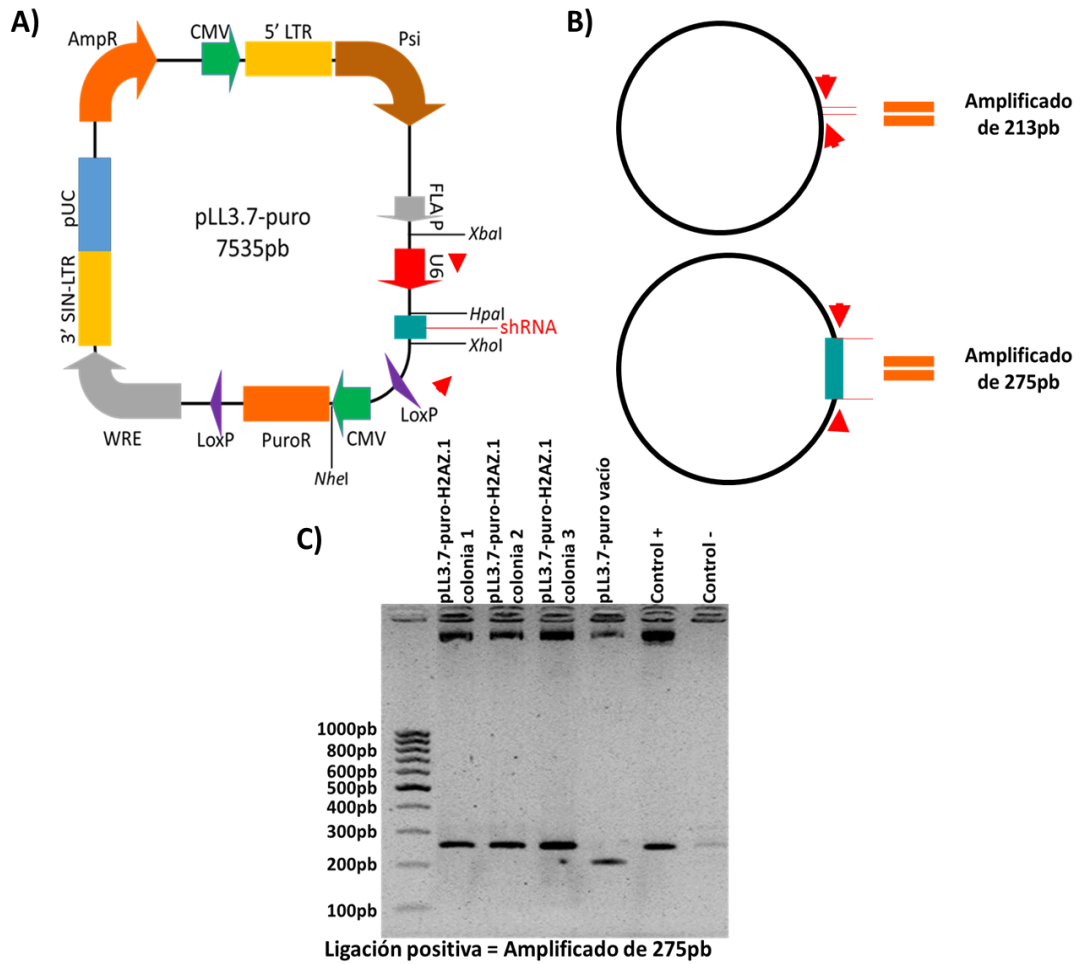


Figura 18. Clonación del shRNA-Z.1 en el vector lentiviral pLL3.7-puro.

A) Representación del vector lentiviral pLL3.7-puro al que se ligó el shRNA_{H2A.Z.1} en los sitios de restricción *XhoI/HpaI*. Con flechas rojas se observan los sitios donde hibridan oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación. **B)** Representación de la estrategia empleada para la identificación del vector que posee el shRNA del vector que no posee inserto, con los oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonación. **C)** Imagen de la identificación de aquellas colonias que poseen el vector en el que se ligó el shRNA_{H2A.Z.1} mediante una PCR de colonia.

Una vez identificadas las colonias positivas que contenían el vector con el inserto de interés, se obtuvo el DNA del plásmido de una de las colonias positivas y se secuenció para verificar durante la clonación de la construcción no hubiera ocurrido algún cambio en los nucleótidos de la secuencia del shRNA que pudiera alterar el reconocimiento de su mRNA blanco. Como se observa en la **Figura 19** al secuenciar el plásmido, se comprobó que no hubo alteración en la secuencia del shRNA, por lo que la construcción se empleó para generar las partículas lentivirales que se usaron para transducir a la línea PANC-1 y generar la línea PANC-1/KD-Z.1.

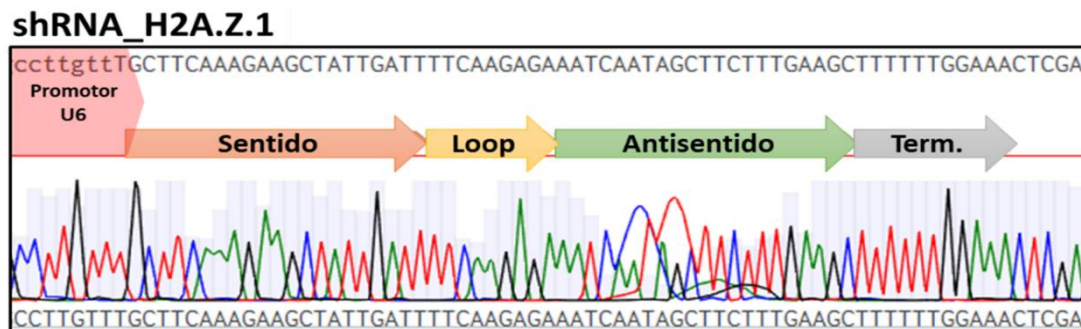


Figura 19. Resultado de la secuenciación del vector pLL3.7-puro-shRNA_H2A.Z.1. En la imagen se observa que posterior a la clonación del vector pLL3.7-puro-shRNA_H2A.Z.1, la secuencia del shRNA se mantuvo sin variación alguna.

Una vez transducida la línea celular PANC-1 con las partículas lentivirales y para demostrar que realmente se contaba con una línea celular que tiene un perfil *knock down* para la isoforma H2A.Z.1; las células se evaluaron a dos niveles: a nivel de transcrito mediante una RT-qPCR y a nivel de proteína mediante un Western Blot. Para lo cual se obtuvo el cDNA de la línea celular PANC-1/KD-Z.1, así como de la línea parental PANC-1 y de la línea control hTERT-HPNE para amplificar el transcrito de H2A.Z.1. Como se observa en la **Figura 20A**, hay una marcada disminución de los niveles de transcrito de la isoforma H2A.Z.1 en la población celular PANC-1/KD-Z.1 con respecto a la línea celular parental PANC-1. Además, como esperábamos, el KD de la isoforma H2A.Z.1 no altera la expresión de las otras dos isoformas de H2A.Z de manera estadísticamente significativa. El resultado anterior se

respaldó al evaluar los niveles totales de H2A.Z (Porque el anticuerpo no distingue entre las isoformas), donde se observó que había una disminución en los niveles de la proteína de H2A.Z en la línea KD-Z.1 con respecto a la línea parental PANC-1 **Figura 20B**, así como con la línea control PANC-1 que había sido transducida con el vector vacío, presentando esta última una mayor cantidad de H2A.Z.

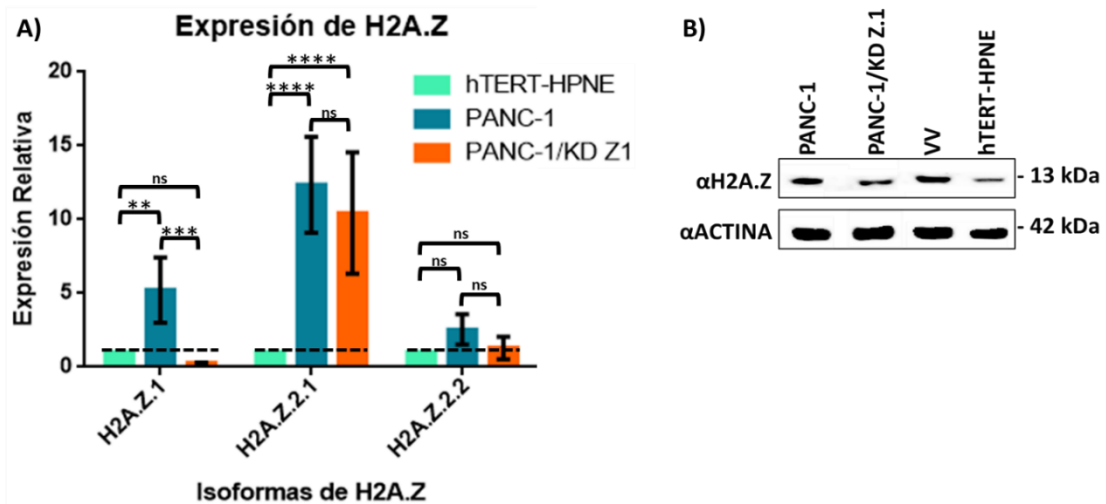


Figura 20. Evaluación del nivel de expresión de H2A.Z en la línea PANC-1/KD-Z.1 a nivel de población. A) Evaluación de los niveles de expresión de cada una de las isoformas de H2A.Z (Z.1, Z.2.1, Z.2.2) para cada una de las líneas celulares. Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a los niveles obtenidos de la línea hTERT-HPNE. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de dos experimentos independientes con triplicados de cada muestra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **B)** Evaluación de los niveles de H2A.Z en la línea celular de cáncer de páncreas (PANC-1), la línea celular KD-Z.1 (PANC-1/KD-Z.1), la línea PANC-1 transducida sólo con el vector vacío (VV) y la línea de páncreas no transformado (hTERT-HPNE) mediante WB. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga.

Los resultados sugieren que a este punto ya se contaba con una población celular heterogénea PANC-1/KD-Z.1. La heterogeneidad se debe a que durante la transducción no se controla si las células son o no alcanzadas por las partículas lentivirales, así como el número de copias de material exógeno que se integran en el genoma de la célula transducida o el sitio de la cromatina donde se inserta el material exógeno. Por lo que para tener una población homogénea se realizó una dilución limitada de la población celular

PANC-1/KD-Z.1. A partir de esta dilución se obtuvieron tres clonas, pero sólo una de ellas sobrevivió y se logró propagar, por lo que el resto del proyecto se llevó a cabo con esta única clona. A este cultivo celular se le denominó como “Clona 1/KD-Z.1” o “C1/KD-Z.1”.

Para corroborar que la clona C1/KD-Z.1 presentaba un perfil *knock down* para la isoforma H2A.Z.1, se realizaron ensayos de RT-qPCR y WB. Como esperábamos, la clona C1/KD-Z.1 mostró una disminución significativa de los niveles expresión de transcrito de la isoforma H2A.Z.1 con respecto a la línea parental PANC-1 **Figura 21A**. Por otro lado, se observa una disminución en el nivel de expresión de la isoforma H2A.Z.2.1, pero con una significancia mucho menor ($p < 0.05$), mientras que no existe una disminución en los niveles de la isoforma H2A.Z.2.2. A su vez, esto también se evaluó a nivel de proteína, donde se observa que hay una disminución en los niveles totales de H2A.Z en la línea C1/KD.Z-1 con respecto a la línea parental PANC-1, así como al compararse con las líneas control PANC-1 transducida sólo con el vector vacío y con PANC-1 transducida con un shRNA no relacionado **Figura 21B**.

Todo lo anterior nos permite concluir que la línea C1/KD-Z.1 es una línea celular homogénea con un perfil *knock down* para la isoforma H2A.Z.1, por lo que entonces la empleamos para identificar los genes que son desregulados por la sobreexpresión de esta isoforma y así conocer su contribución en el adenocarcinoma ductal pancreático.

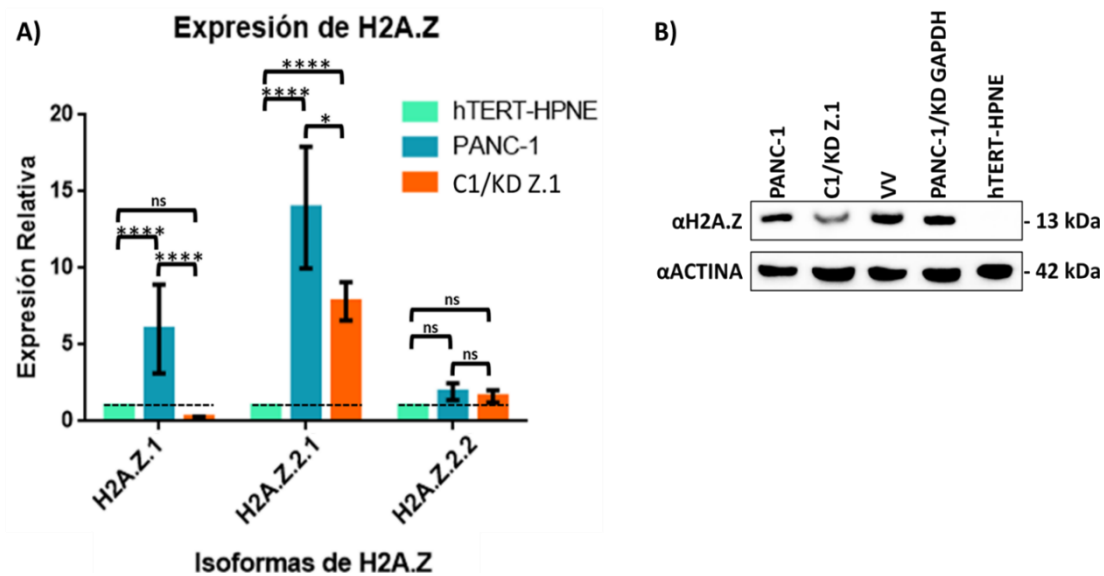


Figura 21. Evaluación del patrón de expresión de H2A.Z en la clona C1/KD-Z.1.

A) Evaluación de los niveles de expresión de cada una de las isoformas de H2A.Z (Z.1, Z.2.1, Z.2.2) para cada una de las líneas celulares. Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a los niveles obtenidos de la línea hTERT-HPNE. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de dos experimentos independientes con triplicados de cada muestra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

B) Evaluación de los niveles de H2A.Z en la línea celular de cáncer de páncreas (PANC-1), la línea celular KD-Z.1 (C1/KD-Z.1), la línea PANC-1 transducida sólo con el vector vacío (VV), la línea PANC-1 transducida con un shRNA no relacionado (PANC-1/KD-GAPDH) y la línea de páncreas no transformado (hTERT-HPNE) mediante WB. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga.

El KD de H2A.Z.1 altera la proliferación celular

Una vez que corroboramos que la línea C1/KD-Z.1 tenía niveles bajos de expresión de la isoforma H2A.Z.1, comenzamos a propagarla. Al crecer estas células observamos que crecían más lentamente que la línea parental PANC-1 **Figura 22**, aun cuando ambos cultivos se habían iniciado al mismo tiempo y partieron del mismo número de células. Para explicar esta diferencia en la tasa de crecimiento existían dos posibilidades: una de ellas es que la activación de la apoptosis indujera la muerte de las células y la segunda es que se hubiera producido una alteración en la proliferación que generara un alentamiento del ciclo celular en la línea celular C1/KD-Z.1.

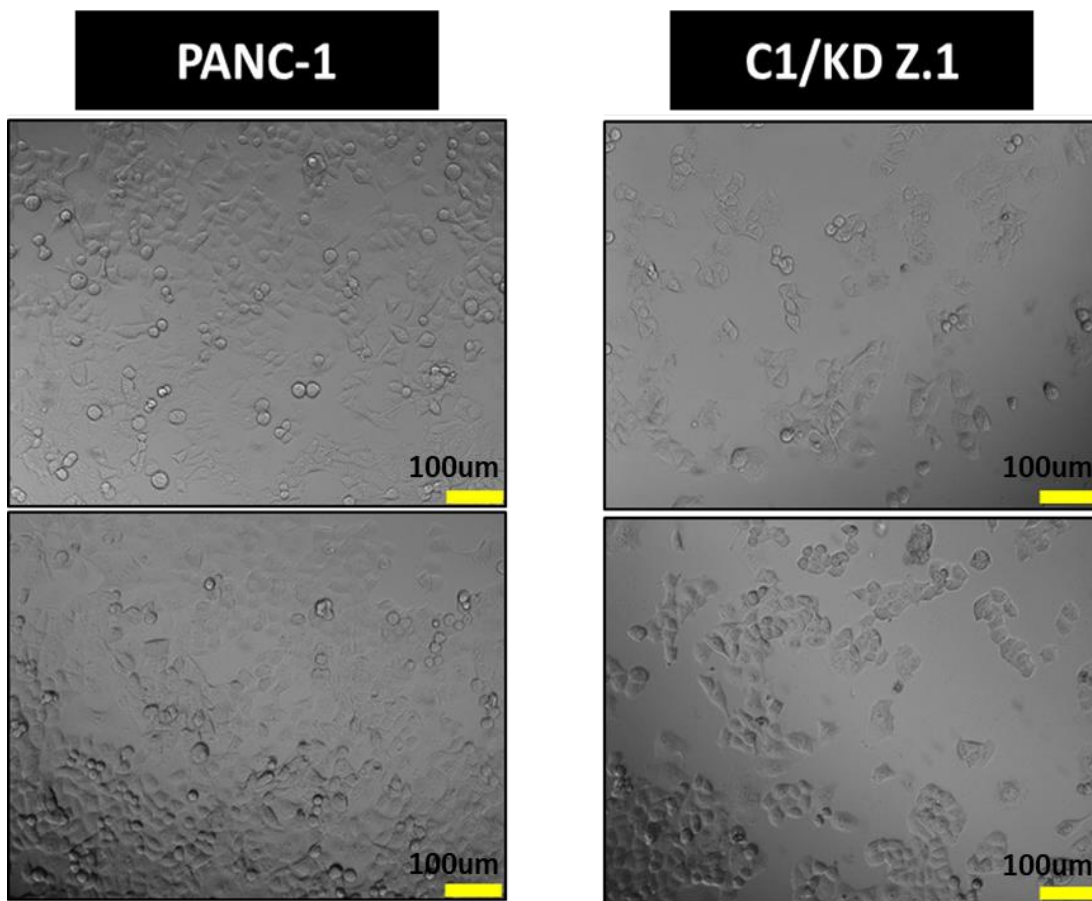


Figura 22. Diferencia en la densidad celular entre las líneas PANC-1 y C1/KD-Z.1. En la imagen se observa una diferencia en la cantidad de células presentes, aun cuando se sembraron el mismo número de células. Cada imagen representa un cultivo independiente. Las fotos se tomaron a las 96 horas de haber sembrado 5×10^3 células por pozo. La barra de medición representa una longitud de 100 μm .

Para saber si la muerte celular programada, la apoptosis, era la responsable del menor número de células observado en la clona C1/KD-Z.1, se realizaron ensayos de Western Blot contra proteínas que participan en la apoptosis **Figura 23**. Por lo que inicialmente, evaluamos el procesamiento de la caspasa 3, la cual es una caspasa maestra que requiere ser escindida para actuar sobre sus sustratos y así dar inicio al proceso de apoptosis⁵⁰. Así mismo se evaluó la presencia de PARP, ya que PARP es un sustrato de la caspasa 3 activa (procesada). Además de que PARP es una proteína asociada a la reparación del DNA y que al ser escindida pierde su función, propiciando así señales de activación de apoptosis⁵¹. Finalmente, se evaluó la presencia de survivina, la cual es un regulador negativo de la apoptosis al interactuar con la caspasa 3 y evitar así su activación⁵². Sin embargo, como se observa en la imagen, no hay presencia de alguna banda correspondiente al peso molecular de la caspasa 3 procesada, PARP procesada y, por el contrario, se observó en las tres líneas celulares la presencia de survivina.

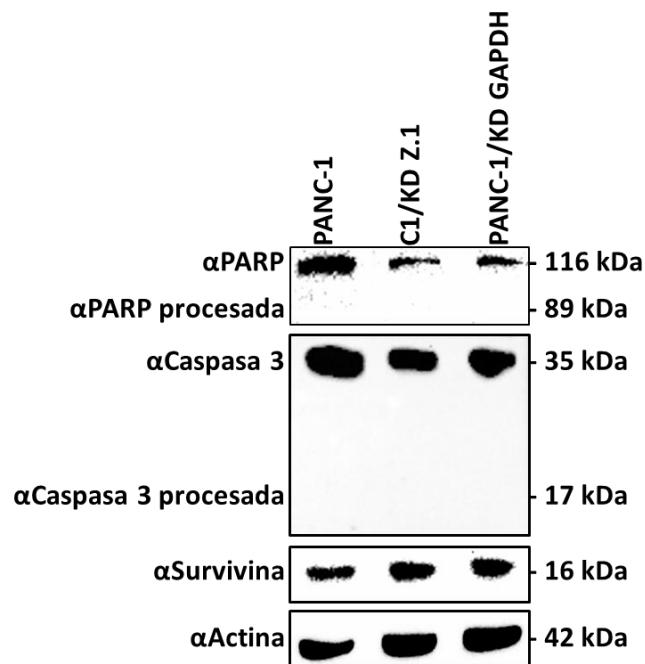


Figura 23. El KD de la isoforma H2A.Z.1 no induce la activación de la apoptosis. Extractos totales de las líneas celulares PANC-1, C1/KD-Z.1 y PANC-1/KD-GAPDH fueron analizadas por WB para identificar la presencia de Caspasa 3 procesada, PARP, PARP procesada y Survivina; estas en respuesta a apoptosis. La actina fue usada como control de carga.

Por lo que todos estos resultados sugieren que la apoptosis no es el mecanismo responsable de la menor tasa de crecimiento observado en la línea C1/KD-Z.1, por lo que para averiguar si esto se debía a que había un problema en la proliferación celular, se realizó una cinética de crecimiento usando la línea parental (PANC-1), la línea KD para la isoforma H2A.Z.1 (C1/KD-Z.1) y la línea control transducida con un shRNA no relacionado (PANC-1/KD-GAPDH). Para la cual se sembraron 5×10^3 células de cada línea celular en placas de 24 pozos y se contó el número de células cada 24 horas durante cinco días. Como se aprecia en la **Figura 24A**, una diferencia significativa en el número de células se apreció a las 72 horas de la cinética. Sin embargo, la diferencia más significativa se apreció a las 120 horas cuando la línea C1/KD-Z.1 presentó un menor número de células con respecto a la línea parental y a la línea control de aproximadamente tres veces. Estos resultados se corroboraron mediante un ensayo clonogénico **Figura 24B**, en donde nuevamente se obtuvo un menor número de colonias en la línea C1/KD-Z.1 con respecto a la línea parental, lo cual se corroboró al cuantificar el colorante cristal violeta que se unió a las colonias que crecieron de la línea parental en comparación con las células KD C1/KD-Z.1, en donde la absorbancia fue seis veces mayor para PANC-1 que el de la clona C1/KD-Z.1.

Finalmente, para demostrar la viabilidad de las líneas celulares, se realizó un ensayo de MTT, partiendo del mismo número de células para las tres líneas celulares y realizando su medición cada 24 horas. Como se observa en la gráfica que se muestra en la **Figura 24C**, se presentó una menor absorbancia en la línea celular C1/KD-Z.1 desde las 48 horas, lo cual fue evidente a las 120 horas al compararla con la línea celular parental y la línea control. Al comparar el ensayo de MTT con la cinética de crecimiento **Figura 24A**, podemos observar que ambas gráficas muestran una tendencia muy similar, lo cual se puede traducir en que a pesar de que la línea C1/KD-Z.1 presente un menor número de células durante la cinética, presenta una actividad metabólica proporcional a la cantidad de células. Todos estos resultados sugieren que la menor tasa de proliferación de la clona C1/KD-Z.1

podría deberse a una alteración durante la replicación del DNA, que estaría afectado su progreso a lo largo del ciclo celular.

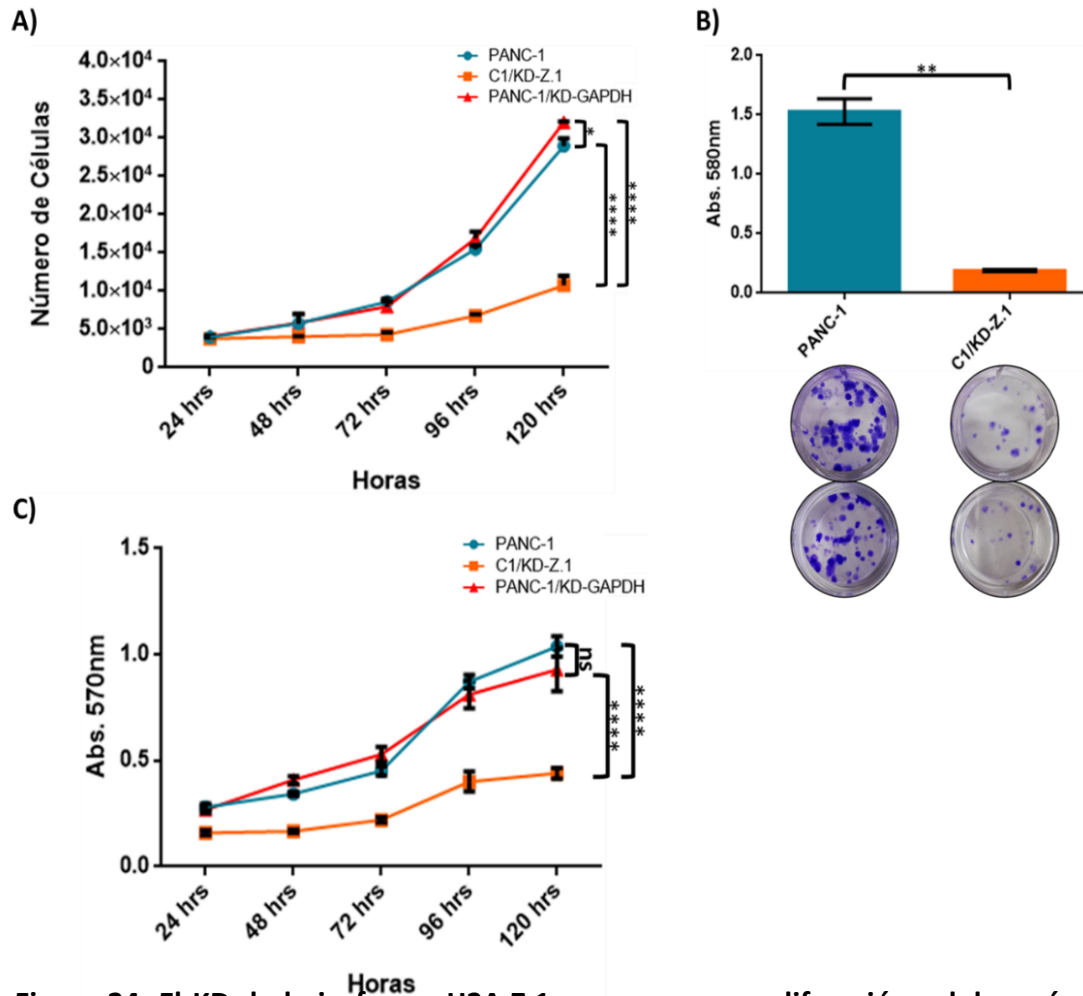


Figura 24. El KD de la isoforma H2A.Z.1 provoca una proliferación celular más lenta.

A) Gráfica que representa la cinética de crecimiento. El número de células se evaluó cada 24 horas por 5 días. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes con triplicados de cada muestra. **B)** Imagen que representa el ensayo clonogénico. En las fotografías inferiores se muestran el número de clonas. En la gráfica superior se observa el resultado de la medición de absorbancia del cristal violeta a 580 nm. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de dos experimentos independientes. **C)** Gráfica que representa el ensayo metabólico. La absorbancia se midió cada 24 horas por 5 días. Los datos son representativos y muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes con triplicados de cada muestra. En la figura se presentan la línea celular de cáncer de páncreas (PANC-1), la línea celular KD-Z.1 (C1/KD-Z.1) y la línea PANC-1 transducida con un shRNA no relacionado (PANC-1/KD-GAPDH). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Para identificar específicamente en qué fase del ciclo celular se encuentra la alteración que está afectando la proliferación celular de la clona C1/KD-Z.1, se realizó un ensayo de incorporación de Bromo-dUridina, lo que nos permitiría saber si existe alguna alteración en la síntesis del DNA, mientras que el marcaje con yoduro de propido nos permite conocer la cantidad de DNA en las células. Para este ensayo las células se evaluaron a las 0 horas, 72 horas y 120 horas post-sincronización, pues en estos últimos dos puntos fue donde se observó una mayor diferencia en el número de células durante la cinética de crecimiento **Figura 24A**.

Como se observa en la **Figura 25**, para el caso de la línea celular C1/KD-Z.1 existe un mayor porcentaje de células que se encuentra en la fase G1 y un menor porcentaje de células tanto en fase S como en fase G2, en comparación con la línea PANC-1 y la línea control PANC-1/KD-GAPDH. El aumento en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G1 se pudo observar tanto a las 72 horas como a las 120 horas post-sincronización. Estos resultados nos sugirieron que el *kock down* de H2A.Z.1 contribuye a que se genere un retraso en el ciclo celular debido a un arresto en la progresión del punto de control G1/S.

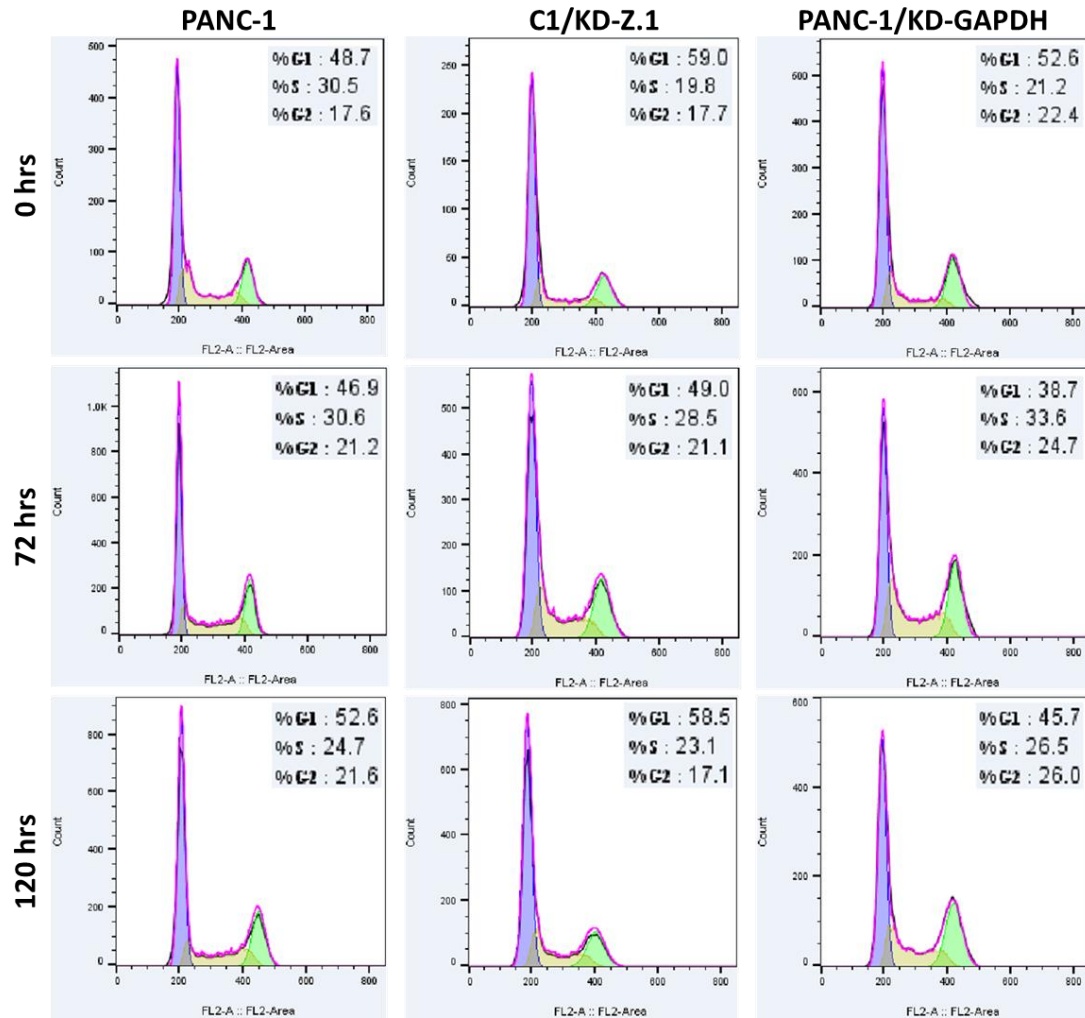
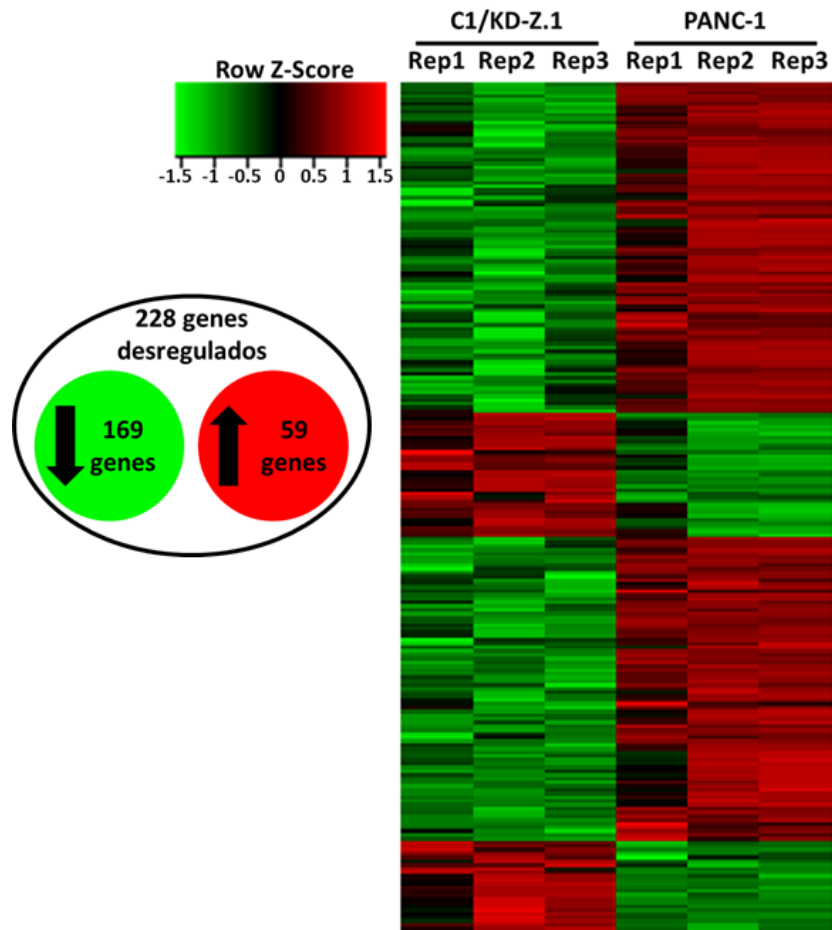


Figura 25. El KD de la isoforma H2A.Z.1 induce un retraso en la progresión de la fase G1/S. Ensayo de progreso del ciclo celular mediante la incorporación de BrdU y marcaje del DNA con IP de las líneas celulares PANC-1, C1/KD-Z.1, PANC-1/KD-GAPDH a las 0hrs, 72 hrs y 120hrs después de la sincronización, realizada al eliminar el SFB del medio por 24 hrs. Los datos son representativos un único experimento independiente.

La línea celular PANC-1 y la línea celular C1/KD-Z.1 poseen perfiles transcripcionales distintos

Finalmente, para poder evaluar los genes que son desregulados, tanto directa como indirectamente, por la sobreexpresión de la isoforma H2A.Z.1 se realizaron los análisis de microarreglos de transcriptoma completo de tres replicas biológicas tanto de la línea celular PANC-1 como de la línea celular C1/KD-Z.1. De este análisis se identificaron 24399 genes diferencialmente expresados (DEG), de los cuales al establecer un punto de corte de $p < 0.005$ y un “*Fold Change*” < -1.5 y > 1.5 nos quedamos solamente con 228 genes, de los cuales 169 genes se encuentran disminuidos en su expresión y 59 genes se encuentran sobreexpresados, esto lo podemos observar en la **Figura 26** donde se presenta el heatmap de los genes diferencialmente expresados y se remarca que existe un patrón particular y diferencial entre la clona C1/KD-Z.1 y la línea parental PANC-1.



Para conocer la relevancia funcional de estos genes diferencialmente expresados entre PANC-1 y la clona C1/KD-Z.1, estos 228 genes desregulados se introdujeron en la base de datos “*DAVID*” (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) para realizar un análisis de ontología de genes (GO) y así poder identificar los procesos biológicos que se encuentran desregulados, tanto al alza como a la baja^{53, 54}. En la **Figura 27A** se muestran los procesos biológicos desregulados que presentaron un valor de $p < 0.05$.

Este análisis indicó que los mRNAs que se encuentran aumentados en la C1/KD-Z.1 están asociados al inicio de la replicación del DNA, reparación del DNA, transición de la fase G1/S del ciclo celular y síntesis del DNA asociada a reparación. Estos procesos se esperaba que estuvieran alterados según los resultados observados en la cinética de crecimiento **Figura 24** y en los análisis de ciclo celular **Figura 25**, donde se observó una alteración en los procesos que regulan la proliferación celular, específicamente en el paso de la fase G1 a la fase S, pero la expectativa es que estos procesos se encontraran disminuidos y no aumentados como se observó en la **Figura 27A**. Brevemente, ya se ha reportado que al encontrarse sobreexpresados reguladores positivos de la replicación del DNA estos son capaces de inducir a un fenotipo de senescencia. Esto se describirá a profundidad en la discusión.

Con respecto a los mRNAs que se encuentran disminuidos, estos se encuentran asociados a procesos como la regulación de la transcripción, regulación de la proliferación celular, vía de señalización asociada al TGF- β , comunicación celular, mantenimiento de células troncales, entre otros, los cuales son procesos que podríamos asociar con una célula no transformada.

Figura 26. Existe una expresión diferencial de genes entre las líneas PANC-1 y C1/KD-Z.1. Heatmap del perfil de expresión de 228 genes diferencialmente expresados entre las líneas PANC-1 y C1/KD-Z.1. Los genes sobreexpresados se muestran en rojo (59 genes) y los genes disminuidos se muestran en verde (169 genes). Tres replicas biológicas son mostradas. Los genes presentan una $p < 0.005$ y un $FC < -1.5$ y > 1.5 .

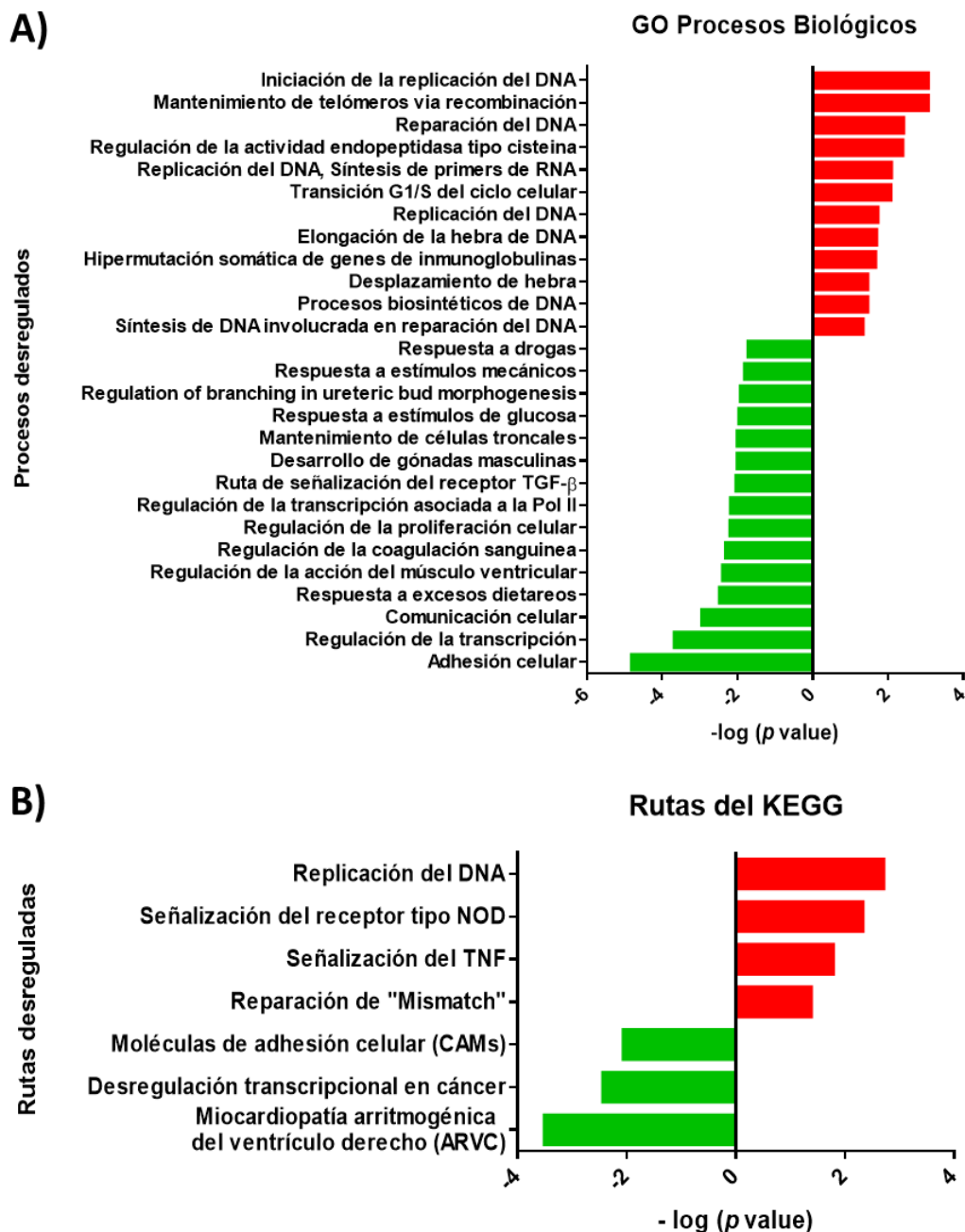


Figura 27. Procesos y vías de señalización alteradas por la expresión diferencial de genes (DEG) en la C1/KD-Z.1. A) Ontología de genes (Procesos biológicos) de los genes diferencialmente expresados en C1/KD-Z.1. Los procesos biológicos sobreexpresados se muestran en rojo y los procesos biológicos disminuidos se muestran en verde. Los grupos enriquecidos tienen un valor de $p < 0.05$. **B)** Rutas biológicas a las que pertenecen los genes diferencialmente expresados en C1/KD-Z.1. Las rutas biológicas sobreexpresadas se muestran en rojo y las rutas biológicas disminuidas se muestran en verde. Los grupos enriquecidos tienen un valor de $p < 0.05$.

Finalmente, con base en las vías de señalización del “KEGG” (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) se identificaron las vías biológicas en las cuales se encuentran participando estos genes desregulados ^{55, 56, 57}. En la **Figura 27B** se puede resaltar que se encontró que vías como la replicación del DNA y reparación del DNA se encuentran sobreactivadas en la línea C1/KD-Z.1, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la ontología de genes. Por otro lado, en las vías que se encuentran disminuidas se puede remarcar la presencia de la vía de desregulación transcripcional en cáncer, lo cual estaría respaldando los resultados observados en la literatura sobre la participación de la isoforma H2A.Z.1 en el desarrollo de distintos tipos de cáncer.

DISCUSIÓN

El Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC), es uno de los tipos de cáncer de mayor importancia, ya que en el 2018 se ubicó a nivel mundial en el 11^{vo} lugar en incidencia (afectando a ~ 458,000 individuos) y en el 7^{mo} lugar en mortalidad (muriendo ~ 432,000 de los afectados), lo que se traduce en una fatalidad del 94.32%. Por otro lado, México se ubicó como el 4^{to} país con mayor incidencia en América, con un índice de fatalidad de 0.96. Es decir, se estima que el 96% de los pacientes diagnosticados mueren en un periodo de alrededor de 2–6 meses, mientras que sólo del 4 al 5% de los pacientes presentan una sobrevida de cinco años^{3, 5}.

El inicio y la progresión del PDAC se han asociado con la acumulación de alteraciones genéticas bien caracterizadas, pero hasta hace poco se demostró la contribución de los mecanismos epigenéticos en este proceso¹⁹⁻²⁴. Hasta la fecha, de los siete mecanismos epigenéticos descritos en eucariontes (Metilación del ADN, modificaciones postraduccionales en las histonas, las variantes de histonas, la presencia de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, los RNAs no codificantes, la proteólisis del extremo amino terminal de la histona H3 y la arquitectura nuclear), solamente se ha estudiado la participación de la metilación del DNA, las PTMs de histonas y los ncRNAs^{25, 26}. Sin embargo, para otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama⁵⁸, próstata⁵⁹ y vejiga⁶⁰; ya se ha estudiado la participación de la variante de histona H2A.Z y en casos como el de hepatocarcinoma incluso se determinó que la isoforma que contribuye al desarrollo de este cáncer es la H2A.Z.¹³⁵. Mientras que, en melanoma se estableció que la isoforma H2A.Z.2.1 es la orquestadora de la desregulación de genes del ciclo celular⁴⁹.

En lo que atañe al PDAC, no se había realizado ningún estudio sobre la participación de H2A.Z en la aparición y progresión de este tipo de cáncer. No fue hasta que en nuestro grupo de trabajo se determinó que los niveles de la proteína H2A.Z, estaba incrementada tres veces en líneas celulares

provenientes de cáncer de páncreas con respecto a una línea celular de páncreas no transformado, así como en biopsias de pacientes con esta enfermedad. Posteriormente, mediante RT-qPCR se identificó que las tres isoformas de H2A.Z se encontraban sobreexpresadas con respecto al tejido de páncreas no transformado ⁶². Sin embargo, aún faltaba entender cuál era la contribución de cada una de las isoformas en la aparición del PDAC.

Por lo que con el objetivo de empezar a averiguar la contribución de cada una de estas isoformas en el desarrollo del PDAC, es que en este trabajo se buscó identificar la influencia que tiene la sobreexpresión de la isoforma H2A.Z.1 en la desregulación de genes en el PDAC.

Participación de H2A.Z en el PDAC

En un estudio previo realizado en el laboratorio donde se obtuvo el *knock down* de las tres isoformas de H2A.Z en la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1. Se encontró que la disminución en los niveles de expresión de las tres isoformas de H2A.Z inducen un fenotipo senescente, arresto del ciclo celular en la transición G2/M, un incremento en los niveles de expresión del inhibidor de CDKN2A, alteración en la expresión de genes asociados al control del ciclo celular y reparación de DNA. Además, la deficiencia de la variante H2A.Z propició la reducción del tamaño de tumores en modelos *in vivo* y sensibilizó a las células de PDAC al tratamiento con gemcitabina. Por lo que, todos estos datos sugirieron que la sobreexpresión de las tres isoformas de H2A.Z permite a las células sobrepasar la barrera oncoprotectora que representa la senescencia, favoreciendo el desarrollo del PDAC y la quimioresistencia⁶².

Sin embargo, aún permanece la pregunta ¿Cómo contribuye cada una de estas isoformas para generar este fenotipo?

En este trabajo, tras generar la línea *knock down* para la isoforma H2A.Z.1 denominada C1/KD-Z.1, observamos que había un menor número de células en la línea *knock down* con respecto a la línea parental PANC-1 y a la

línea control PANC-1/KD-GAPDH, aun cuando se inició el cultivo con el mismo número de células. Para explicar esta diferencia en la cantidad de células existían dos posibilidades: 1) que las células entraran en apoptosis o 2) que existiera un arresto en el ciclo celular.

Para demostrar si las células se dirigían a una muerte celular programada (apoptosis), se evaluaron mediante Western Blot tres proteínas distintas que se encuentran regulando este proceso **Figura 23**. Los resultados obtenidos, sugieren que el *knock down* de H2A.Z.1 no propicia la activación de la apoptosis. Esto contrasta con trabajos previos ^{35 61} donde mediante la generación de líneas *knock down* se evaluó la participación de la isoforma H2A.Z.1 en dos tipos distintos de cáncer de hígado: carcinoma hepatocelular (HCC) y colangiocarcinoma intrahepático (ICC). A pesar de enfocarse en la misma isoforma en la que se basa nuestro trabajo, en estos dos trabajos se sugiere que el KD de Z.1, propicia que las células se conduzcan a apoptosis, ya que en ambos casos se observa el procesamiento de la caspasa 3, generando así una caspasa activa que puede actuar sobre sus sustratos ⁵⁰. En el caso del ICC se observa una disminución de Bcl-2 que es un regulador negativo de la apoptosis, un aumento de la porina Bak y de la caspasa 9 que es la encargada de activar a la caspasa 3 ⁶¹. Mientras que, en el HCC se observó el procesamiento de PARP alterando así la reparación del DNA ³⁵.

Sin embargo, los resultados que obtuvimos en el presente trabajo difieren de los reportados ^{35 61} por lo que, para conciliar estas diferencias, nosotros sugerimos que el efecto que tiene H2A.Z.1 podría depender del órgano y tipo de cáncer en el que participa. Además de que en PDAC, nosotros encontramos que se sobreexpresan las tres isoformas mientras que, en los trabajos realizados en el cáncer de hepático, así como en el de colangiocarcinoma intrahepático no se determinó si las otras dos isoformas están presentes. Por lo que de no existir las otras dos isoformas la transformación dependería solamente de la expresión de una de ellas.

Por otro lado, para poder atribuir que el lento crecimiento de la línea C1/KD-Z.1 se debía a una menor proliferación celular se realizó una cinética de crecimiento, un ensayo clonogénico y un ensayo de MTT. Todos estos ensayos mostraron que la línea parental PANC-1 presentaba una proliferación más rápida que la línea KD de H2A.Z.1. Algo muy similar fue reportado por Kim y colaboradores ⁶⁰, donde evaluaron la participación de la sobreexpresión de H2A.Z en cáncer de vejiga. Ellos demostraron que había una correlación entre la sobreexpresión de H2A.Z y la proliferación celular en la línea celular de cáncer de vejiga LD611 (que sobreexpresaba H2A.Z), con respecto a la línea no transformada UROtsa, siendo la primera de ellas la que presentaba una mayor proliferación. Estos resultados los respaldaron con dos experimentos distintos al realizar la expresión ectópica de H2A.Z en la línea UROtsa y compara la cinética de proliferación con la línea UROtsa transfectada con el vehículo, así como al generar el KD de H2A.Z en la línea LD611 y comparar con la línea LD611 transducida con un “*shRNAscrambled*”. En ambos casos se observó una mayor proliferación para la línea que presentaba los niveles más elevados de H2A.Z, lo que les permitió sugerir que H2A.Z ejerce una función clave en el control de la proliferación. Adicionalmente, este comportamiento ya ha sido reportado en otros cánceres ^{35, 61, 49}.

Arresto en la transición G1/S induce un retraso en el ciclo celular

Una vez que observamos una alteración en la proliferación celular, era importante identificar si esto se debía a un problema durante la replicación del DNA. Con este propósito, realizamos un ensayo de incorporación de BrdU y marcaje con yoduro de propidio, para finalmente evaluar las células por citometría de flujo. En estos resultados, logramos observar que en la línea *knock down* C1/KD-Z.1 había un mayor porcentaje de células en fase G1 en comparación con la fase S y G2 del ciclo celular, lo cual nos indica que la disminución de los niveles de H2A.Z.1 generan un arresto en el punto de

control G1/S afectando así el progreso de la línea C1/KD-Z.1 a lo largo del ciclo celular.

Este mismo resultado ya había sido reportado anteriormente por Dhillon y colaboradores en el 2006, quienes emplearon cepas de levadura en donde se eliminó el gen de H2A.Z (*htz1Δ*), observaron que las células KO presentaban un retraso en el proceso de replicación con respecto a las cepas WT. Además, demostraron que este retraso se debía a un problema en el inicio de la replicación y no a un alentamiento durante la elongación. Este grupo fue el primero en reportar que H2A.Z se encuentra regulando directamente la expresión de genes que controlan la progresión del ciclo celular, como las cinasas dependientes de ciclina *CLN2* y *CLB5*; así como la disminución de reguladores negativos como Sic1p y Rad53p⁶³.

Sin embargo, este arresto en la fase G1 no solamente puede ser atribuido a la isoforma H2A.Z.1, ya que Vardabasso reportó que la disminución de la expresión de H2A.Z.2 en líneas celulares de melanoma, provocó una reducción en la proliferación, marcada por un arresto en la transición G1/S del ciclo celular, definida por la disminución de la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb) y la disminución de la expresión de las ciclinas E y A, reguladoras positivas del ciclo celular ⁴⁹.

Esta diferencia en la isoforma que se encuentra regulando los mismos procesos celulares respalda la propuesta anteriormente hecha sobre la heterogeneidad de H2A.Z dependiendo del tipo de cáncer del que se trate.

En conclusión, hasta este punto, tanto los antecedentes como nuestros resultados nos estarían sugiriendo que la sobreexpresión de H2A.Z.1 en el PDAC podría estar participando en regular la expresión de reguladores positivos del ciclo celular.

La disminución en los niveles de expresión de la isoforma H2AZ.1 promueve la sobreexpresión de genes implicados en el metabolismo del DNA

Con el propósito de identificar qué genes son desregulados exclusivamente debido a la sobreexpresión de la isoforma H2A.Z.1, se realizó la extracción de RNA total de tres cultivos independientes de la línea parental PANC-1 y la línea *knock down* C1/KD-Z.1. Estos RNAs fueron empleados para realizar los microarreglos de transcriptoma completo y comparar el perfil transcripcional de ambas líneas celulares. En los resultados se identificaron sobreexpresados procesos biológicos como: la iniciación de la replicación del DNA, reparación del DNA, síntesis de *primers* de RNA para replicación, transición G1/S, elongación de la hebra de DNA, biosíntesis de DNA. Todos estos datos indicaban que la sobreexpresión de H2AZ impactaba preferentemente en varios mecanismos implicados en el metabolismo del DNA. Este resultado sumamente inesperado indicaba que al menos en el cáncer de páncreas la isoforma H2AZ.1 participa de manera diferente a lo ya reportado, probablemente porque en este cáncer las otras dos isoformas H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2 también contribuyen con el desarrollo de esta enfermedad.

Para entender cómo la sobreexpresión de estos genes impacta en el en el arresto del ciclo celular, describiremos la función general de cada uno de estos.

a) CDC6

Entre los genes sobreexpresados asociados a la replicación del DNA se encuentra *CDC6*, que fue identificado por primera vez en levaduras y se observó que, cuando este gen era mutado inducía el arresto del ciclo celular⁶⁴. Casi dos décadas después Williams identificó un homólogo de *CDC6* en humano⁶⁵ y actualmente se sabe que *CDC6* está conservado en cada organismo eucariote y que su expresión es controlada por los factores de transcripción RB/E2F^{66, 67, 68}, ejerciendo así la regulación de la replicación al

controlar el ensamblaje del complejo prereplicativo (pre-RC) en la parte final de la fase G1 del ciclo celular ^{69 70}. Una vez que se ha formado el pre-RC y una vez que se han activado las CDKs promotoras de la fase S, estas CDKs fosforilan a CDC6 promoviendo su translocación del núcleo al citoplasma ⁷¹. Esta deslocalización de CDC6 del núcleo al citoplasma es importante porque evita la reactivación del origen de replicación dentro del mismo ciclo celular, impidiendo así la re-replicación del DNA e hiperploidía celular ^{72, 73}. Una vez que CDC6 es llevado al citoplasma este es ubiquitilado y degradado por el complejo proteosoma ^{74, 75}.

Además, CDC6 es capaz de interactuar con la ciclina A2, la cual a su vez se une y activa a las cinasas Cdk1 y Cdk2 promoviendo de esta forma la transición de la fase G1 a la fase S. Considerando las funciones que tiene CDC6 en la replicación y en la transición de las fases G1/S del ciclo celular no es raro que su desregulación tenga un impacto negativo en la integridad del genoma.

Además, se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína conduce a una replicación forzada que contribuye a generar inestabilidad genómica conduciendo a la progresión de una fase S ineficiente y fomentando rearrreglos cromosomales aberrantes, todo esto ocasionado por una replicación imperfecta ^{76, 77, 78}. Se ha propuesto que esta replicación imperfecta es capaz de generar estrés celular e inducir el estancamiento o colapso de las horquillas de replicación, activando la respuesta de daño al DNA (DDR) y de esta forma conduce a las células a un estado de senescencia ^{79, 80, 81}.

Tomando como base estos antecedentes y para explicar los resultados obtenidos en los microarreglos, nosotros proponemos que la disminución en la expresión de la isoforma H2A.Z.1 promueve una replicación aberrante del DNA, que conlleva a inestabilidad genómica y daño al DNA, lo que podría conducir a las células a un fenotipo de senescencia y de esta forma explicar porque la clona C1/KD-H2A.Z.1 presenta una menor tasa de proliferación. Aunado a lo anterior, si tomamos en cuenta que CDC6 también interactúa

con a ciclina A2, al encontrarse desregulada CDC6 podría tener preferencia por unirse a las proteínas que participan en la replicación como ORC1, PRC2, MCM3 y MCM7 y no interaccionar con la ciclina A2 y de esta forma ya no conduciría a que la células C1-KD-Z.1 se quede arrestada en la fase G1, por lo que para demostrarlo tendríamos que realizar un WB utilizando el anticuerpos dirigido contra la ciclina E.

b) EXO1

En los resultados obtenidos a partir de los microarreglos también se observaron niveles incrementados de genes asociados a la reparación del DNA, deslocalización de la hebra de DNA y síntesis del DNA, tres procesos en donde se encuentra involucrado el gen *EXO1*, sugiriéndolo como un gen importante.

La exonucleasa 1 (Exo1), como su nombre lo menciona, posee una actividad exonucleasa 5'→3' que contribuye en la regulación de los puntos de control y en diversas vías de reparación, por ejemplo, reparación de *mismatch* (MMR), síntesis de DNA asociada a translesión (TLS), reparación por escisión de bases (NER), reparación de rupturas de doble hebra (DSB) y reinicio de horquillas de DNA estancadas⁸²⁻⁸⁷. Todos los tipos de daño anteriormente mencionados son capaces de inducir la respuesta de daño al DNA (DDR) lo que ocasiona el arresto del ciclo celular y la expresión de genes necesarios para la reparación⁸⁸.

En lo que respecta al papel de EXO1 en las lesiones del DNA, se sabe que estas deben ser procesadas por nucleasas para generar DNA de una hebra (ssDNA)⁸⁹. Por ejemplo, en humanos el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) colabora con Exo1 en generar tramos de ssDNA al final de las DSB para un proceso de reparación por recombinación homóloga⁹⁰⁻⁹⁴. En este punto el ssDNA es cubierto por la proteína de replicación A (RPA)⁹⁵, que recluta a la cinasa ATR⁹⁶. Posteriormente, el complejo *clamp* Rad17-Mec3-Ddc1) y el complejo de carga "*clamp loader*" (Rad24-RFC) son requeridos para la reparación del DNA. Lo que a su vez que permite activar al mediador Rad9⁹⁷

y este a su vez a la cinasa Rad53, así como a la cinasa del punto de control 1 (Chk1) ^{98, 99}. Una vez que Rad53 es hiperfosforilada es capaz de frenar la progresión del ciclo celular e inducir la reparación del DNA¹⁰⁰, por lo que su sobreexpresión podría conducir a una catástrofe replicativa y arresto del ciclo celular.

Otro papel de Exo1 en el arresto del ciclo celular y para la reparación del daño al DNA, atañe al mantenimiento de los telómeros. Los telómeros ejercen un efecto protector que asegura la estabilidad genómica protegiendo a los cromosomas de su degradación, recombinación y/o fusión¹⁰¹. El DNA telomérico consta de una región de dsDNA con repeticiones en tándem del tipo AGGGTT, el cual se extiende hasta fuera del duplex creando un pequeño ssDNA 3' sobresaliente¹⁰². A esta hebra de DNA se le une la proteína Pot1, que protege los extremos teloméricos y permite el reclutamiento del complejo shelterina¹⁰³.

El mantenimiento disfuncional de los telómeros y/o el acortamiento de estos desencadenan la respuesta de daño al DNA, de manera similar al que se genera por la ruptura del DNA de doble cadena (DSB), lo que podría conducir a senescencia como un mecanismo supresor de tumores ^{104, 105}. Morin y colaboradores demostraron el papel de los telómeros en la activación del sistema de reparación. Se observó que Exo1 es capaz de crear ssDNA en telómeros descubiertos “*uncapped*” y que esta acumulación de ssDNA activa la respuesta de las proteínas reguladoras del punto de control, resultando en el arresto del ciclo celular. También propusieron que Exo1 es fosforilado e inactivado por Rad53, generando un ciclo de retroalimentación negativa para limitar los fragmentos de ssDNA y daño al DNA¹⁰⁶.

Por lo que tomando en base las funciones de Exo1 y que en este trabajo la encontramos sobre expresada en la clona KD para la isoforma H2A.Z.1, nosotros proponemos que su sobreexpresión en lugar de que ayude a reparar el daño celular exagera el daño al DNA, por lo que la célula al tratar de reparar este daño arresta el ciclo celular como un mecanismo oncoprotector.

RFC5

En la sección anterior ya se mencionó al RFC (Factor de replicación C) como un modulador de punto de control asociado a la respuesta de daño al DNA. El RFC es un complejo proteico de unión a DNA que actúa en el reconocimiento de los “*primer*” o cebadores de RNA para que la DNA polimerasa lleve a cabo la replicación del DNA¹⁰⁷ Sin embargo, también juega un papel importante en procesos asociados a la reparación del DNA, en regular los puntos de control del ciclo celular y proliferación, así como en el crecimiento bajo estímulos de estrés¹⁰⁸

El RFC es un complejo formado por 5 subunidades RFC1 (140 kDa), RFC2 (40 kDa), RFC3 (38 kDa), RFC4 (37 kDa) y RFC5 (36 kDa)¹⁰⁹, altamente conservado en eucariotes¹¹⁰⁻¹¹³. Los distintos miembros del complejo RFC pueden estar involucrados en el mantenimiento de telómeros, reparación de *mismatch* y reparación por escisión de nucleótidos, dependiendo de las subunidades que se asocien y las proteínas con las que interactúen. Por ejemplo, el RFC puede cargar al antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) y a la DNA polimerasa para formar el complejo DNA-RFC-PCNA-DNA Pol, el cual elonga al DNA a lo largo del templado^{114, 115}.

Por otro lado, el RFC se puede unir a proteínas del punto de control del ciclo celular para iniciar la transducción de la señal de daño a DNA¹¹⁶. Se ha reportado que las subunidades RFC2-5 se pueden unir a la proteína Rad17, para formar el complejo pinza y parte del complejo que lo carga¹¹⁷, donde RFC5 es necesaria para abrir la pinza durante la replicación del DNA¹¹⁸. De igual forma, puede cargar al complejo Rad9-Hus-Rad1 al ssDNA para iniciar la señal de daño a DNA^{119, 120}. Por otro lado, se ha descrito la asociación con el factor de fidelidad de transmisión cromosómica 18 (Ctf18)-RFC y su papel al establecer la cohesión entre cromátides hermanas en la horquilla de replicación para prevenir la formación de triple hebra, evitando un retraso en las fases S y G2/M y promoviendo la estabilidad genómica¹²¹.

Específicamente, al interactuar RFC5 con Ctf18 pueden inhibir o estimular la síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular¹²²

Por sus características, resulta lógico que la sobreexpresión de RFC esté biológicamente activa en el desarrollo de diversos tumores malignos, jugando un papel en la regulación de la proliferación, progresión, invasión y metástasis^{123, 124}. Retomando los datos de la literatura y los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugerimos que la sobreexpresión de este factor conduce a una ineficiente síntesis del DNA, a un arresto del ciclo y daño al DNA, que en caso de que la célula no lo resuelva lo podría llevar a apoptosis, senescencia o cáncer.

Con respecto a este último punto ya se ha descrito que la sobreexpresión de RFC5 promueve el desarrollo de varios tipos de cáncer como: cáncer de cabeza y cuello y cáncer de próstata. Por lo que en caso de también aplicar para el KD de H2A.Z.1 en el tejido pancreático, la sobreexpresión de RFC5 conduciría a un proceso oncogénico¹²⁵.

c) *POLQ*

Otro gen que se encontró sobreexpresado en la línea C1/KD-Z.1 es *POLQ*, que codifica para la polimerasa theta (pol θ).

Las DNA polimerasas no sólo actúan en la replicación genómica del DNA (pols α , δ , ϵ), sino también en procesos de reparación del DNA y mantenimiento del genoma. En las células de mamíferos se han identificado a DNA polimerasas asociadas a la reparación por escisión de nucleótidos (pol β), replicación y reparación mitocondrial (pol γ) y a la reparación no homóloga (pols λ , μ , θ), así como a la tolerancia a daño por síntesis de translesión (pols η , ι , κ , ζ). Algunas de estas DNA polimerasas funcionan en más de una vía de procesamiento del DNA^{126, 127}.

Los mecanismos que principalmente utilizan las células eucariotas para la reparación de DSB son: recombinación homóloga (HR), en donde para reparar el daño al DNA emplea una copia de DNA no dañado^{128, 129, 130}, o la unión a

extremos no homólogos (NHEJ), la cual es la forma de reparación más común en las células de mamíferos y consiste en la unión de los extremos de DNA mediada por el complejo Ku70-Ku80, que inhiben el procesamiento de los extremos libres^{131, 132}. Si las rupturas no son reparadas por el mecanismo NHEJ entonces se emplean las nucleasas para generar ssDNA en los extremos 3'^{133, 134}.

La principal función de la pol θ es reparar el daño al DNA de doble cadena, donde un defecto en esta polimerasa tiende a conducir a la inestabilidad genómica. Una de las manifestaciones de tal inestabilidad es el incremento en la aparición de micronúcleos (MN)¹³⁵. Sin embargo, también se le han atribuido funciones asociadas a las horquillas de replicación, pues se ha visto que la expresión de la DNA *POLQ* correlaciona con la expresión de genes asociados al ciclo celular¹³⁶. Además de que la eliminación de pol θ en líneas celulares humanas altera considerablemente el tiempo de replicación¹³⁷, posiblemente como resultado de la participación continua en la reparación de daño endógeno ocasionado por el estancamiento de las horquillas. Esto es consistente con los reportes en donde células deficientes de pol θ pierden su capacidad de reponerse al estancamiento de las horquillas de replicación, e incluso desencadenan en el colapso de estas¹³⁸.

Adicionalmente, la pol θ es la única polimerasa conocida que incluye un dominio de helicasa, teniendo 7 motivos conservados de la superfamilia II de helicasas de DNA y RNA¹³⁹. Sin embargo, no ha habido evidencia alguna de su actividad helicasa¹⁴⁰, existiendo la posibilidad de llevar a cabo esta actividad sobre sustratos que aún no han sido probados o en conjunto con factores accesorios que desencadenen esta función.

Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de *POLQ* afecta la tasa de progresión de la horquilla de replicación, ya que un exceso de pol θ reduce la velocidad de la horquilla de replicación e induce daño al DNA, lo que conduce a la activación de punto de control de daño al DNA. Es decir que el daño al DNA puede ser consecuencia de una síntesis defectuosa del DNA¹⁴¹.

Por lo que la sobreexpresión de la pol θ podría conducir a una mala reparación, estancamiento de la horquilla y rearrreglos genómicos, lo que causaría una inestabilidad genómica que la célula puede resolver por entrar a apoptosis o a senescencia.

d) XRCC2

Finalmente, otro gene sobre expresado en la clona KD de H2AZ.1 es XRCC2. Esta proteína participa en la reparación de daño al DNA por recombinación homóloga y tiene una función importante en el mantenimiento de la estabilidad genética de las células. En particular, la proteína Rad51 está altamente conservada desde levaduras hasta humanos^{142, 143}, mientras que las mutaciones en esta causan severos defectos en recombinación e incrementa la sensibilidad de las células a agentes que dañan al DNA¹⁴⁴. Walker y colaboradores identificaron una secuencia motivo que se encuentra altamente conservada entre los miembros de esta familia¹⁴⁵, que ha sido ligada a la interacción con el ATP. En células somáticas de mamíferos hay cinco proteínas adicionales que forman parte de la familia de "Proteínas tipo Rad51": XRCC2, XRCC3, Rad51L1, Rad51L2 y Rad51L3¹⁴⁶.

El gene *XRCC2* fue identificado por su habilidad para complementar el fenotipo de sensibilidad a daño del DNA de la línea celular de hámster irs1^{147, 148, 149}. Esta línea celular es sensible a agentes como radiación ionizante, luz U.V., agentes alquilantes y agentes causantes del entrecruzamiento de DNA¹⁵⁰. Así mismo, esta línea presentó una alta inestabilidad genética espontánea con una incrementada frecuencia de mutaciones¹⁵¹, aberraciones cromosómicas¹⁵² y no disyunciones cromosómicas¹⁵³.

Anteriormente¹⁵⁴, se había especulado una asociación indirecta entre Rad51 y XRCC2. En el 2001 O'Regan y colaboradores¹⁵⁵ atribuyeron a XRCC2 el papel de establecer una conexión entre Rad51 y el DNA, siendo XRCC2 el encargado de localizar a Rad51 en los sitios de daño a DNA, observándose una disminución en la formación de focos de Rad51 en células deficientes de XRCC2.

Todos estos antecedentes sugerirían que en nuestra línea celular C1/KD-Z.1, efectivamente, hay una señal de daño al DNA y el aumento en la expresión de genes como *XRCC2* nos permitiría pensar que las células se encuentran en un proceso de reparación del DNA, provocado tal vez por una inestabilidad genómica.

En conclusión, los resultados obtenidos con el microarreglo y en base a los datos publicados en la literatura, nosotros esperaríamos que la clona C1/KD-Z.1, se comportara más como una célula transformada con una división celular descontrolada. Sin embargo, nuestros datos de cinética de crecimiento, clonogénico y MTT indican todo lo contrario. Entonces, ¿Cómo podemos conciliar nuestros resultados?

Según los resultados de transcriptoma obtenidos a partir de los microarreglos y tomando en cuenta los datos publicados en la literatura podemos sugerir lo siguiente:

Que la sobreexpresión de genes como CDC6 y polimerasa θ podrían provocar una enorme cantidad de proliferación que conduciría a que se perdiera el control sobre la replicación del DNA, lo que resultaría en múltiples inicios de replicación que surgen del mismo origen de replicación, lo que conduciría a una ineficiente progresión de la horquilla. De tal manera que la alta frecuencia de horquillas de replicación colapsadas o arrestadas activarían la respuesta de daño al DNA (EXO1, RFC5 y XRCC2), por ruptura del DNA de doble cadena o de una sola cadena por acortar los extremos de los telómeros. Para de esta forma activar los puntos de control ATR/ChK1, ATM/ChK2 y γ H2AX que conducen a un arresto del crecimiento y a reparación del DNA. Esta respuesta induce distintos mecanismos de reparación asociados a recombinación homóloga (HR), unión a extremos no homólogos (NHEJ), mantenimiento de telómeros, reparación de *mismatch* (MMR), entre otros; que con el fin de mantener la estabilidad cromosómica y generar un mecanismo oncoprotector induciría el arresto de la progresión de los puntos de control, deteniendo el ciclo celular lo que podría conducir a las células a un estado

conocido como senescencia o a transformación celular. A este proceso se le consideraría como un primer mecanismo de defensa para evitar proliferación descontrolada y transformación.

Sin embargo, en este punto del trabajo sólo podemos decir que la célula en donde la isoforma H2A.Z.1 fue disminuida no entra en apoptosis, por lo que aún queda abierta la pregunta si el fenómeno que está siendo inducido en la línea celular C1/KD-Z.1 por el estrés replicativo conduce a senescencia o tumorigénesis. Nosotros proponemos que para demostrar que realmente hay un daño al DNA provocado por estrés replicativo, deberían realizarse ensayos de WB en donde se determine si la histona H2AX esta fosforilada (γ H2AX), así como determinar si la proteína ChK2 también esta fosforilada en la Treonina 68 y los niveles de la proteína p53 fosforilada.

En el siguiente modelo se muestran las vías que podrían ser desreguladas por varios genes implicados en el ensamblaje del complejo de preinicio de la replicación (CDC6), en la elongación (pol θ , XRCC2) y en el arresto de la horquilla de replicación (Exo1, RFC5). Todas estas funciones tienen como propósito detener la replicación y el ciclo celular en la fase G1 tardía, antes de su entrada en la fase S, con el objetivo de reparar el daño al DNA. Sin embargo, la sobreexpresión de todas estas proteínas lleva a un atascamiento de la horquilla, una reparación del daño al DNA descontrolada y a una gran inestabilidad genómica, que la célula tratará de resolver, pero si no es capaz de hacerlo entonces la célula tomará uno de dos posibles mecanismos: 1) destruir a estas células por apoptosis o 2) que las células entren en un estado de senescencia. Finalmente, si ambos mecanismos fracasan, entonces las células sufrirán un proceso de transformación.

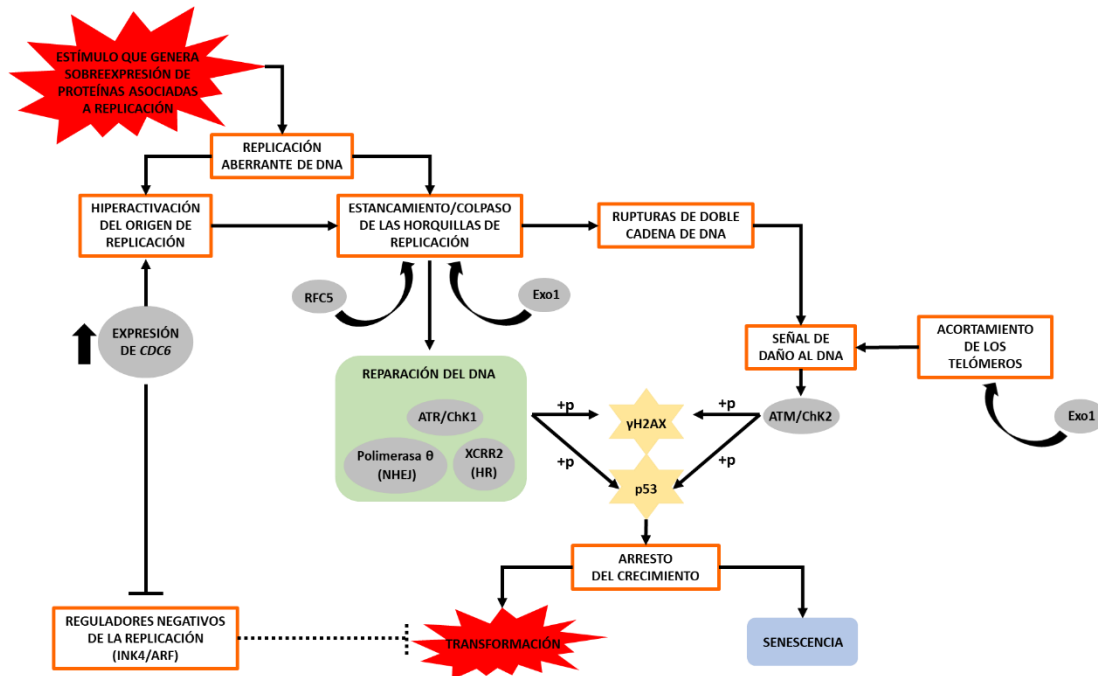


Figura 28. Una replicación aberrante puede desencadenar en uno de dos fenómenos distintos: Transformación o senescencia (Modificada)⁸¹. Las células en proliferación utilizan el punto de control de la replicación del DNA para garantizar la duplicación ordenada y controlada de su genoma. Su mal funcionamiento debido a una sobreexpresión de genes implicados en replicación y reparación del daño al DNA puede provocar una interrupción catastrófica del genoma, incluida la activación no programada de los orígenes de la replicación, el bloqueo y el colapso de las horquillas de replicación, así como la rotura masiva del DNA. Con el propósito de reparar el daño al DNA, la célula detendrá la replicación y el ciclo celular en la fase G1 tardía, antes de su entrada en la fase S. Para activar los puntos de control, ATR/Chk1, ATM/Chk2 y γ H2AX conducen a un arresto del crecimiento y a reparación del DNA. En caso de no repararse el daño al DNA la célula tratará de eliminar a estas células mediante apoptosis o bien entrarán en senescencia. En caso de que esto no ocurra la célula iniciará un proceso de transformación.

CONCLUSIONES

- 1.- Las células *knock down* para la isoforma H2A.Z.1 “C1/KD-Z.1” se replica más lentamente que la línea parental de cáncer de páncreas PANC-1
- 2.- El menor número de las células observado en el cultivo de la C1/KD-Z no se debe al proceso de muerte celular programada (apoptosis).
- 3.- La disminución en los niveles de expresión de la isoforma H2A.Z.1 en la línea celular C1/KD-Z.1 conduce a una alteración en la proliferación provocado por un arresto en la fase G1 del ciclo celular.
- 4.- La disminución en los niveles de expresión de la isoforma H2A.Z.1 en la línea celular C1/KD-Z.1 genera la sobreexpresión de genes que propician la transición de G1/S del ciclo celular e inicio de la replicación del DNA (*CDC6*, *PRIM1*, *PRIM2*), genes que propician la reparación del DNA por recombinación homóloga (*XRCC2*), por unión a extremos no homólogos (*POLQ*), genes que propician el mantenimiento de telómeros (*RFC5*) y genes que se asocian con la reparación de *mismatch* y desencadenar la respuesta a daño del DNA (*EXO1*).
- 6.- Nuestros resultados sugieren que la sobre expresión de estos genes asociados a la progresión del ciclo celular, inicio de la replicación y reparación del DNA generan un fenómeno denominado “estrés replicativo”. Que conduce a un arresto en la fase G1 del ciclo celular.

PERSPECTIVAS

- 1.- Validar mediante RT-qPCR el nivel de expresión de los genes que se identificaron desregulados en la línea celular *knock down* C1/KD-Z.1 en los resultados de los microarreglos.
- 2.- Validar el daño al DNA por inmunofluorescencias dirigidas a la variante de histonas γ H2A.X, ensayo de TUNEL y/o ensayo de cometa, en la línea celular *knock down* C1/KD-Z.1. Así como identificar a la proteína ChK2 fosforilada en la treonina 68, y a la proteína p53 fosforilada.
- 3.- Determinar si la disminución de los niveles de expresión de la isoforma H2A.Z.1 conduce a senescencia por realizar ensayos de β -galactosidasa, así como identificar a las IL-6 y IL-8 como representativas del proceso secretorio inducido por senescencia (SASP).

BIBLIOGRAFÍA

1. García, J., *et al.*; (2005). "Páncreas". En "Anatomía Humana". McGraw-Hill Interamericana. 1era Edición. Madrid, España. p. 386-389.
2. Richard, L., *et al.*; (2015). "Capítulo 4: Órganos". En "Gray Anatomía para estudiantes". Elsevier España. 3era Edición. Madrid, España. p. 333-336.
3. Ferlay, J. *et al.*; (2018). "GLOBOCAN 2018 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11". International Agency for Research on Cancer, World Health Organization [Online]. Sitio Web: <http://globocan.iarc.fr>, accesado: 14/Mayo/2019
4. Kleef, J., *et al.* (2016). "Pancreatic cancer". *Nat Rev Dis Primers.*, 2(16022): 1-22.
5. American Cancer Society.; (2016). "Cáncer de páncreas". American Cancer Society [Online]. Sitio Web: <https://www.cancer.org>, accesado: 07/Junio/2018
6. Du, Y., *et al.*; (2017). "Molecular Subtyping of Pancreatic Cancer: Translating Genomics and Transcriptomics into the Clinic". *J Cancer.* 8(4): 513-522.
7. Lomber, G., Iovanna, J., Urrutia, R.; (2016). "The promise of epigenomic therapeutics in pancreatic cancer". *Epigenomics*, 8(6): 831-842.
8. Vincet, A., Herman, J., Schlick, R., Hruban, R., Goggins, M.; (2011). "Pancreatic cancer". *Lancet.*, 378(9791): 607-620.
9. Hezel, A., Kimmelman, A., Stanger, B., Bardeesy, N., Depinho, R.; (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma". *Genes Dev.*, 20(10): 1218-1249.
10. Schwarzenbach, H., Hoon, D., Pantel, K.; (2011). "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients". *Nat Rev Cancer*, 11(6): 426-437.
11. McAnena, P., Brown, J., Kerin, M.; (2017). "Circulating Nucleosomes and Nucleosome Modifications as Biomarkers in Cancer". *Cancers*, 9(1): 5-22.
12. National Cancer Institute; (2015). "Cancer Staging". National Institute of Health Sitio Web: <https://www.cancer.gov>, accesado: 07/Junio/2018

13. Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., Grützmann, R.; (2014). "Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN". *Biomed Res Int.* 2014(474905): 1-11.
14. Brosens, L., Hackeng, W., Offerhaus, G., Hruban, R., Wood, L.; (2015). "Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing "landscape"." *J Gastrointest Oncol.*, 6(4): 358-374.
15. Khan, M. *et al.*; (2017). "Molecular Drivers of Pancreatic Cancer Pathogenesis: Looking Inward to Move Forward". *Int J Mol Sci.*, 18(4): 779-803.
16. Sherr, C.; (1996). "Cancer cell cycles". *Science*, 274(5293): 1672-1677.
17. Yachida, S., Iacobuzio, C.; (2013). "Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression". *Oncogene*, 32(45): 5253-5260.
18. Biankin, A.V., *et al.*; (2002). "DPC4/Smad4 Expression and Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma". *J. Clin. Oncol.*, 20(23): 4531-4542.
19. Lomberk, G., Urrutia, R.; (2015). "The Triple-Code Model for Pancreatic Cancer". *Surg Clin North Am.*, 95(5): 935-952.
20. Silverman, B., Shi, J.; (2016). "Alterations of Epigenetic Regulators in Pancreatic Cancer and Their Clinical Implications". *Int J Mol Sci.*, 17(12): 2128-2155.
21. Sato, N., Goggings, M.; (2006). "The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer". *J Hepatobiliary Pancreat Surg.*, 13(4): 286-295.
22. Neureiter, D., Jäger, T., Ocker, M., Kiesslich, T.; (2014). "Epigenetics and pancreatic cancer: pathophysiology and novel treatment aspects". *World J Gastroenterol.*, 20(24): 7830-7848.
23. Omura, N., Goggings, M.; (2009). "Epigenetics and Epigenetic Alterations in Pancreatic Cancer". *Int J Clin Exp Pathol.*, 2(4): 310-326.
24. Iguchi, E., Safgren, S., Marks, D., Olson, R., Fernández, M.; (2016). "Pancreatic Cancer, A Mis-interpreter of the Epigenetic Language". *Yale J Biol Med.*, 89(4): 575-590. PMID: 28018146

25. Zhang, L., Jamaluddin, M., Weakley, S., Yao, Q., Chen, C.; (2011). "Roles and Mechanisms of MicroRNAs in Pancreatic Cancer". *World Journal of Surgery*, 35(8): 1725–1731.
26. Duguang, L., *et al.*; (2017). "The involvement of lncRNAs in the development and progression of pancreatic cancer". *Cancer Biol Ther.* 18(12): 927-936.
27. Reyes, J.; (2014). "La cromatina: la esencia está en el cambio". Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), (179).
Sitio Web: <http://www.sebbm.com/revista/sumario.asp?item=179>
28. Lu, C., Allis, C. D.; (2017). "SWI/SNF complex in cancer". *Nat Genet.*, 49(2): 178-179.
29. Buschbeck, M., Hake, S.; (2017). "Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer". *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 18(5): 299-314.
30. Talbert, P., Henikoff, S.; (2017). "Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics". *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 18(2): 115-126.
31. Vardabasso C., *et al.*; (2014). "Histone variants: emerging players in cancer biology". *Cell Mol Life Sci.* 71(3): 379-404.
32. Svtelis, A., Gévry, N., Grondin, G., Gaudreau, L.; (2010). "H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells". *Cell Cycle*, 9(2): 364-370.
33. Hatch, C., Bonner, W.; (1995). "Characterization of the Proximal Promoter of the Human Histone H2A.Z Gene". *DNA Cell Biol.*, 14(3): 257-266.
34. Dryhurst, D., *et al.*; (2009). "Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates". *BMC Biol.*, 7(86): 1-16.
35. Yang, H., *et al.*; (2016). "Oncogenic potential of histone-variant H2A.Z.1 and its regulatory role in cell cycle and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer". *Oncotarget*, 7(10): 11412-11423.
36. Vardabasso, C., Hake, S., Bernstein, E.; (2016). "Histone variant H2A.Z.2: A novel driver of melanoma progression". *Mol Cell Oncol.*, 3(2): e1073417

37. Bönisch, C., *et al.*; (2012). "H2A.Z.2.2 is an alternatively spliced histone H2A.Z variant that causes severe nucleosome destabilization". *Nucleic Acids Res.*, 40(13): 5951-5964.
38. Bönisch, C., Hake, S.; (2012). "Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable?". *Nucleic Acids Res.*, 40(21): 10719-10741.
39. Ávila, P.; (2016). "Identificación de H2A.Z y modificaciones post-traduccionales de histonas expresadas diferencialmente durante la progresión del cáncer de páncreas". Tesis de maestría. CINVESTAV. Ciudad de México, México.
40. Chomczynski, P., Sacchi, N.; (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal Biochem.*, 162(1): 156-159.
41. Kyes, S., Pinches, R., Newbold, C.; (2000). "A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*". *Mol Biochem Parasitol.*, 105(2): 311-315.
42. Birmingham, A., *et al.*; (2007). "A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity". *Nat Protoc.*, 2(9): 2068-2078.
43. Brummelkamp, T., Bernards, R., Agami, R.; (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells". *Science*, 296(5567): 550-553.
44. Rubinson, A., *et al.* (2003). "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference". *Nat Gen.*, 33: 401-406.
45. AbouHaidar, M., Ivanov, I.; (1999). "Non-enzymatic RNA hydrolysis promoted by the combined catalytic activity of buffers and magnesium ions". *Z Naturforsch C.*, 54(7-8): 542-548
46. Laemmli, U.; (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, 227(5259): 680-685.
47. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.; (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76(9): 4350-4354.

48. Deer, E., Gonzalez, J., Coursen, J., *et al.*; (2010). "Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines". *Pancreas*, 39(4): 425-435.
49. Vardabasso, C., Gaspar, A., Hasson, D., *et al.*; (2016). "Histone variante H2A.Z.2 mediates proliferation and drug sensitivity of malignant melanoma". *Mol Cell*. 59(1): 75-88.
50. Shi, Y.; (2004). "Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view". *Protein Sci*. 13(8):1979-1987.
51. Chaitanya, G., Alexander, J., Prakash, P.; (2010). "PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration". *Cell Commun Signal*. 8:31
52. Garg, H., Suri, P., Gupta, J., *et al.*; (2016). "Survivin: a unique target for tumor therapy". *Cancer Cell International*. 16:49.
53. Huan, W., Sherman, B., Lempicki, R.; (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources". *Nat Protoc*. 4(1):44-57.
54. Huan, W., Sherman, B., Lempicki, R.; (2009). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists". *Nucleic Acids Res*. 37(1):1-13.
55. Kanehisa, M., Goto, S.; (2000). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes". *Nucleic Acids Research*. 28(1): 27–30.
56. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., *et al.*; (2016). "KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs". *Nucleic Acids Research*. 45(D1): D353–D361.
57. Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., *et al.*; (2018). "New approach for understanding genome variations in KEGG". *Nucleic Acids Research*. 47(D1): D590–D595.
58. Hua S., Kallen C., Dhar R., *et al.*; (2008). "Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression". *Mol Syst Biol*. 4: 188.
59. Slupianek, A., Yerrum, S., Safadi, F., Monroy, M.; (2010). "The chromatin remodeling factor SRCAP modulates expression of prostate specific

- antigen and cellular proliferation in prostate cancer cells". *J Cell Physiol.* 224(2): 369-375.
60. Kim, K., et al.; (2013). "Gene dysregulation by histone variant H2A.Z in bladder cancer." *Epigenetics & Chromatin*, 6(1):34-46.
 61. Yang, B., et al.; (2018). "H2A.Z regulates tumorigenesis, metastasis and sensitivity to cisplatin in intrahepatic cholangiocarcinoma". *Int J Oncol.* 52(4): 1235-1245.
 62. Ávila P., et al. "H2A.Z overexpression suppresses senescence and chemosensitivity in pancreatic ductal adenocarcinoma". *Manuscrito en revisión.*
 63. Dhillon N., Oki M., Szyjka S., et al.; (2006). "H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle". *Mol Cell Biol.* 26(2): 489-501.
 64. Hartwell L.; (1976). "Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle". *J Mol Biol.* 104: 803–817.
 65. William, R., et al.; (1997). "A human protein related to yeast Cdc6p". *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94: 142-147.
 66. Hateboer, G. et al.; (1998). "Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F". *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6679–6697.
 67. Ohtani, K., et al.; (1998). "Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F". *Oncogene*, 17, 1777–1785.
 68. Yan, Z., et al.; (1998). "Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 3603–3608.
 69. Piatti, S. et al.; (1995). "Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *EMBO J.*, 14, 3788–3799.
 70. Cocker, J.H. et al.; (1996). "An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast". *Nature*, 379, 180–182.

71. Petersen, B.O. et al.; (1999). "Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization". *EMBO J.*, 18, 396–410.
72. Jallepalli, P.V. et al.; (1998). "sud1(p) targets cyclin-dependent kinase-phosphorylated Cdc18 and Rum1 proteins for degradation and stops unwanted diploidization in fission yeast". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 8159–8164.
73. Nishitani, H. et al.; (1995). "p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast". *Cell*, 83, 397–405.
74. Drury, L.S. et al.; (1997). "The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast". *EMBO J.*, 16, 5966–5976.
75. Drury, L.S. et al.; (2000). "The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle". *Curr. Biol.*, 10, 231–240.
76. Lengronne, A. et al.; (2002). "The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1)". *Mol. Cell*, 9, 1067–1078.
77. Sidorova, J.M. et al.; (2003). "Precocious G1/S transitions and genomic instability: the origin connection". *Mutat. Res.*, 532, 5–19.
78. Tanaka, S. et al.; (2002). "Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation". *Genes Dev.*, 16, 2639–2649
79. Di Micco, R. et al.; (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication". *Nature*, 444, 638–642.
80. Bartkova, J. et al.; (2006). "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints". *Nature*, 444, 633–637.
81. Borlado, L., Méndez J.; (2008) "CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis". *Carcinogenesis*. 29(2): 237-243.

- 82.** Cotta-Ramusino, C.; Fachinetti, D.; Lucca, C.; *et al.*; (2005). "Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells". *Mol. Cell*, 17, 153–159.
- 83.** Szankasi, P.; Smith, G.R.; (1995). "A role for exonuclease I. from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction". *Science*, 267, 1166–1169.
- 84.** Sertic, S.; Mollica, A.; Campus, *et al.*; (2018). "Coordinated Activity of Y Family TLS Polymerases and EXO1 Protects Non-S Phase Cells from UV-Induced Cytotoxic Lesions". *Mol. Cell*, 70, 34–47.
- 85.** Qiu, J.; Guan, M.X.; Bailis, A.M.; Shen, B.; (1998). "Saccharomyces cerevisiae exonuclease-1 plays a role in UV resistance that is distinct from nucleotide excision repair". *Nucleic Acids Res.* 26, 3077–3083.
- 86.** Bolderson, E.; Tomimatsu, N.; Richard, D.J.; Boucher, D.; Kumar, R.; Pandita, T.K.; Burma, S.; Khanna, K.K.; (2010). "Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks". *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 1821–1831
- 87.** Keijzers, G.; Liu, D.; Rasmussen, L.J.; (2016); "Exonuclease 1 and its versatile roles in DNA repair". *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 440–451.
- 88.** Kolodner RD, Putnam CD, Myung K; (2002). "Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*". *Science* 297: 552–557
- 89.** Pang TL, Wang CY, Hsu CL, Chen MY, Lin JJ; (2003). "Exposure of single-stranded telomeric DNA causes G2/M cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem* 278: 9318–9321
- 90.** Ivanov EL, Sugawara N, White CI, Fabre F, Haber JE; (1994). "Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol* 14: 3414–3425
- 91.** Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umezumi K, Kolodner RD, Haber JE; (1998). "Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage". *Cell* 94: 399–409
- 92.** Tsubouchi H, Ogawa H; (2000). "Exo1 roles for repair of DNA doublestrand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Biol Cell* 11: 2221–2233

93. Lewis LK, Karthikeyan G, Westmoreland JW, Resnick MA; (2002). "Differential suppression of DNA repair deficiencies of yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase)". *Genetics* 160: 49–62
94. Schaetzlein S, Kodandamireddy NR, Ju Z, Lechel A, *et al.*; (2007). "Exonuclease-1 deletion impairs DNA damage signaling and prolongs lifespan of telomere-dysfunctional mice". *Cell* 130: 863–877
95. Wang X, Haber JE; (2004). "Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of doublestrand break repair". *PLoS Biol* 2: E21
96. Zou L, Elledge SJ; (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA–ssDNA complexes". *Science* 300: 1542–1548
97. Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D.; (2005). "*Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation". *Curr Biol* 15: 1364–1375
98. Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ.; (1996). "Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways". *Science* 271: 357–360
99. Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF.; (1996). "Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways". *Genes Dev* 10: 395–406
100. Lee SJ, Schwartz MF, Duong JK, Stern DF.; (2003). "Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling". *Mol Cell Biol* 23: 6300–6314
101. Blackburn EH; (2001). "Switching and signaling at the telomere". *Cell* 106: 661–673
102. Blackburn EH, Greider CW, Henderson E, Lee MS, Shampay J, Shippen-Lentz D.; (1989). "Recognition and elongation of telomeres by telomerase". *Genome* 31: 553–560

103. Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE, de Lange T.; (2005). "POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end". *EMBO J* 24: 2667–2678
104. Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M.; (2001). "Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection". *Exp Gerontol* 36: 1619–1637
105. Cosme-Blanco W, Shen MF, Lazar AJ, Pathak S, Lozano G, Multani AS, Chang S.; (2007). "Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence". *EMBO Rep* 8: 497–503
106. Morin I., Ngo H., Greenall A., Morrice N., Lydall D.; (2008). "Checkpoint-dependent phosphorylation of Exo1 modulates the DNA damage response." *EMBO J.* 27(18): 2400–2410
107. Zhou Y., Hingorani MM. "Impact of individual proliferating cell nuclear antigen-DNA contacts on clamp loading and function on DNA". *J Biol Chem* 2012; 287: 35370-35381
108. Bloom L. B.; (2009). "Loading clamps for DNA replication and repair". *DNA Repair* 8, 570–578
109. Bowman GD, O'Donnell M., Kuriyan J.; (2004). "Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex". *Nature*; 429: 724-730.
110. Luckow B, Bunz F, Stillman B, Lichter P and Schutz G. (1994) "Cloning, expression, and chromosomal localization of the 140-kilodalton subunit of replication factor C from mice and humans". *Mol Cell Biol*; 14: 1626-1634.
111. Cullmann G, Fien K, Kobayashi R, Stillman B.; (1995). "Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol*; 15: 4661-4671.
112. Tsuchiya A, Inoue YH, Ida H, Kawase Y, Okudaira K, Ohno K, Yoshida H, Yamaguchi M; (2007). "Transcriptional regulation of the drosophila *rfc1* gene by the DRE-DREF pathway". 274: 1818-1832.

113. Xia ST, Xiao LT, Bi DL, Zhu ZH; (2007). "Arabidopsis replication factor C subunit 1 plays an important role in embryogenesis". *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 2007; 33: 179- 187.
114. Majka J, Burgers PM; (2004). "The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; 78: 227-260.
115. Sakato M, O'Donnell M, Hingorani MM; (2012). "A central swivel point in the RFC clamp loader controls PCNA opening and loading on DNA". *J Mol Biol*; 416: 163-175.
116. Pennaneach V, Salles-Passador I, Munshi A, Brickner H, Regazzoni K, Dick F, Dyson N, Chen TT, Wang JY, Fotedar R, Fotedar A.; (2001). "The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner". *Mol Cell*; 7: 715-727
117. Bermudez VP, Lindsey-Boltz LA, Cesare AJ, Maniwa Y, Griffith JD, Hurwitz J, Sancar A; (2003). "Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro". *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 1633- 1638.
118. Maradeo ME, Garg A, Skibbens RV; (2010). "Rfc5p regulates alternate RFC complex functions in sister chromatid pairing reactions in budding yeast". *Cell Cycle*; 9: 4370-4378.
119. Ellison V, Stillman B; (2003). "Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA". *PLoS Biol*; 1: E33.
120. Griffith JD, Lindsey-Boltz LA Sancar A; (2002). "Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy". *J Biol Chem*; 277: 15233- 15236.
121. Gellon L, Razidlo DF, Gleeson O, Verra L, Schulz D, Lahue RS, Freudenreich CH; (2011). "New functions of Ctf18-RFC in preserving genome stability outside its role in sister chromatid cohesion. *PLoS Genet*; 7: e1001298.

- 122.** Murakami T, Takano R, Takeo S, Taniguchi R, Ogawa K, Ohashi E, Tsurimoto T; (2010). "Stable interaction between the human proliferating cell nuclear antigen loader complex Ctf18-replication factor C (RFC) and DNA polymerase {epsilon} is mediated by the cohesion-specific subunits, Ctf18, Dcc1, and Ctf8". *J Biol Chem*; 285: 34608-34615.
- 123.** Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N; (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal". *Sci Signal*; 6: p11.
- 124.** Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N; (2012). "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data". *Cancer Discov*; 2: 401-404.
- 125.** Nakamura T., Fidler I., Coombes K.; (2007). "Gene Expression Profile of Metastatic Human Pancreatic Cancer Cells Depends on the Organ Microenvironment". *Cancer Res.*1;67(1):139-48.
- 126.** Hübscher U, Maga G, Spadari S; (2002). "Eukaryotic DNA polymerases". *Annu Rev Biochem*; 71:133–163.
- 127.** Lange SS, Takata K, Wood RD; (2011). "DNA polymerases and cancer". *Nat Rev Cancer*; 11:96–110.
- 128.** Kass EM, Jasin M; (2010). "Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways". *FEBS Lett.*; 584:3703–3708.
- 129.** Rassool FV, Tomkinson AE; (2010). "Targeting abnormal DNA double strand break repair in cancer". *Cell Mol Life Sci.*; 67:3699–3710.
- 130.** Thompson LH; (2012). "Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography". *Mutation Research.*751:158–246.
- 131.** Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, TaucherScholz G, Lobrich M, Jeggo PA; (2011).

- “Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase”. *EMBO J.*; 30:1079–1092.
- 132.** Kakarougkas A, Jeggo PA; (2014). “DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover Mechanism”. *Br J Radiol.*; 87:20130685.
- 133.** Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM; (2008). “Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair”. *PLoS Genetics.*; 4:e1000110.
- 134.** Lee K, Lee SE; (2007). “*Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining”. *Genetics.*; 176:2003–2014.
- 135.** Shima N, Hartford SA, Duffy T, Wilson LA, Schimenti KJ, Schimenti JC; (2003). “Phenotype-based identification of mouse chromosome instability mutants”. *Genetics.*; 163:1031–1040.
- 136.** Lemée F.; (2010). “DNA polymerase θ up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability”
- 137.** Fernandez-Vidal A, Guitton-Sert L, Cadoret JC, Drac M, Schwob E, Baldacci G, Cazaux C, Hoffmann JS; (2014). “A role for DNA polymerase theta in the timing of DNA replication”. *Nat Commun.*; 5:4285.
- 138.** Ceccaldi R, Liu JC, Amunugama R, Hajdu I, Primack B, Petalcorin MI, O'Connor KW, Konstantinopoulos PA, Elledge SJ, Boulton SJ, Yusufzai T, D'Andrea AD. (2015). “Homologous recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair. *Nature.*; 518:258–262.
- 139.** Seki M, Marini F, Wood RD. (2003). “POLQ (Pol θ), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells”. *Nucleic Acids Res.*; 31:6117–6126.
- 140.** Newman JA, Cooper CD, Aitkenhead H, Gileadi O; (2015). “Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway. *Structure.* 2015; 23:2319–2330.

141. Bartkova J1, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, *et al.*; (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis". *Nature*.14;434(7035):864-70.
142. Baumann, P., West, S. C.; (1998). "Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair". *Trends Biochem. Sci.* 23(7): 247–251
143. Bianco, P. R., Tracy, R. B., Kowalczykowski, S. C.; (1998). "DNA strand exchange proteins; A biochemical and physical comparison". *Front. Biosci.* 3, D570–D603
144. Game, J. C.; (1993). "DNA double-strand breaks and the RAD50-RAD57 genes in *Saccharomyces*". *Semin. Cancer Biol.* 4(2): 73–83
145. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J.; (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinase and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold". *EMBO J.* 1, 945–951
146. Thacker, J.; (1999). "A surfeit of RAD51-like genes?". *Trends Genet.* 15(5): 166–168
147. Tambini, C. E., George, A. M., Rommens, J. M., Tsui, L. C., Scherer, S. W., Thacker, J. (1997). "The XRCC2 DNA repair gene: identification of a positional candidate". *Genomics* 41(1), 84–92
148. Cartwright, R., Tambini, C. E., Simpson, P. J., and Thacker, J.; (1998). "The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family". *Nucleic Acids Res.* 26(13): 3084–3089
149. Liu, N., Lamerdin, J. E., Tebbs, R. S., Schild, D., Tucker, J. D., *et al.*; (1998). "XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages". *Mol. Cell* 1, 783–793
150. Jones, N. J., Cox, R., Thacker, J.; (1987). "Isolation and cross-sensitivity of X-ray-sensitive mutants of V79-4 hamster cells". *Mutat. Res.* 183, 279–286

151. Thacker, J., Ganesh, A. N., Stretch, A., Benjamin, D. M., Zahalsky, A. J., Hendrickson, E. A.; (1994). "Gene mutation and V(D)J recombination in the radiosensitive irs lines". *Mutagenesis* 9(2), 163–168
152. Tucker, J. D., Jones, N. J., Allen, N. A., Minkler, J. L., Thompson, L. H. Carrano, A. V.; (1991). "Cytogenetic characterization of the ionizing radiation sensitive Chinese hamster mutant irs1". *Mutat. Res.* 254(2), 143–152
153. Griffin, C. S., Simpson, P. J., Wilson, C. R., Thacker, J.; (2000). "Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation". *Nat. Cell Biol.* 2, 757–761
154. Schild, D., Lio, Y., Collins, D. W., Tsomondo, T., Chen, D. J.; (2000). "Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs". *J. Biol. Chem.* 275(22): 16443–16449
155. O'Regan P., Wilson C., Townsend S., Thacke J.; (2001). "XRCC2 Is a Nuclear RAD51-like Protein Required for Damage dependent RAD51 Focus Formation without the Need for ATP Binding". 276(25): 22148-53