



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

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Terapia génica con tGAS1 y PTEN-LONG en la línea de cáncer de páncreas
HPAF-II y en un modelo murino de cáncer pancreático”**

Tesis que presenta

M. en C. LIZBETH DANIEL GARCÍA

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis

DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA

Ciudad de México, abril 2023

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada con el número de becario 348188 durante el proyecto de doctorado

AGRADECIMIENTOS:

Especialmente a mi familia:

A mis padres Sotero Daniel (†) y Jacinta García por sus enseñanzas, apoyo, por ser mi mayor motor, son mi ejemplo en mi vida, los amo.

A mis hermanos Caro, Oscar, Tefy y Gladis, gracias por su apoyo en todo momento, los amo.

A mi tutor el Dr. Segovia por aceptarme en su laboratorio, por su paciencia, apoyo, asesoría y compromiso en mi formación. Mi total reconocimiento por su vocación como investigador y compromiso con la ciencia.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones y sugerencias, al Dr. Daniel Martínez Fong del Depto. FByN, al Dr. Porfirio Nava Domínguez del Depto. FByN/Cinvestav, al Dr. Ricardo Félix Grijalva del Depto. de Biología Celular /Cinvestav y a la Dra. Francisca Pérez Severiano del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez.

A la Dra. Rosa O. González Robles, por su calidez, asesoría, profesionalismo y enseñanza durante el análisis estadístico.

Al Dr. Alejandro Sandoval Romero, Facultad de Medicina FES Iztacala (UNAM) por la asesoría y apoyo en la realización de los cultivos primarios de GRD.

Por su apoyo técnico, sugerencias, compañerismo y amistad durante mi estancia.

Q.F.B Araceli Navarrete Alonso
Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez
Dr. Natanael Zarco Salinas
Dra. Lucía García Lara
Dra. Laura Sánchez Hernández
M. en C. Gisela Tovar Medina
M. en C. Nicolas Aguirre Pineda
M. en C. Quetzalli Denisse Ángeles López
M. en C. Rosalinda Mejía
Técnico Rubén Sánchez Islas

Quiero hacer una mención especial a la auxiliar Q.F.I. Paula Vergara Zubillaga y al M. en C. Manuel Lara Lozano por todo su apoyo, consejos y motivación en lo profesional y personal durante mi estancia en el laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio, por los aprendizajes y sus aportaciones en la realización de este trabajo.

Gracias a todos los que me han acompañado en distintos momentos de este largo camino.

DEDICADO ESPECIALMENTE

A la memoria de mi padre Sotero Daniel Flores (†)

ÍNDICE	Pág.
<u>Abreviaturas</u>	
<u>Resumen</u>	
<u>Abstract</u>	
1.0 <u>Introducción</u>	11
1.1 <u>Cáncer de páncreas</u>	11
1.2 <u>Lesiones precursoras y alteraciones moleculares en PDAC</u>	11
2.0 <u>Invasión perineural</u>	12
2.1 <u>Mecanismo molecular de la invasión perineural</u>	15
3.0 <u>La artemina y su participación en el cáncer de páncreas</u>	17
4.0 <u>Vía de señalización de GDNF</u>	18
5.0 <u>Señalización independiente de RET</u>	19
6.0 <u>GAS1 (Growth Arrest Specific 1)</u>	21
7.0 <u>Características importantes de GAS1</u>	22
7.1 <u>Efecto de la expresión de GAS1</u>	23
7.2 <u>GAS1 soluble</u>	24
8.0 <u>PTEN (Homólogo de fosfatasa y tensina deletada en el cromosoma 10)</u>	28
8.1 <u>Variantes de PTEN</u>	30
8.2 <u>PTEN-L secretable</u>	31
9.0 <u>Justificación</u>	35
10.0 <u>Hipótesis</u>	35
11.0 <u>Objetivo general</u>	35
12.0 <u>Objetivos específicos</u>	36
13.0 <u>Materiales y métodos</u>	37
13.1 <u>Cultivo celular HPAF-II</u>	37
13.2 <u>RT-PCR de punto final</u>	38

13.3	<u>Transfección con plásmidos de expresión</u>	39
13.4	<u>Ensayos de viabilidad celular</u>	39
13.5	<u>Análisis de Western blot</u>	39
13.6	<u>Determinación de apoptosis a través de la activación de la caspasa 3</u>	40
13.7	<u>Cultivo primario de células de ganglio de raíz dorsal</u>	41
13.8	<u>Inmunofluorescencia</u>	42
13.9	<u>Efecto de las formas solubles de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L sobre la invasión neuronal</u>	42
14.0	<u>Ensayo de invasión <i>in vitro</i></u>	42
14.1	<u>Producción lentiviral</u>	43
14.2	<u>Determinación de los niveles de GAS1 y PTEN por ELISA</u>	43
14.3	<u>Modelo de tumor <i>in vivo</i></u>	44
14.4	<u>Análisis estadístico</u>	45
15.0	<u>Resultados</u>	46
15.1	<u>Caracterización de la línea celular HPAF-II</u>	46
15.2	<u>Efecto de las formas solubles de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L sobre la viabilidad celular</u>	47
15.3	<u>Efectos de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L solubles en la vía de señalización de ERK y AKT</u>	48
15.4	<u>Efecto de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L sobre la invasión de las células de cáncer páncreas</u>	50
15.5	<u>Efectos <i>in vivo</i> del vector lentiviral que expresa la forma soluble de tGAS1-PTEN-L sobre el crecimiento tumoral</u>	53
16.0	<u>Discusión</u>	58
17.0	<u>Conclusión</u>	61
18.0	<u>Perspectivas</u>	62
19.0	<u>Bibliografía</u>	63

Abreviaturas

- ADCP:** Adenocarcinoma pancreático
- PNI:** Invasión perineural
- Gas1:** Growth Arrest Specific 1
- ARTN:** Artemina
- PTEN:** Fosfatasa y tensina eliminado en el cromosoma 10
- HPAF-II:** Línea de cáncer de páncreas
- GDNF:** Factor neurotrófico derivado de la glía
- GFL:** Ligando de la familia de GDNF
- FBS:** Suero fetal bovino
- PanIN:** Neoplasias intraepiteliales pancreáticas
- IPMN:** Neoplasias papilares intraductales
- MCN:** Neoplasias quísticas mucinosa
- KRAS:** Kirsten rat sarcoma viral oncogene
- NGF:** Factor de crecimiento del nervio
- BDNF:** Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
- MEC:** Matriz extracelular
- Shh:** Sonic hedgehog
- RET:** Rearreglo durante la transfección
- NRTN:** Neurturina
- PSPN:** Persefina
- GLOBOCAN:** Global Cancer Observatory
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol
- NCAM:** Adhesión celular neural

Resumen

El cáncer de páncreas es uno de los cánceres más agresivos y metastásicos debido a un proceso llamado invasión perineural. La invasión perineural (PNI) es un proceso doloroso que proporciona una ruta alternativa para la diseminación y metástasis en el cuál las células cancerosas invaden los nervios circundantes. La PNI es un indicador de la agresividad del tumor y correlaciona con un mal pronóstico para los pacientes con cáncer de páncreas. El páncreas está inervado por el plexo celíaco, que se encuentra entre el páncreas y la arteria mesentérica. Se considera que el plexo pancreático es la principal vía de invasión del cáncer de páncreas. El gen Gas1, que codifica la proteína específica para detener el crecimiento (GAS1) se aisló de una biblioteca de sustracción de la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3. GAS1 es estructuralmente similar a los miembros de los receptores alfa ($GFR\alpha$) de la familia de ligandos de GDNF (GFL). Donde GAS1 actúa como un modulador negativo de la señalización intracelular inducida por GDNF e induce arresto celular y apoptosis en las células tumorales. Esta actividad moduladora es la razón de la capacidad de GAS1 para actuar como supresor de tumores. Por otro lado, PTEN es un supresor tumoral, inactivo en muchos tumores que al igual que GAS1 inhibe la vía PI3K/AKT. Por ello, en este proyecto determinamos el efecto de tGAS1 y PTEN-L sobre la viabilidad de la línea de cáncer de páncreas HPAF-II. Observamos una disminución en el número de células cuando fueron tratadas tanto con tGAS1 como con PTEN-L indicando que ambas moléculas inducen muerte celular en la línea HPAF-II. Sin embargo, la acción conjunta de Gas1 y PTEN fue siempre más efectiva que su aplicación individual. Además, se caracterizó la línea HPAF-II y se observó la expresión de $GFR\alpha 3$ y artemina quienes participan en los procesos de invasión perineural. De manera interesante, observamos que las células HPAF-II tratadas con tGAS1-PTEN-L disminuyeron el proceso de invasión, evaluadas a través de las cámaras de Boyden. Asimismo, demostramos que el tratamiento con tGAS1-PTEN-L inhibe el crecimiento de los tumores generados al disminuir los niveles de fosforilación de AKT y ERK1/2. Estos datos sugieren que la aplicación simultánea de tGAS1 y PTEN-L son capaces de inducir la muerte celular, disminuir la invasión y el crecimiento tumoral lo que indica una posible inhibición de la metástasis.

Abstract

Pancreatic cancer has become one of the most aggressive and metastatic, due to a process called perineural invasion. Perineural invasion (PNI) is a process in which cancer cells invade surrounding nerves, still an alternative route for metastatic spread and pain generation. PNI is believed to be an indicator of aggressive tumor behavior and has been shown to correlate with a poor prognosis in patients with pancreatic cancer. The pancreas is innervated by the celiac plexus, which is located between the pancreas and the mesenteric artery. The pancreatic plexus is the main invasion route for pancreatic cancer. The growth arrest specific Gas1 gene (GAS1) was isolated from a mouse fibroblast subtraction library NIH3T3. GAS1 is structurally like the alpha receptor (GFR α) members of the GDNF ligand family (GFL). GAS1 has been shown to act as a negative modulator of GDNF-induced intracellular signaling and induce cell arrest and apoptosis of tumor cells. This modulating activity is responsible for the ability of GAS1 to act as a tumor suppressor. On the other hand, PTEN is a tumor suppressor, inactive in many tumors, and both GAS1 and PTEN inhibit the PI3K / AKT pathway. Therefore, in this project we determined the effect of tGAS1 and PTEN-L on the viability of the HPAF-II pancreatic cancer line. We observed a decrease in the number of cells treated with both tGAS1 and PTEN-L, these results indicate that tGAS1 and PTEN-L induce cell death in the HPAF-II line, in addition the HPAF-II line was characterized, and the expression is reflected of GFR α 3 and artemin. Interestingly, we observed that HPAF-II cells treated with tGAS1, or PTEN-L decreased the invasion process of the tumor cells evaluated through the Boyden chambers. We also show that treatment with tGAS1-PTEN-L inhibits the growth of tumors generated by decreasing the levels of AKT and ERK1/2 phosphorylation. These data suggested that the simultaneous application of tGAS1 and PTEN-L are capable of inducing cell death, reducing invasion and tumor growth, possibly inhibition of metastasis.

1.Introducción

1.1 Cáncer de páncreas

El cáncer pancreático representa uno de los tumores sólidos más agresivos, la supervivencia de los pacientes es de aproximadamente 5 años. Esto es atribuido principalmente al retraso en su diagnóstico, ya que en las etapas iniciales los síntomas son inespecíficos [1]. Clínicamente los principales signos y síntomas del cáncer pancreático son: mala digestión, náuseas, pérdida de peso, ictericia, esteatorrea, dolor abdominal o de espalda, según la ubicación del cáncer (cabeza, cuerpo o cola). El adenocarcinoma ductal pancreático (ADCP) es el más común y constituye el 90% de todos los cánceres pancreáticos [2,3,4,5]. En 2020 en México, el GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) reportó una incidencia de 4,985 casos (13.3%) de 37,352 casos totales, además de una mortalidad 4,720 casos (13.1%) de un total de 36,030 reportados en América latina y el caribe [6,7].

Las neoplasias pancreáticas se clasifican según su diferenciación histológica en epiteliales o no epiteliales y su comportamiento biológico en neoplasias benignas, premalignas o malignas. Las neoplasias epiteliales pueden ser exocrinas o endocrinas, mientras que las neoplasias exocrinas se clasifican además en ductales y acinares [8,9].

1.2 Lesiones precursoras y alteraciones moleculares en ADCP

En el cáncer de páncreas existen lesiones precursoras entre las que se encuentran neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN), neoplasias papilares intraductales (IPMN) y las neoplasias císticas mucinosas (MCN). En la figura 1 se observa la progresión del epitelio normal del conducto pancreático a adenocarcinoma pancreático, esto puede ocurrir por eventos en etapas tempranas como el acortamiento de los telómeros, la mutación del gen KRAS (Kirsten rat

sarcoma viral oncogene) y la pérdida del gen p16, mientras que en etapas tardías ocurre la pérdida de p53 y SMAD4/DPC [10,11,12].

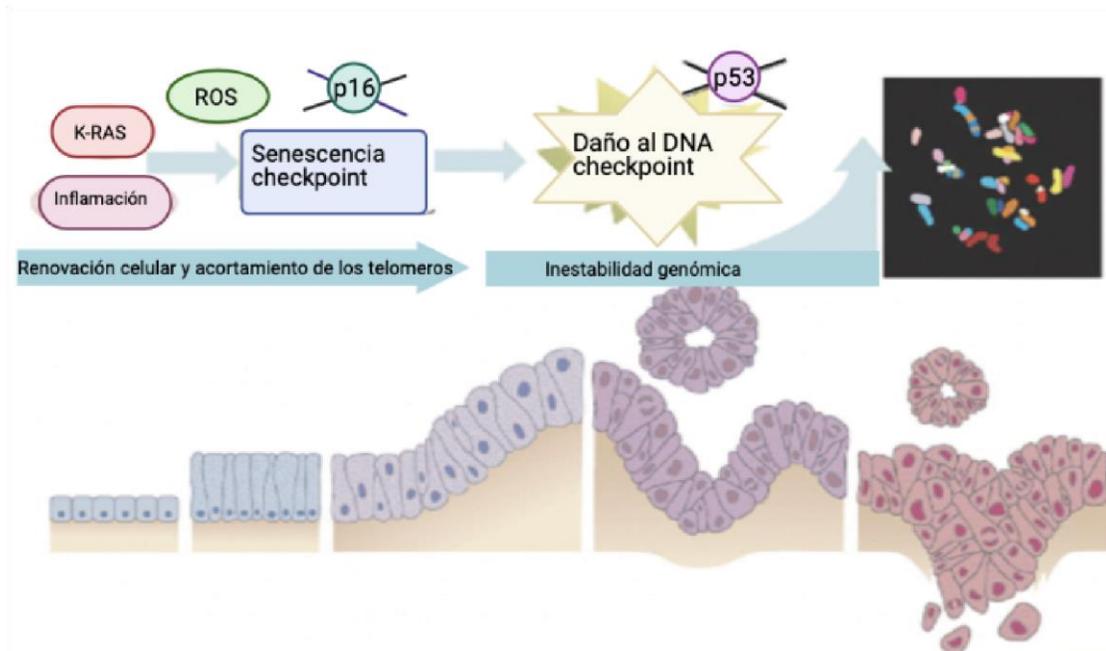


Figura 1. Progresión del cáncer pancreático. Modificado de [10].

2. Invasión Perineural

Uno de los procesos que ocurren en el cáncer de páncreas es la invasión perineural (PNI) que se define como la atracción de las células cancerosas a lo largo de los nervios y/o dentro de los espacios epineural, perineural y endoneural de la vaina neural, de tal manera que lo invaden ocasionando metástasis [13-15].

La invasión perineural en el cáncer de páncreas ocurre porque las inervaciones de los plexos neurales permiten una interacción directa entre las células cancerosas con los nervios (Figura 2) [16,17].

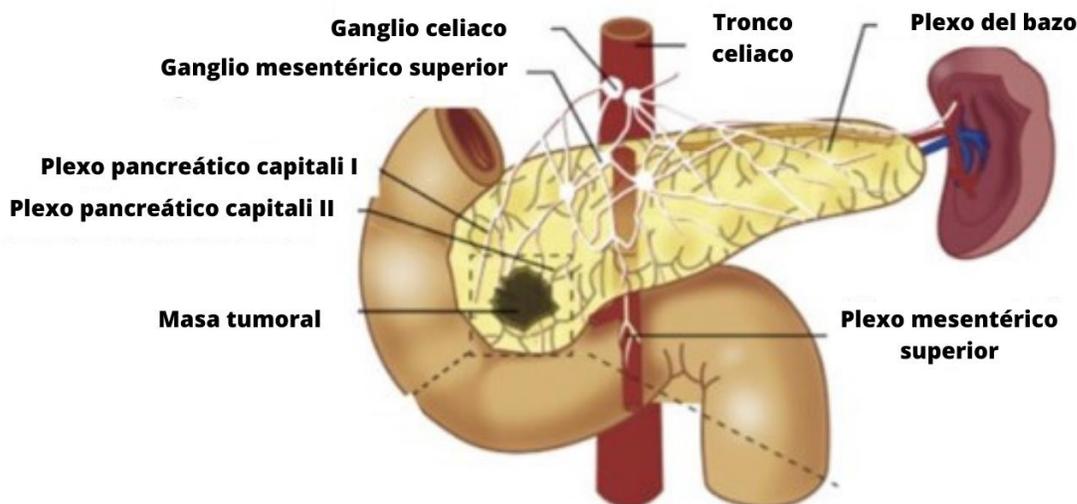


Figura 2. Anatomía patológica del páncreas. Los plexos de la cabeza pancreática, que incluyen dos partes: el plexo pancreático capitali I, que se extiende desde el ganglio celiaco derecho hasta la parte interna superior del proceso uncinado del páncreas y el plexo pancreático capitali II, que se extiende desde la arteria mesentérica superior hasta el interior superior de la apófisis uncinada del páncreas; el plexo celiaco; el plexo periférico de la arteria mesentérica superior; el plexo arterial hepático y el plexo del bazo. Modificado de [16].

El plexo pancreático derivado del ganglio celiaco se considera la ruta principal de invasión de las células de cáncer de páncreas, mientras que la propagación de las células cancerosas localizadas en el cuerpo y cola del páncreas se realizan a través de la inervación del plexo celiaco y el plexo esplénico (Figura 3) [17]. La inervación que presenta el páncreas explica la alta prevalencia de PNI en el cáncer de páncreas, aunque los mecanismos moleculares no están del todo claros. Sin embargo, el desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido confirmar la existencia de un fenómeno de “atracción mutua” entre las células de cáncer de páncreas y el tejido nervioso [18,19].

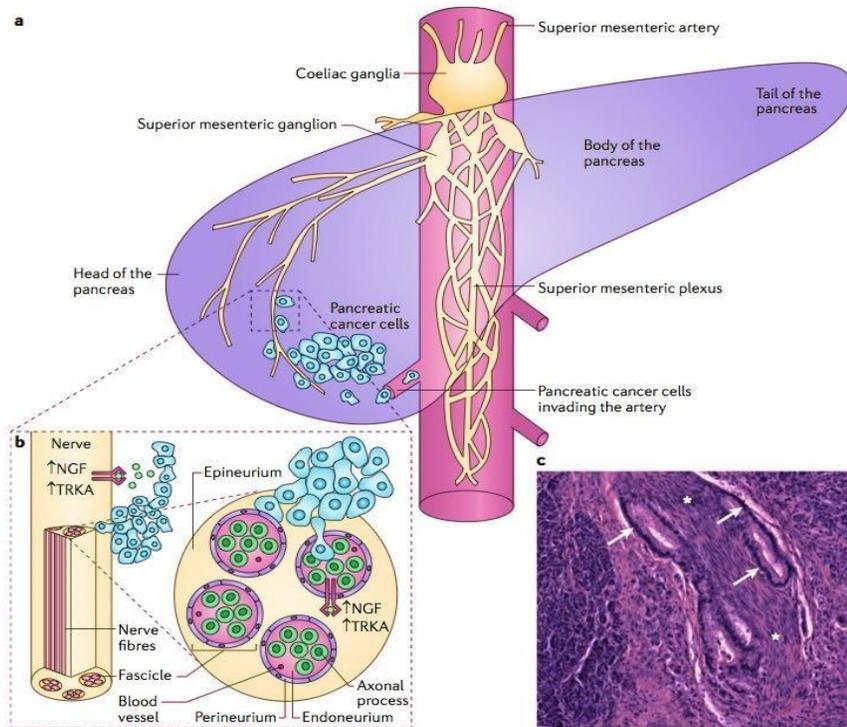


Figura. 3 Rutas de diseminación de las células cancerosas pancreáticas. En esta imagen se muestran las principales rutas que promueven la invasión perineural: El plexo pancreático derivado del ganglio celíaco y el plexus capitali pancreático que surge del ganglio mesentérico superior, se muestran en color amarillo en la izquierda de la figura y se consideran que son las principales rutas de invasión de las células de cáncer de páncreas que se ubican en la cabeza del páncreas. Y las principales rutas de diseminación de las células cancerosas en el cuerpo y cola del páncreas, son a través del plexo celíaco y plexo esplénico [19].

2.1 Mecanismo molecular de la invasión perineural

Las interacciones ligando-receptor, muchas veces estimulan vías de transducción de señales que regulan la actividad de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y proteasas de la matriz extracelular. Estas señales promueven la proliferación en células cancerosas y el crecimiento de tejido nervioso, lo que eventualmente conduce a la invasión de células cancerosas en dicho tejido [17,20-22] (Figura 4).

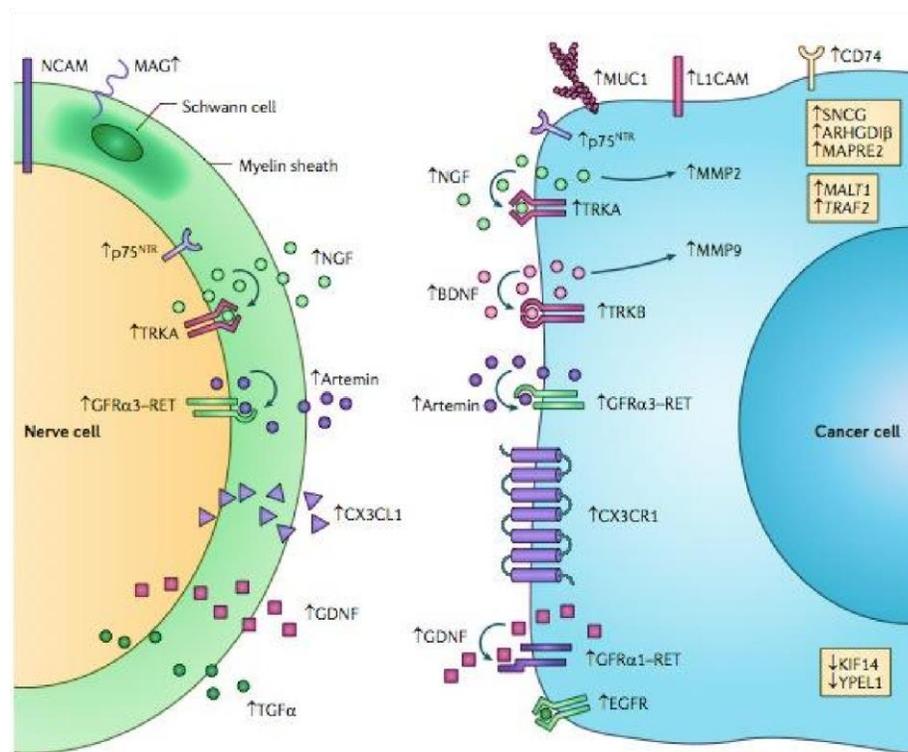


Figura 4. Moléculas que participan en el proceso de Invasión Perineural. En la invasión Perineural participan varias moléculas entre ellas, neurotrofinas como el factor de crecimiento del nervio (NGF) el cual se une al receptor tropomiosina cinasa A (TRKA); factor neurotrófico derivado de cerebro el cual se une al receptor tropomiosina cinasa B (TRKB). Existen otros factores que son secretados como GFRα1 y el receptor Tirosina Cinasa RET (Re-arreglo durante la transfección), por otro lado, la artemina un miembro de la familia de GDNF forma un complejo con GFRα3 [19].

Dentro de los mecanismos que promueven la invasión perineural se encuentran los siguientes:

Incremento del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF): Es un miembro de la familia de las neurotrofinas de factores de crecimiento con un papel importante en la supervivencia de las neuronas existentes, ya que promueve la sinapsis y el crecimiento de nuevas neuronas. El BDNF se asocia con un comportamiento maligno, que incluye la migración e invasión de las células tumorales [23].

Incremento de Neurotrofina 3: Existe evidencia que NT3 y su receptor TrkC se expresan en los nervios intratumorales dentro de los adenocarcinomas pancreáticos promoviendo la invasión perineural [24-26].

Incremento del Factor de crecimiento nervioso (NGF): NGF es una neurotrofina, numerosos estudios revelan que el alto nivel de NGF en CP está estrechamente relacionado con la proliferación tumoral, inhibe la apoptosis de las células tumorales y promueve la invasión perineural [27].

Incremento de la laminina: Es el principal componente de la matriz extracelular (MEC) se encuentra en la membrana basal y juega un papel importante en la diferenciación, adhesión y migración celular, así como en la transducción de señales, la laminina 332 promueve diversas funciones celulares, como la dispersión, migración, polarización, adhesión, proliferación y apoptosis, a través de placas de adhesión formados al interactuar con las integrinas $\alpha3\beta1$ y $\alpha6\beta4$ afectando la transducción de señales, lo que desempeña un papel clave en la invasión tumoral y la metástasis [29,30].

Presencia de quimiocinas: Son una familia de proteínas de bajo peso molecular. Las quimiocinas se dividen con base a su función en: quimiocinas homeostáticas, inflamatorias o de doble función. En general las quimiocinas homeostáticas están involucradas en el control de la migración celular.

Además, las quimiocinas y sus receptores específicos facilitan la diseminación tumoral en cada etapa de la progresión, incluida la adherencia de las células tumorales al endotelio, la extravasación de los vasos sanguíneos, la proliferación y la angiogénesis [31].

3. La artemina y su participación en el cáncer de páncreas

La artemina es un ligando del factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales; el cual promueve la invasividad de las células cancerígenas de páncreas. Al respecto en el 2018, Want y colaboradores demostraron que la artemina y CXCR4 se sobreexpresan en tejidos cancerosos y en líneas celulares de cáncer de páncreas lo que incrementa la migración e invasión de las células cancerosas pancreáticas, a través de la vía de señalización de AKT y ERK1/2/NF- κ B/CXCR4.

Observaron que la vía de señalización de ERK1/2 y AKT en las células tratadas con la artemina desencadena una mayor acumulación de NF- κ B en el núcleo, lo que posteriormente promueve la expresión de CXCR4. Ellos concluyeron que al regular positivamente la expresión de CXCR4, la artemina favorece la migración y la invasión en las células de cáncer de páncreas [32-35].

En otro estudio por Zhang y colaboradores en el 2021, revelaron que las células TER esplénicas (células no inmunes) que se encuentran incrementadas en el bazo secretan el factor neurotrófico artemina y promueven la metástasis y la sobrevivencia de las células cancerosas PDAC a través de la activación de su receptor GFR α 3 y la fosforilación de ERK y AKT [36].

4. Vía de señalización de GDNF

El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) se une predominantemente a GFR α 1, neurturina (NRTN) a GFR α 2, artemina (ARTN) a GFR α 3 y persefina (PSPN) a GFR α 4. Sin embargo, la unión-ligando a los correceptores de GFR α 's a veces es promiscua [37]. Los complejos GFL-GFR α se asocian con el dominio extracelular de RET (Rearreglo durante la transfección), lo que promueve la dimerización y activación de su dominio intracelular de cinasa, para estimular múltiples vías de señalización descendentes [38] (Figura 5). GDNF se une a su ligando GFR α formando un complejo que atrae a RET a las balsas lipídicas, lo que induce la dimerización y el cambio conformacional de RET que permite la autofosforilación de sus sitios tirosina (Y1062) para activar la vía PI3K y AKT lo que promueve la proliferación y supervivencia celular. Se ha evidenciado que Gas1 inhibe este proceso de proliferación al disminuir la fosforilación de la tirosina 1062 de RET y reducir la activación de AKT, estimulando la muerte celular por apoptosis [39].

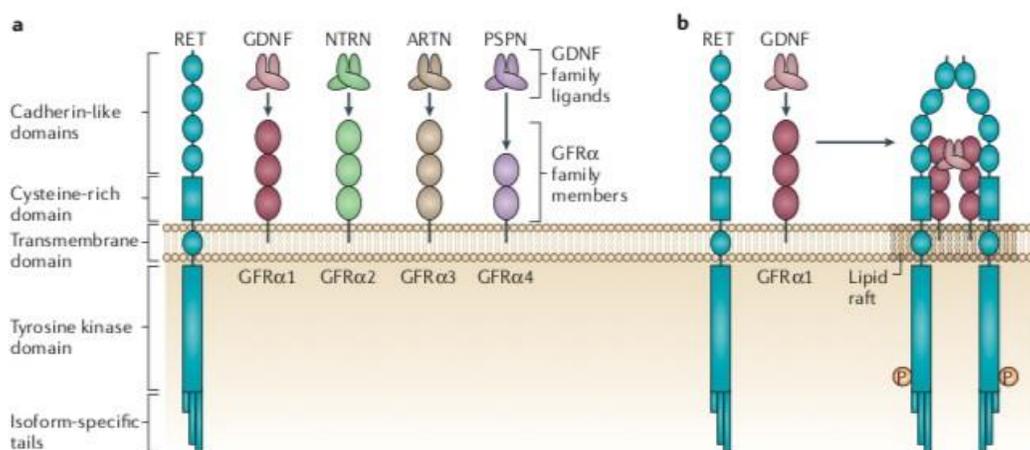


Figura 5. El receptor de tirosina quinasa RET. Los GFL no interactúan directamente con RET, pero se unen con los correceptores GFR α 's para formar un complejo heterodimérico, que luego puede reclutar a RET en subdominios de la membrana de la balsa lipídica. Una vez unido al complejo ligando-correceptor, los cambios conformacionales facilitan la asociación del monómero RET a través de los dominios de

homología de cadherina y conducen a la dimerización y autofosforilación del receptor (P) [38].

5. Señalización independiente de RET

La ARTN señala de forma independiente de RET a través de otros receptores [40]. Al respecto se ha evidenciado que la artemina puede unirse a un receptor alternativo como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) activando vías de señalización intracelular. Otros ligandos de la familia de los GFL como, GDNF, neurturina (NTN) y persefina (PSP) también pueden unirse con NCAM [40] en ausencia de sus receptores canónicos (Figura 6) [41-44].

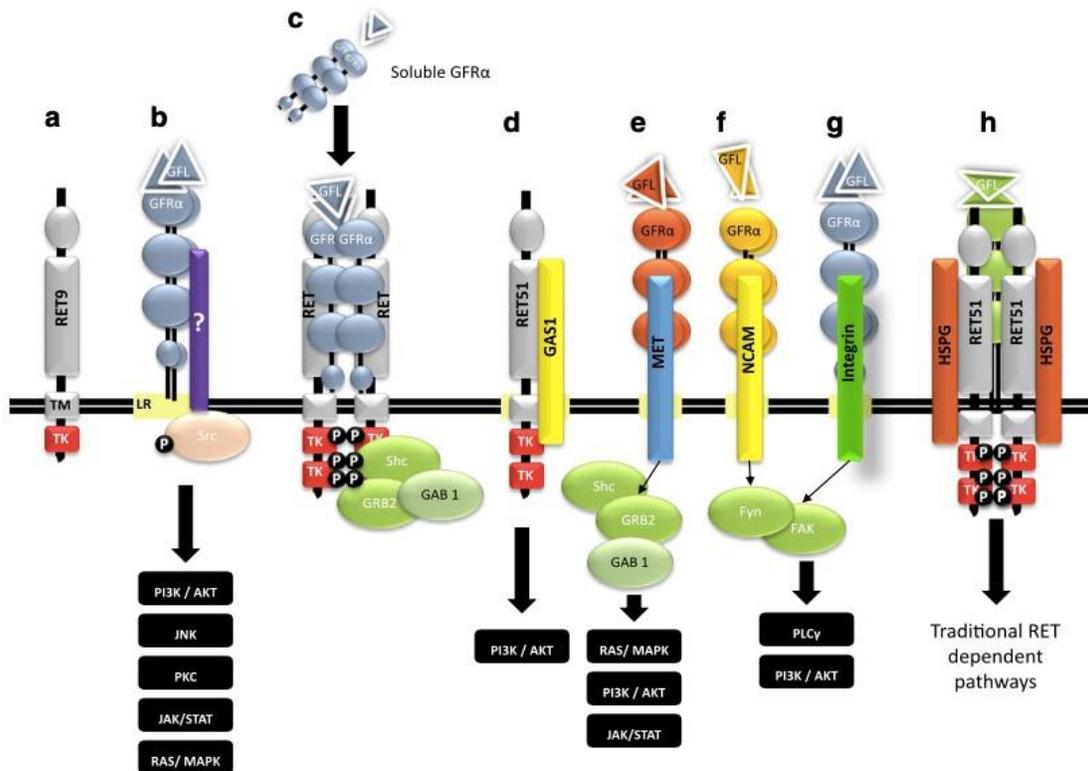


Figura 6. Vías de señalización alternativas de las GFL's. La vía tradicional GFL: GFRα-RET, pero se han descubierto otras vías que modulan la señalización de GFL a) Isoformas alternativas de RET, b) Señalización Src, c) GFRα soluble responsable de la activación de RET fuera de las balsas lipídicas d) GAS1, un receptor alternativo reciente de GFRα,

e) MET (protooncogén), f) NCAM (molécula de adhesión de células neutrales), g) integrinas, h) HSPG (Proteoglicano de Heparan Sulfato) [37].

La interacción NCAM-GFR α 1 facilita la unión de alta afinidad ARTN-NCAM, lo que promueve la activación de la proteína tirosina-cinasa no receptora Fyn y la cinasa de adhesión focal (FAK) en células carentes de RET [45]. Además, al unirse ARTN con las cadenas laterales de heparina de syndecan 3 activa las vías Src (Figura 7) [46].

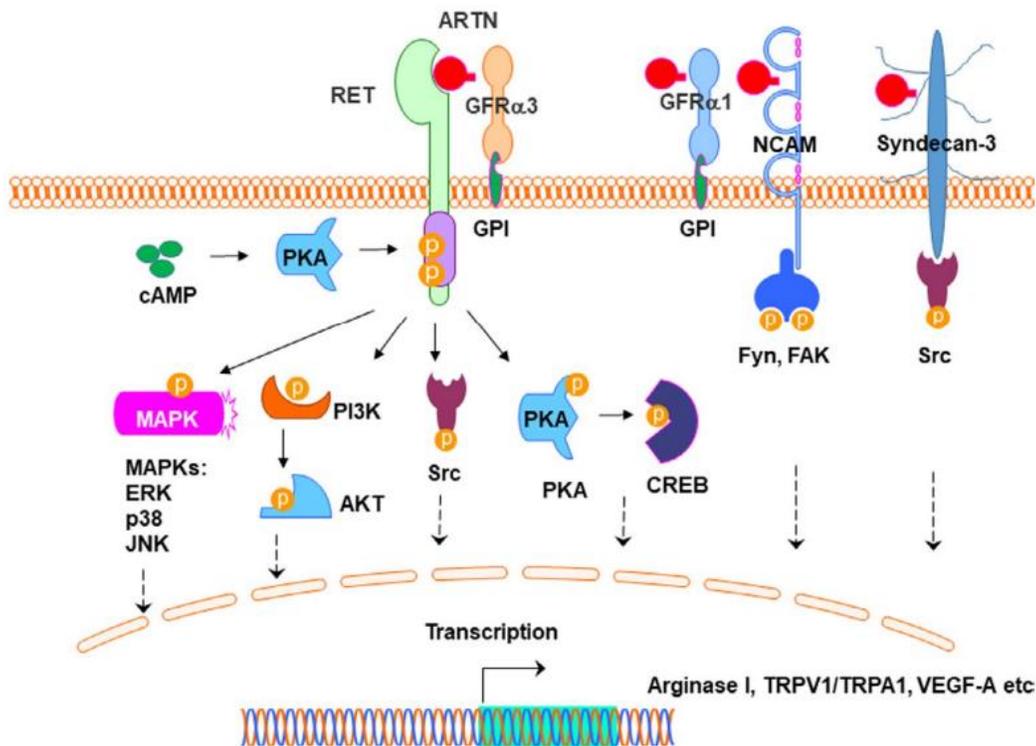


Figura 7. Señalización de artemina. ARTN regula la activación del complejo receptor GFR α 3/RET. ARTN se une a GFR α 3 que se une a la membrana a través del anclaje GPI. El complejo GFR α 1/RET es un receptor putativo para ARTN. Las cascadas activadas por GFL a través de RET incluyen la fosforilación de MAPK (p-ERK, p-p38 y p-JNK), PI3K-AKT y Src. NCAM es un receptor de señalización alternativo para ARTN solo en presencia de GFR α 1, lo que lleva a la activación de Fyn y FAK. ARTN también interactúa con

Proteoglicano de Heparan Sulfato, regulando una vía alterna en ausencia de RET, a través de la activación de cinasas de tipo Src. [34].

6. GAS1 (Growth Arrest Specific 1)

Gas1 es una proteína estructuralmente similar a los GFR α 's [47] que modula negativamente la señalización del GDNF, por lo que cuando se expresa induce arresto del ciclo celular y estimula apoptosis [48,49]. Esto convierte a esta proteína en una potencial alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer. GAS1 también se expresa durante el desarrollo embrionario, donde actúa como modulador positivo de Sonic hedgehog (Shh) [50].

Es importante destacar que GAS1 también regula la señalización de RET ya que puede unirse a dicha proteína de manera similar a como lo hacen los receptores GFL's [51]. La interacción GAS1-RET induce dimerización y rearrreglo conformacional de RET lo que estimula la autofosforilación de sus sitios de tirosina (Y1062), activando a PI3K/AKT, conduciendo a la célula a procesos de proliferación y supervivencia celular. Por otro lado, se propone que GAS1 inhibe la fosforilación de la tirosina 1062 del receptor RET, lo que conlleva a la inactivación de AKT que ya no puede fosforilar a BAD, el cual se transloca a la mitocondria y se une a BCL2/BCL-x, induciendo así la liberación de citocromo C, que junto con Apaf-1 y la caspasa 9 forman el apoptosoma, de este modo se activa a la caspasa 3 ejecutora, que induce la muerte celular por apoptosis (Figura 8) [39].

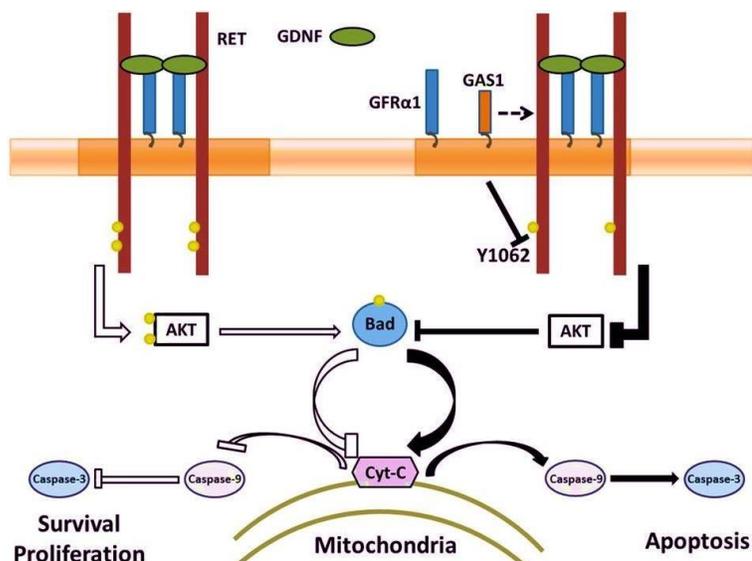


Figura 8. Vía de señalización de GDNF/GFR-GAS1. En esta imagen se observan 2 vías, de lado izquierdo la unión de GDNF a su ligando GFRα1, permite el reclutamiento de RET y da lugar a su autofosforilación, activando a PI3K y este a su vez activa a AKT, de esta manera fosforila a Bad, evitando su translocación a la mitocondria por lo que se inhibe la liberación del citocromo C, dando lugar a la proliferación y supervivencia celular, por otro lado de lado derecho se observa la vía propuesta por Zarco et,al,2012, la presencia de GAS1 reduce la fosforilación en tirosina 1062 inhibiendo la actividad de AKT, esto permite la defosforilación de Bad y consecuentemente su translocación a la mitocondria, dando lugar a la liberación del citocromo C, activando la vía de las caspasas [39].

7. Características importantes de GAS1

GAS1 presenta homología estructural con los receptores GFRα's, los receptores de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) [47]. A través del programa ProtoNET 4.0 se encontró que GAS1 muestra una similitud con los GFRα1-4 en aves, roedores y primates. GAS1 está conformada por α-hélices, una región carboxilo terminal y muestra un dominio D3 similar al de GFRα1 de rata (Figura 9).

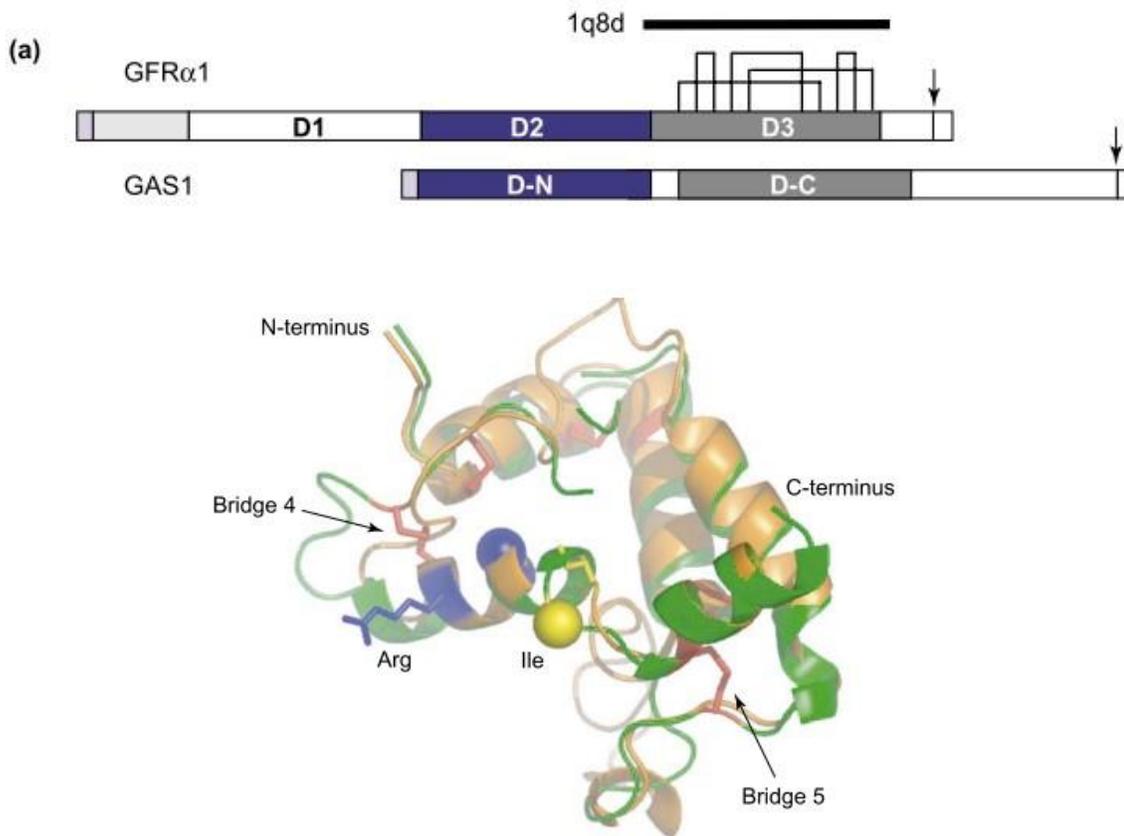


Figura 9. GAS1 tiene una estrecha similitud estructural con los GFRas. En la imagen superior se muestra un diagrama donde se indica la homología de los dominios D-N y D-C de GAS1 con los dominios D2 y D3 de GFR α 1, también se observa la presencia de los 5 puentes disulfuro en ambas proteínas. En la imagen inferior observamos la sobrexposición entre el dominio D-N (color verde) y D3 (color naranja) de GAS1 y GFR α 1 respectivamente [47].

7.1 Efecto de la expresión de GAS1

Los trabajos reportados en nuestro grupo de trabajo han evidenciado que la sobre expresión de GAS1 reduce la fosforilación de RET en la tirosina 1062 por lo que atenúa la señalización de AKT inducida por GDNF [39].

Como consecuencia en líneas celulares de glioblastoma C6 y neuroblastoma SH-SY5Y la expresión de GAS1 humano activa apoptosis, (véase figura 8) y reduce el crecimiento de gliomas [48,52].

7.2 GAS1 soluble

GAS1 guarda una estrecha similitud estructural con los GFR α 's, y al igual que ellos se puede producir una forma soluble por la acción de ciertas proteasas como la desintegrina y la metaloproteinasa (ADAM) 10 y 17 permitiendo la separación de GAS1 del ancla GPI [53]. Recientemente se reportó la presencia de una forma soluble de GAS1 en fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, orina y plasma [54].

En nuestro grupo de trabajo se generó una versión soluble de GAS1; la GAS1_{A315} o tGAS1. Dicha proteína reduce la viabilidad celular y sugiere que tGAS1 ejerce un efecto modulador de forma paracrina en células C6 de glioblastoma (Figura 10) [55,56].

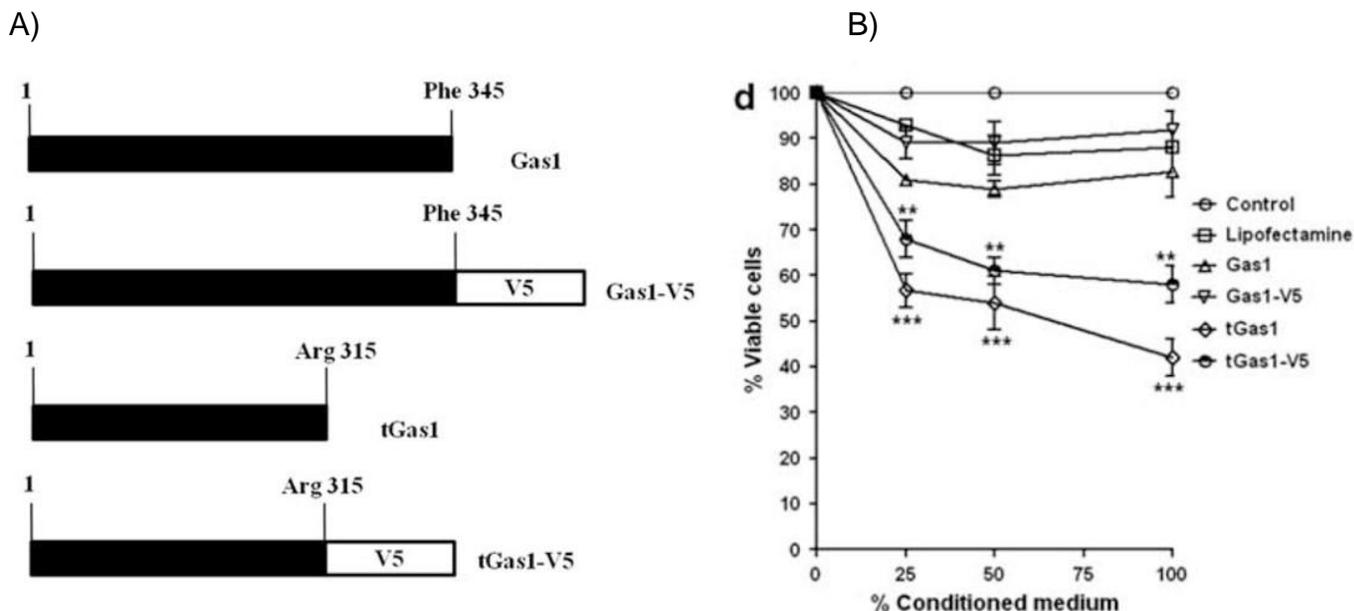


Figura 10. Efecto de la forma soluble de tGAS1 en células de glioblastoma Murino.

A) Representación esquemática de las diferentes formas de GAS1. La proteína completa incluye desde la fenilalanina 345 (GAS1), la forma truncada solo hasta la Arginina 315 (tGas1). B) Los tratamientos con medio condicionado conteniendo tGAS1 (25%,50%,75% y 100%) se observa la disminución de la viabilidad celular en comparación con el control. **P<0.05, ***P<0.001 [55].

Además, Jiménez *et al* en el 2014 demostraron que la forma soluble de GAS1 es más eficiente que la forma completa de GAS1 para inducir muerte celular en un modelo de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, observando una disminución en el número de células viables MDA-MB-231(Figura 11) [57]. Un dato interesante en este trabajo y que comparte con el modelo de este proyecto es que la línea MDA-MB-231 no expresa ni GDNF, ni RET, pero sí artemina y a su receptor GFR α 3 por lo que se evaluó la activación de ERK1/2. Estos resultados demostraron que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con

tGAS1 redujo la fosforilación de ERK1/2, demostrando que tGAS1 inhibe la actividad de la artemina para activar a ERK1/2 (Figura 12) [57].

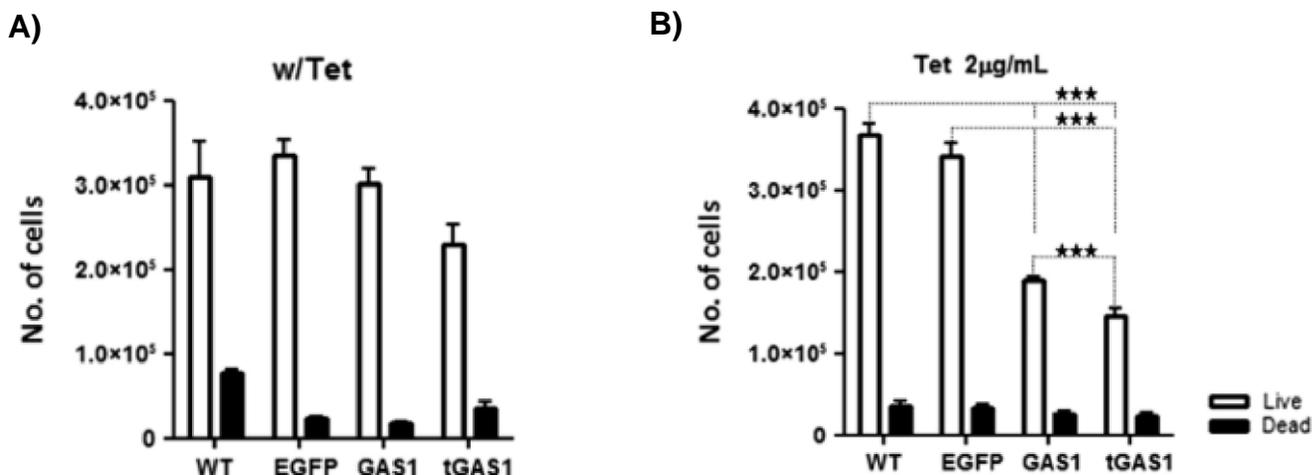


Figura 11. Sobreexpresión de GAS1 y tGAS1 disminuyen la viabilidad de las células MDAMB-231. A) Viabilidad de las células MDA-MB-231 de expresión regulable no se modifica en comparación con las silvestres en ausencia de tetraciclina) Reducción en el número de células MDA- GAS1 y MDA-tGAS1 vivas tras la exposición a tetraciclina (n=3 sin tetraciclina, n=4 con tetraciclina) ANOVA de un factor y Duncan post hoc ***P<0.001 [57].

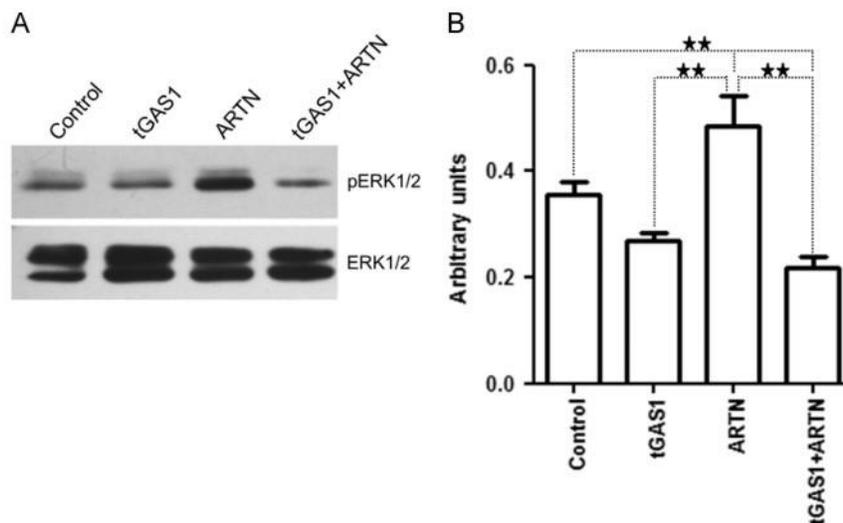


Figura 12. tGAS1 disminuye la activación de ERK bloqueando la señalización de la artemina. A) Análisis por Western blot de la fosforilación de ERK1/2 en presencia y ausencia de tGAS1 y la artemina, B) Análisis densitométrico de pERK1/2 [56].

El efecto combinado de GAS1 y PTEN en sus formas completas y solubles mejora el efecto individual de cada proteína en la muerte celular como se observó con la línea de glioblastoma humano U-87 MG (Figura 13) [58].

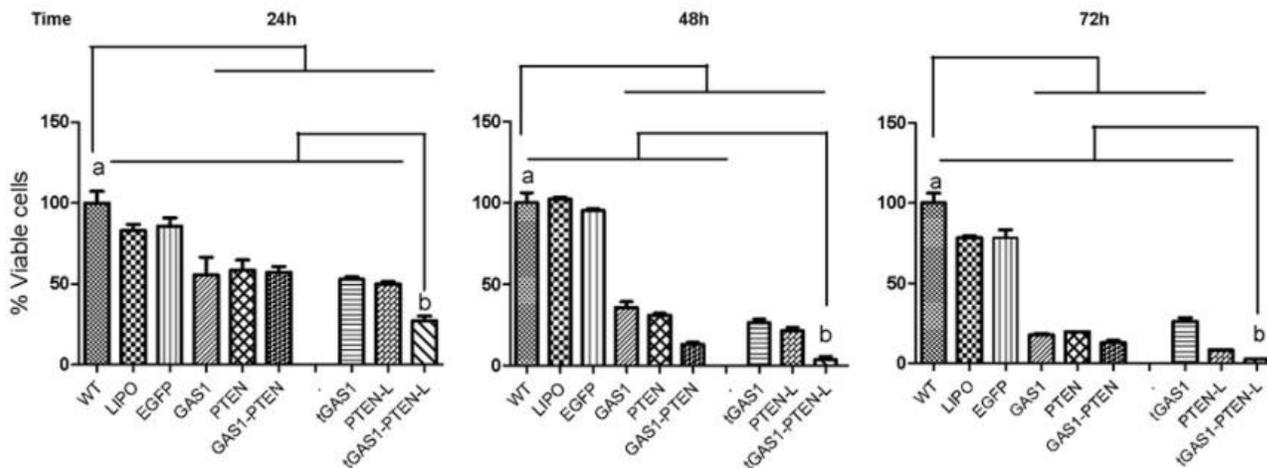


Figura 13. Comparación del efecto de las formas completas y solubles de GAS1 y PTEN sobre la viabilidad celular. Porcentaje de células U-87 MG viables, determinadas con azul de tripano en diferentes tiempos, después de la transfección con GAS1, PTEN o ambas aplicadas simultáneamente, así como con las formas solubles, tGAS1, PTEN-L o ambas simultáneamente [58].

También se evidenció en un modelo *in vivo* de glioblastoma el efecto de un vector lentiviral que expresaba las formas solubles de tGAS1 y PTEN-L, donde observaron una disminución en el peso y volumen del tumor en comparación con los controles. Por lo que determinaron la vía de señalización de AKT y ERK observando una disminución en la fosforilación de ambas proteínas (Figura 14).

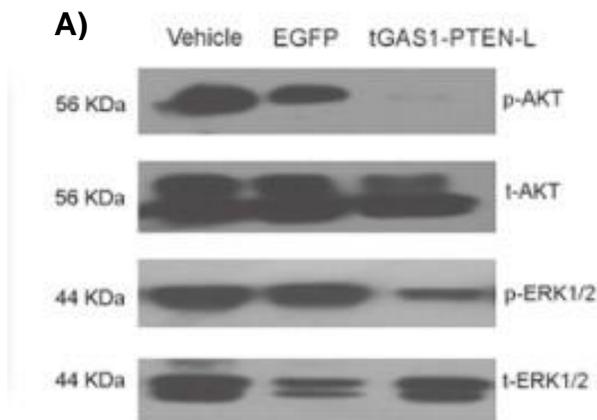


Figura 14. Efecto de la expresión de tGAS1-PTEN-L en un modelo de ratón *in vivo*. A) Inhibición de la fosforilación de AKT y ERK en extractos de proteínas totales de los tumores tratados con tGAS1-PTEN-L [58].

8. PTEN (Homólogo de fosfatasa y tensina eliminado en el cromosoma 10)

El homólogo de fosfatasa y tensina eliminado en el cromosoma 10 (PTEN) es una fosfatasa dual, es decir tiene actividad fosfatasa tanto para proteínas como para lípidos. PTEN se descubrió por primera vez como un supresor de tumores con funciones reguladoras de crecimiento y supervivencia [59].

PTEN es un regulador negativo de la vía de señalización de AKT ya que desfosforila el fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfato (PIP3) a fosfatidilinositol-2,4 (PIP2) (Figura 15) [60]. Cuenta con un dominio PBD, que se encuentra en el extremo N terminal de PTEN, el cual es importante para la localización en la membrana y la actividad catalítica de PTEN, mientras que el C-terminal, contiene un dominio PDZ un dominio importante que sirve para la regulación y estabilidad de PTEN (Figura 16) [61-63].

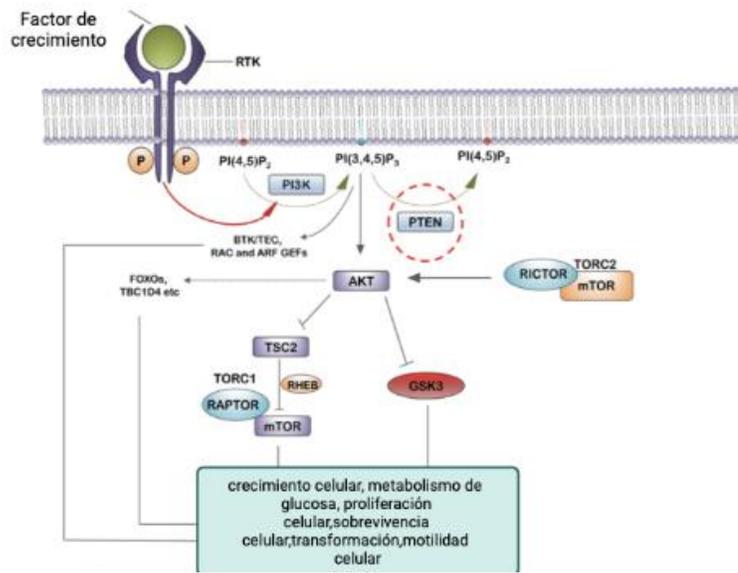


Figura 15. PTEN actúa como un antagonista de PI3K desfosforilando PIP3 y convirtiéndolo de nuevo en PIP2. La unión de diversos ligandos a sus receptores de superficie celular afines activa PI3K. Los receptores incluyen muchos factores de crecimiento y citocinas, así como quimiocinas y neurotransmisores y sus receptores. La PI3-quinasa activada fosforila el fosfoinositol de membrana PI (4,5) P2 convirtiéndolo en PI (3,4,5) P3 que luego continúa la cascada de señalización regulando un gran grupo de unión a PIP3 proteínas que incluyen AKT [60].

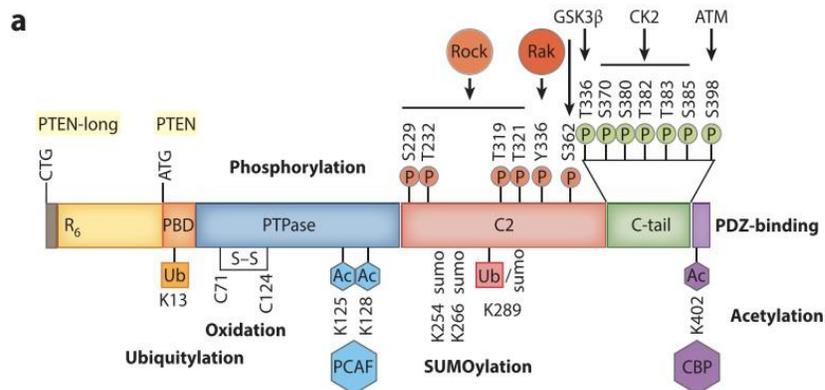


Fig.16 Regulación de PTEN por modificaciones postraduccionales. PTEN es modificada ampliamente por fosforilación en sus dominios C2 y Carboxilo terminal. Otras modificaciones incluyen ubiquitilación, oxidación, sumoilación y acetilación. Una forma extendida N-terminal de PTEN, de longitud PTEN-long, inicia la traducción cadena arriba en

un codón CTG en marco, agregando 173 aminoácidos. El segmento adicional contiene un péptido señal (rectángulo marrón) para la entrada en la vía secretora y un tramo de residuos R para la captación en las células adyacente [61].

8.1 Variantes de PTEN

En el año 2013 se identificó una isoforma de PTEN a la que denominaron PTEN Long (PTEN-L que es una variante transcripcional y se traduce desde el codón de inicio CUG de la región de traducción alternativa (ATR), en el extremo N-terminal de PTEN [64].

PTEN-L puede ser secretado por una célula y ser captado por otras células vecinas para inhibir la vía de señalización de PI3K-AKT tanto *in vitro* como *in vivo* [65]. PTEN -Long comparte los mismos dominios con PTEN, además la región de traducción alternativa (ATR) contiene una secuencia señal de polialaninas secretables (Poli-A), un motivo celular permeable de poliarginina (Poli-R), una secuencia de localización nuclear (NLS, QKKPRH), así como una hélice α de unión a membrana (MBH) (Figura 17).

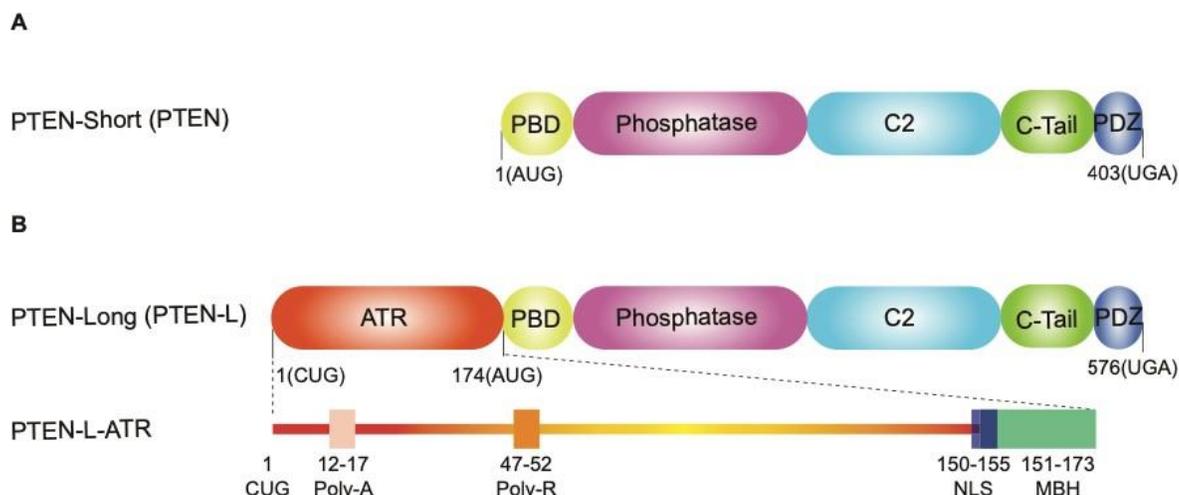


Figura 17. Estructura de dominio de las isoformas homólogas de fosfatasa y tensina (PTEN). (A) PTEN-corto (PTEN canónico), es traducido desde un codón de inicio AUG, (B) PTEN Long (PTEN-L) se traduce desde un codón de inicio CUG río arriba del codón

de inicio AUG clásico. PTEN-L contiene una región de traducción alternativa (ATR) que agrega 173 aminoácidos en el extremo N- terminal [62].

8.2 PTEN-L secretable

Se ha demostrado que PTEN se empaqueta en exosomas y puede ser secretada y permanecer fuera de la célula en estas estructuras, lo que además le permite ser transferido de una célula a otra por medio de vesículas (Figura 18 y 19) [66,67]. Los exosomas son vesículas extracelulares (EV) con un rango de tamaño de aproximadamente 40 a 160 nm (promedio ~100 nm) de diámetro con un origen endosómico. La invaginación de la membrana plasmática da como resultado la formación de cuerpos multivesiculares, que pueden cruzarse con otras vesículas y orgánulos intracelulares, lo que contribuye a la diversidad de los componentes de los exosomas. Dependiendo de la célula de origen, los exosomas, pueden contener muchos componentes de una célula, incluidos ADN, ARN, lípidos, metabolitos y proteínas citosólicas (Figura20) [68].

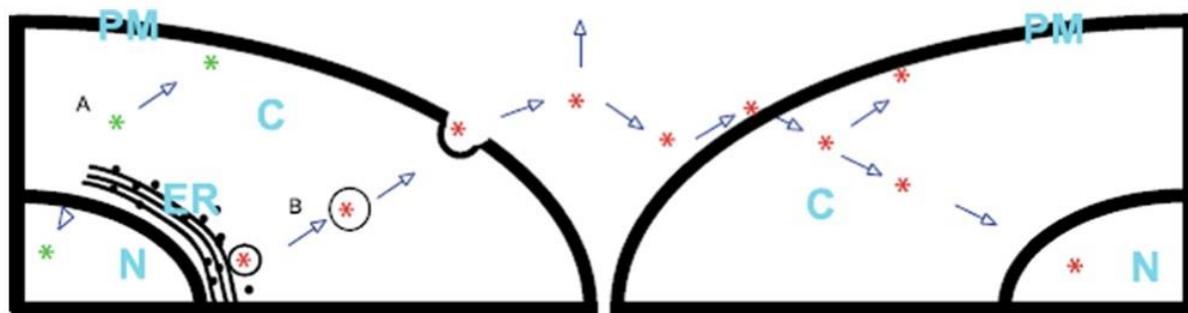


Figura 18. Tráfico de PTEN-LONG. (A) PTEN-LONG (Verde *) se traduce y puede actuar en su célula de origen de manera similar al PTEN canónico. PTEN-Long puede actuar en el núcleo 'N', el citoplasma 'C' o en la membrana plasmática 'PM'. (B) La traducción de PTEN-Long (Rojo *) ocurre en el retículo endoplásmico 'ER' y la proteína sintetizada se transporta en el lumen de la vesícula secretora. Posteriormente las vesículas viajan a la membrana donde se fusionan y liberan PTENLONG en el espacio extracelular. Una vez fuera de la célula, PTEN-LONG puede interactuar con proteínas y lípidos extracelulares,

así como con glicoproteínas heparinadas en la superficie celular para ingresar a las células. Una vez dentro de la célula, PTEN-LONG puede actuar como el PTEN canónico y circular dentro del citoplasma o migrar al núcleo, aumentando así la dosis intracelular de PTEN en la célula receptora [74].

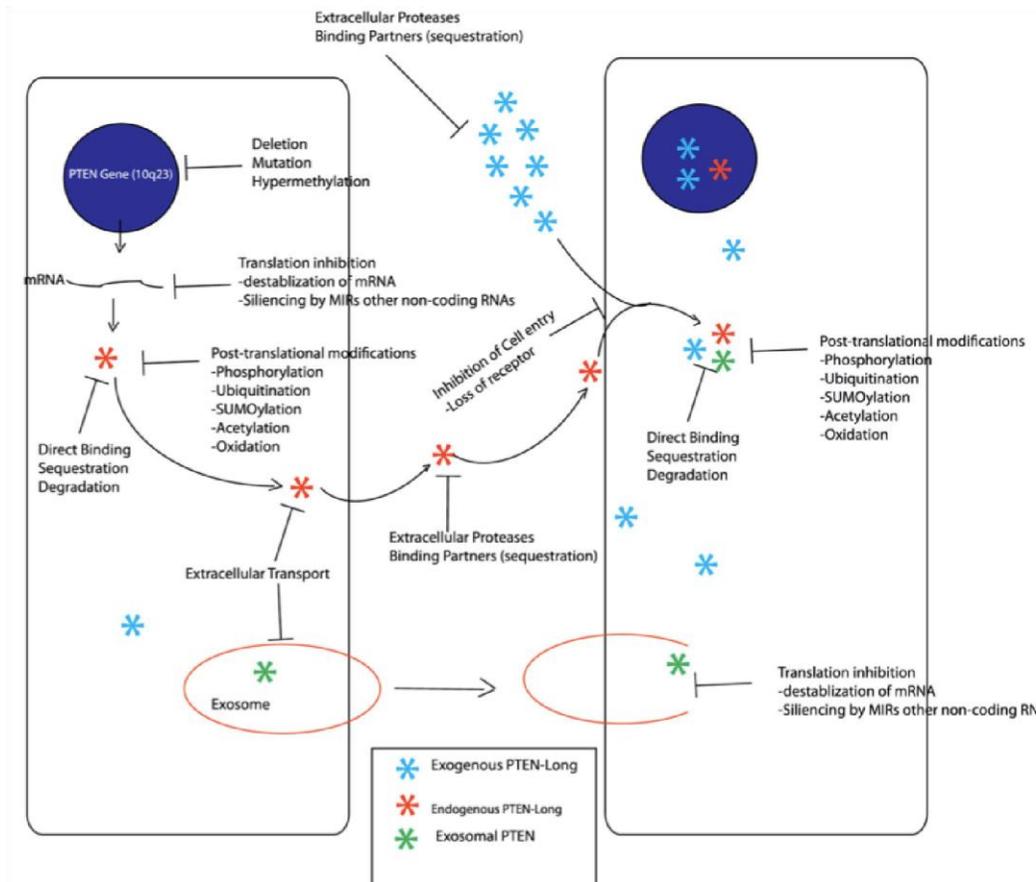


Figura 19. Regulación de las formas secretadas de PTEN. PTEN puede generarse en una célula y luego actuar en otras, PTEN-L, una variante tradicional de PTEN identificada recientemente, que contiene todos los dominios de PTEN, presenta una región de traducción alternativa (ATR) en el extremo N-terminal, además de presentar 173 aminoácidos adicionales. PTEN-L ATR contiene una secuencia señal con un sitio de corte putativo, que permite que PTEN-L sea secretado [74].

Los componentes como proteínas, lípidos, metabolitos, moléculas pequeñas y iones pueden entrar en las células, junto con las proteínas de la superficie celular, a través de endocitosis y la invaginación de la membrana plasmática [69,70]. Los cuerpos multivesiculares (MVB) pueden fusionarse con los autofagosomas y en

última instancia, el contenido puede sufrir una degradación en los lisosomas. Los MVB que no siguen esta trayectoria pueden transportarse a la membrana plasmática a través de la red de citoesqueleto y microtúbulos de la célula y acoplarse en el lado luminal de la membrana plasmática con la ayuda de proteínas de acoplamiento de MVB.

Posteriormente continua la exocitosis y da como resultado la liberación de los exosomas con una orientación de bicapa lipídica similar a la de la membrana plasmática [70]. Varias proteínas están implicadas en la biogénesis de exosomas e incluyen Rab GTPasas, proteínas ESCRT, así como otras que también se usan como marcadores para exosomas (CD9, CD81, CD63, flotillina, TSG101, ceramida y Alix). Las proteínas de la superficie del exosoma incluyen tetraspaninas, integrinas, proteínas inmunomoduladoras [72-75].

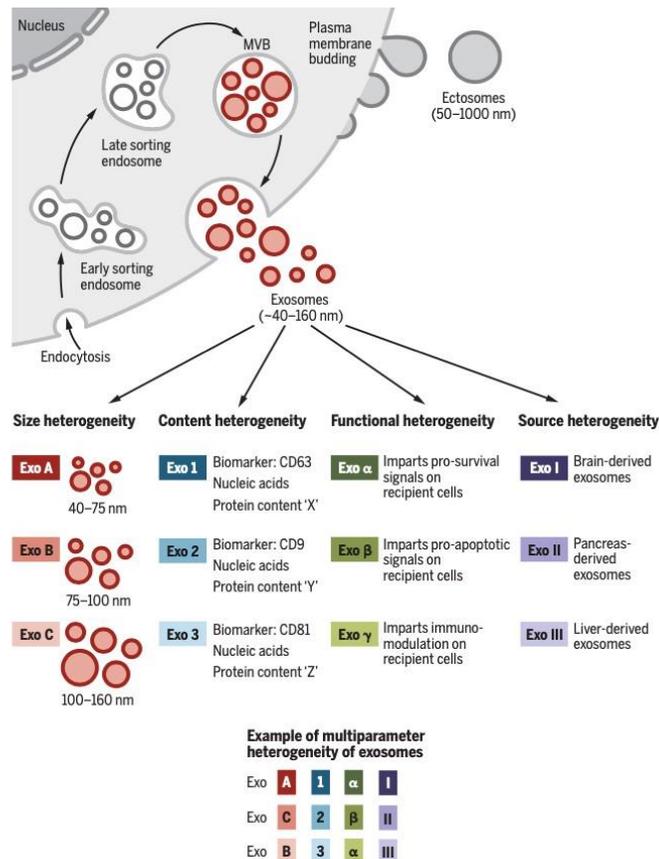


Figura 20. Identidad y heterogeneidad de vesículas extracelulares y exosomas. Los exosomas son una población muy heterogénea y tienen distintas capacidades para inducir una respuesta biológica. La heterogeneidad de los exosomas se puede conceptualizar en función de su tamaño, contenido, impacto funcional en las células receptoras y célula de origen. Distintas combinaciones de estas características dan lugar a una compleja heterogeneidad de exosomas [69].

9. Justificación

El cáncer de páncreas representa uno de los tumores sólidos más agresivos y la supervivencia de los pacientes es de aproximadamente 5 años, principalmente por el retraso en su diagnóstico. El adenocarcinoma ductal pancreático (ADCP) es el más común y constituye el 90% de todos los cánceres pancreáticos. En México hay una incidencia de 4,985 casos (2.5%) y una mortalidad 4,720 casos (5.2 %).

Está demostrado el papel de GAS1 para inhibir el crecimiento de diversos tumores como glioblastomas y cáncer de mama ya que disminuye la fosforilación de RET en la tirosina 1062 y por consiguiente disminuye la activación de AKT, llevando a la célula a procesos de muerte por apoptosis. También está reportado que el uso de PTEN suprime el reclutamiento de AKT a la membrana celular, favoreciendo la desfosforilación de PIP3 y por lo tanto su activación.

En este proyecto sugerimos el uso de las dos proteínas GAS1 y PTEN solubles por su acción al disminuir la activación de AKT y ERK, siendo una interesante estrategia terapéutica en enfermedades como el cáncer de páncreas.

10. Hipótesis

El uso de tGAS1 y PTEN-L solubles inhibirá la proliferación, la invasión celular e inducirá muerte celular en un modelo *in vitro* e *in vivo* de cáncer de páncreas.

11. Objetivo general

Evaluar el efecto de tGAS1 y PTEN-L sobre la viabilidad, invasión celular *in vitro* y en un modelo de cáncer de páncreas.

12.Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión basal de GAS1, PTEN y de las proteínas asociadas a la familia de GDNF: artemina, RET, GFR α 3 en la línea de cáncer de páncreas HPAF-II.
2. Evaluar el efecto en la proliferación de las células HPAF-II transfectadas con los plásmidos: tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L simultáneamente.
3. Evaluar la actividad de la caspasa 3 como marcador de la apoptosis en las células tratadas con las formas solubles de tGAS1, PTEN-L, tGAS1-PTEN-L.
4. Evaluar el efecto de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L en la vía de señalización de: AKT, ERK.
5. Evaluar el efecto de las formas solubles de tGAS1, PTEN-L, tGAS1-PTEN-L sobre la invasión de las células HPAF-II.
6. Realizar un modelo de cáncer de páncreas heterotópico, en ratones inmunosuprimidos con la línea celular HPAF-II y evaluar el efecto de los lentivirus tGAS1-PTEN-L.
7. Determinar la expresión de AKT, ERK1/2 y Caspasa 3 en los tumores tratados con los lentivirus tGAS1-PTEN-L.

13. Materiales y métodos

13.1 Cultivo celular HPAF-II

La línea celular de cáncer de páncreas HPAF-II (adenocarcinoma pancreático humano, donado por el Dr. Daniel Martínez Fong) es una línea derivada del líquido ascítico peritoneal de un varón de raza blanca de 44 años con adenocarcinoma pancreático primario con metástasis en el hígado, el diafragma y los ganglios linfáticos.

Las células de cáncer de páncreas humano HPAF-II fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Gibco Life Technologies), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco Life Technologies) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Por otra parte se cultivaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y células de glioblastoma humano U-87 MG en DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium High-Glucose) (Gibco Life Technologies)(estas líneas fueron usadas como controles positivos en los experimentos de caracterización de la línea HPAF-II) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Gibco Life Technologies), L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomycin (Gibco Life Technologies), y mantenida a 37°C en una atmósfera de 95% de aire, 5% de CO₂.

13.2 RT- PCR de punto final

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se trataron 2 µg de ARN con ADNasa (Invitrogen) y se realizó la retro-transcripción a cDNA utilizando 1µl de transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen), la reacción de la muestra con M-MLV se mezcló e incubó a 37°C por 50 min, posteriormente se incubó a 70°C por 15 min para inactivar a la enzima, posteriormente se realizó la PCR. Para amplificar el RNAm de *GAS1* humano, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Fw:5´ CTGTGCCTGATGGCGCTGCTGC-3 y Rv: 5'ATGAGGGCCGAGATGCAGTGA-3', para la β - *actina* humana: Fw 5´TGGCACCACACCTTCTACA 3´, Rv:5´-TCAC -GCACGATTCC -3' [52]. Para amplificar *GFR α 1* humano, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: 5´-CTGCAGCACCAAGTACCGCA-3' y 5'-ACCTTGACTCTGGCTGGCAGT-3' [76]. Para amplificar *RET* humano, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Fw: 5GGGATCACCAGGAACTTCTCC-3' y 5'-GGGAGGCGTTCTCTTTCAGC-3' [52]. Para amplificar *GDNF* humano, se usaron los siguientes oligonucleótidos: Fw:5'GAAGTTATGGGATGTCGTGGC-3' y 5'-GACAGGTCATCATCAAAGGCG-3' diseñados en el programa primer-BLAST. Para amplificar la *ARTN* humana, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Fw: 5'-CAGCCTAAAAGACACACCAGAGAC-3' y Rv:5'-GCACTTTCAACCAAGCAACTGC-3' diseñados en el programa primer-BLAST. Para amplificar *GFR α 3* humano, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Fw:5'CTCTGCCTCAAGTTTGCCATG-3' y 5'-CAGGGTTTTTCATTCTGGTGTGC-3', diseñados en el programa primer-BLAST. Los productos de la PCR se obtuvieron después de 40 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridación de 55°C - 66°C.

13.3 Transfección de vectores de expresión

Para todos los tratamientos se sembraron 1×10^6 células HPAF-II en placas de 60 mm y se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 80-90%. Después de 24h, las células se transfectaron con lipofectamina 3000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante, con cada uno de los siguientes plásmidos de expresión: tGAS1 (pLenti6.3 / TO / V5-tGAS1) y PTEN-L (JpExpress404 PTEN- Long) o la combinación: tGAS1 y PTEN-LONG (PTEN-L) (pLenti6.3 / TO / V5-tGAS1 y JpExpress404 PTEN-Long), descritas anteriormente [39]. Como control, las células se transfectaron con el plásmido pDsRed2-N1 (proteína roja fluorescente), las células tratadas solo con lipofectamina y las células no tratadas también se usaron como controles. Todas las transfecciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones: 10 μ g de plásmidos y 24 μ l de lipofectamina 3000 (Invitrogen, Cat. # L3000001).

13.4 Ensayos de viabilidad celular

Para realizar los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 60,000 células en placas de 24 pozos. La viabilidad fue evaluada a las 24, 48, 72 y 96 h después de la exposición a los tratamientos, la viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión de Azul Tripán (Sigma Aldrich).

13.5 Análisis de *Western blot*

La extracción de proteínas se realizó utilizando una solución de lisis que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (Cat No.11697498001, Merck), y la cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método del ácido bicinonínico (Pierce; Rockford, IL). Se procesaron 50 μ g de proteína total y se separaron en geles SDS-PAGE al 12%, los geles se corrieron a 100V por 1h y se transfirieron a

membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon por 1h a temperatura ambiente en agitación con leche libre de grasas al 5% con TBS-tween, posteriormente se incubaron a 4°C con los anticuerpos primarios contra AKT total (Cat No. 4691, Cell Signaling Technology, 1:5000), AKT fosforilado (Cat No. 9271, Cell Signaling Technology, 1:1000), PTEN (Santa Cruz Biotechnology, 1:250) ERK 1/2 (Cat No. 9102S, Cell Signaling Technology, 1:5000), ERK fosforilado (Cat No. 9106S, Cell Signaling Technology, 1:500), β -actina (Cat No. A3854, Sigma Aldrich, 1:10,000). Las membranas fueron lavadas y después se incubaron por 1h con el anticuerpo secundario correspondiente, el anti-conejo y el de anti-ratón (Invitrogen, 1:3000). La presencia de las proteínas se reveló por quimioluminiscencia (Perkin Elmer), las imágenes de las películas se analizaron usando el sistema UVP BioImaging System y los análisis densitométricos se analizaron con el *software* LabWorks (UVP, Upland, CA).

13.6 Determinación de la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3

La extracción de las proteínas se obtuvo usando una solución amortiguadora de lisis que contenía inhibidores de proteasas (Cat No. 11697498001, Merck). Se tomaron 50 μ g de proteína de los cultivos celulares de la línea HPAF-II y de los tumores y se procesaron en geles SDS-PAGE, luego se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad) que después se bloquearon durante 1h con una solución de leche al 5% / en TBS/Tween al 0,1%. Las membranas se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios contra Caspasa-3 humana (diluida 1: 300; Cat No. 9662, Cell Signaling Technology). Los lavados posteriores se realizaron con TBS/Tween al 0,1% y luego las membranas se incubaron durante 1h con anti-conejo diluido 1: 500 (Invitrogen), seguido de lavados con TBS/Tween al 0,1%. La presencia de proteínas se reveló por quimioluminiscencia (Perkin-Elmer). Las imágenes se capturaron y analizaron como se describió anteriormente.

13.7 Cultivo primario de células del ganglio de la raíz dorsal

Se utilizaron ganglios de la raíz dorsal (DRG), de ratones CD1 postnatales de 2-7 días de edad, para los ensayos de invasión *in vitro*. Todos los procedimientos animales se realizaron de acuerdo con la legislación mexicana vigente NOM-062ZOO-1999 (SAGARPA) y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y aprobada por el Comité Institucional (CICUAL del CINVESTAV). Los DRG se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml con medio neurobasal sin suplementos, se centrifugaron a 1800 rpm por 2 min, posteriormente se colocó 1 ml de medio neurobasal con 0.020 mg de tripsina y 10 mg de DNAsa I y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 30 min, luego se disociaron mecánicamente con una pipeta Pasteur. El producto de este procedimiento se centrifugó durante 2 min en medio RPMI y se lavó con solución salina de Hank equilibrada fría (HBSS) (Gibco Life Technologies); este procedimiento se realizó tres veces. Después del último lavado, se eliminó el sobrenadante y la suspensión celular se colocó en una placa de cultivo de 35 mm (Corning) con cubreobjetos de 12 x 10 mm (Corning) pre-tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron en medio neurobasal con suplementos: B27 (Gibco B-27 suplemento 50X, No de catálogo 17504-044) N2 (Gibco N-2 suplemento 100X, No de catálogo 17502-048), Piruvato, L-glutamina 2 mM (Sigma - Aldrich), 100 U / ml de Penicilina y 100 µg / ml de Estreptomicina (Gibco Life Technologies), y mantenidos a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

13.8 Inmunofluorescencia

Los cultivos de DRG se fijaron con p-formaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) preparado en PBS (pH 7,4) y se incubaron con BSA al 1% (Jackson ImmunoResearch) y el anticuerpo contra β -tubulina-III (TUJ-1) (diluido 1: 500, Cat No. MCA-1B12, EnGGcor Biotechnology). El anticuerpo secundario fue Cabra-Anti- IgG de ratón (H + L) (diluido 1: 300 Cat No. 115-095-003, Jackson ImmunoResearch) con fluoresceína (FITC) - Afinipure. Las células fueron contrateñidas con DAPI para revelar los núcleos.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 acoplado a una cámara CoolSNAP-Procf Color con el software Image-Pro-PLUS (Media Cybernetics, Inc.).

13.9 Efecto de las formas solubles de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L sobre la invasión neuronal

Se obtuvieron los medios condicionados de células transfectadas con los plásmidos de expresión tGAS1, PTEN y tGAS1-PTEN-L a partir de células HPAF-II transfectadas con lipofectamina 3000 (Invitrogen). Los medios condicionados fueron centrifugados y filtrados en poros de 0.22 μ m (Millipore) antes de su aplicación.

14. Ensayo de invasión *in vitro*

Los ensayos de invasión se realizaron utilizando un método modificado de cámara de Boyden en placas de 24 pocillos que contenían 12 inserciones de cultivo para células con membranas con tamaño de poro de 8 μ m (Costar, Corning Inc.). Brevemente, se agregaron 50 μ l de matrigel (Falcon) en los insertos de cultivo y se mantuvieron durante 1h a 37°C. Posteriormente se sembraron 3x10⁴ células

cancerosas (HPAF-II) en la cámara superior de placas de 24 pocillos en medio de cultivo al 0.1 % de suero. Las cámaras inferiores se sembraron con células DRG (ver Materiales y métodos) y las células se incubaron con el medio obtenido de cultivos que contenían tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L, y el medio de control que contenía FBS al 10%. Se permitió que las células invadieran a través de la membrana recubierta de matrigel durante 48h y las células no invasoras se eliminaron de la membrana superior. Las células se fijaron por 15 min con p-formaldehído al 4% y se tiñeron con violeta cristal al 0,1% y se contaron las células que cruzaron los filtros.

14.1 Producción lentiviral

Los vectores lentivirales se obtuvieron como se describió anteriormente [39]. Brevemente, pLenti6.3 / TO / V5-tGAS1-p2A-PTEN-L y pLenti6.3 / TO / V5-EGFP se produjeron de acuerdo con el protocolo del fabricante (ViraPower™ HiPerform™ TREx™ Gateway™ Expression System, Invitrogen) y transfectadas independientemente en células HEK 293FT usando lipofectamina 3000 (Invitrogen, Cat No. L3000001). Después de 48h de incubación, se obtuvieron los medios de cultivo que contenían los lentivirus, el medio de cultivo se recuperó y se centrifugó a 30,000 rpm por 2.5h, se filtraron y se concentraron. El título viral se determinó posteriormente de acuerdo con el protocolo del fabricante.

14.2 Determinación de los niveles de GAS1 y PTEN por ELISA

La técnica de ELISA se realizó usando *kits* comerciales de ELISA para GAS1 DuoSet humano (R&D Systems, EE. UU.; Cat No. DY2636) y para PTEN humano (Cell Signaling Technology, EE. UU, Cat No. 7882), en los medios de cultivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

14.3 Modelo de tumor *in vivo*

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación mexicana vigente NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y aprobada por el Comité Institucional (CICUAL del CINVESTAV). Los animales (ratones macho *nu/nu*) se mantuvieron con acceso *ad libitum* a alimentos y agua en condiciones asépticas con sistemas de control de luz y clima. Se inocularon por vía subcutánea 1×10^6 células HPAF-II en los flancos de ratones desnudos macho de 6-8 semanas de edad (*nu/nu*) y se dejaron crecer hasta que el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 30 mm^3 . Posteriormente, a los animales se les inyectó por vía intratumoral durante 3 días (días 0, 2 y 4) con 1.5×10^6 vp (partículas virales) de virus tGAS1-p2A-PTEN-L, lentivirus EGFP o medio de cultivo sin suero, a un volumen final de 6 μl . Se determinó el crecimiento del tumor y se calculó el volumen del tumor usando la siguiente fórmula: $V = (\text{largo} \times \text{ancho}^2) / 2$. Cuatro semanas después del inicio de los tratamientos, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, los tumores se disecaron, pesaron, homogeneizaron y procesaron para la extracción de proteínas con un tampón de lisis que contenía un cóctel inhibidor de proteasas (Completo; Sigma-Aldrich) para determinar la expresión de AKT, ERK1 / 2, y sus formas fosforiladas y la caspasa-3 mediante ensayos de *Western blot*, como se describió anteriormente.

14.4 Análisis estadístico

Para la viabilidad celular, los niveles de proteína determinados por análisis de *Western blot*, el ensayo de invasión, el peso del tumor y los niveles de GAS1, PTEN por ELISA en tumores, usamos ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Duncan o la de Tukey. Para el análisis del crecimiento tumoral, se analizaron los datos *in vivo* del volumen tumoral con observaciones independientes a lo largo del tiempo en la misma unidad experimental utilizando un método de parcelas divididas, de acuerdo con el siguiente modelo de volumen tumoral: $V_{i, j, k} = \mu + Tr_i + \epsilon_{ij} + t_k + [Tr * t]_{i, k} + \delta_{i, j, k}$; donde $\epsilon_{ij} \sim N [0, \sigma^2_{fp}]$ y $\delta_{i, j, k} \sim N [0, \sigma^2_{sp}]$ (donde fp es la parcela completa y sp es la parcela dividida), los tratamientos (Tr) $i = 1, 2$ y 3 representan vehículo, EGFP y tGAS1-PTEN-L, repeticiones $j = 1, 2$ y 3 , tiempo $k = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19$ y 28 días, pruebas posthoc de Duncan se realizaron para mostrar las diferencias entre los tratamientos y la interacción temporal de los tratamientos. Las pruebas se realizaron utilizando el *software* NCSS o SPSS. $p < 0.05$ se consideró significativo.

15. Resultados

15.1 Caracterización de la línea celular HPAF-II

La expresión de *Gas1*, *GFR α 1*, *Ret*, *artemina*, *Gdnf*, *GFR α 3* se evaluó en la línea celular HPAF-II a través de la RT-PCR (Figura 21A) y se utilizaron como control positivo para *Gas1* la línea celular SY-SY5Y (sin suero, condiciones de detención del ciclo celular) y como control positivo para la *artemina*, *Gdnf* y *GFR α 3* la línea celular U87. En los resultados de la caracterización de las células HPAF-II, se observó que la línea expresó *artemina* y *GFR α 3* (figura 21 A). La artemina es un ligando de la familia de GDNF que se acopla a su receptor *GFR α 3*, involucrado con la proliferación, invasión y angiogénesis. También observamos que la línea HPAF-II no expresó *Gas1*, *GFR α 1*, *Ret* ni *Gdnf* y por *Western blot* se evaluó la ausencia de PTEN (Figura 21 B), demostrando que la línea HPAF-II no expresa PTEN, por lo que está línea celular es un modelo para evaluar el tratamiento combinado de GAS1 y PTEN.

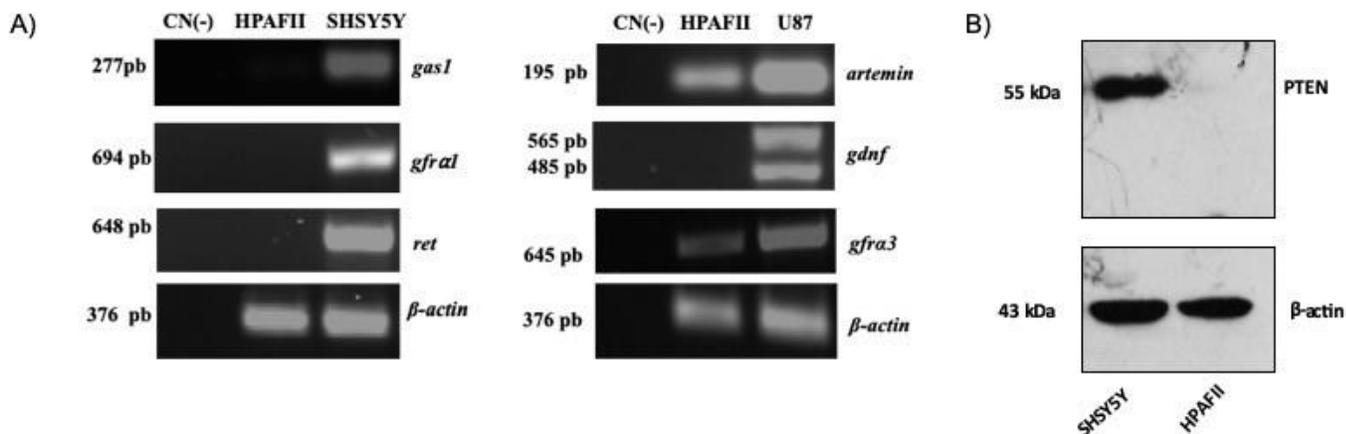


Figura 21. Caracterización de las células de cáncer de páncreas HPAF-II. (A) Las células HPAF-II no expresan *gas1*, *gfra1*, *ret* ni *gdnf*, pero expresan *artemina* y su receptor, *gfra3*. Se utilizaron células SHSY5Y y U87-MG como controles positivos. (B) Las células HPAF-II no expresan PTEN, el cual se evaluó mediante el análisis de *Western blot*; se utilizaron células SH-SY5Y como control positivo; como control de carga se usó la β -actina.

15.2 Efecto de las formas solubles de GAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L sobre la viabilidad celular

Una vez que se caracterizó la línea celular HPAF-II, realizamos ensayos de viabilidad celular. Las células se transfectaron con las formas solubles de GAS1 y PTEN-L de forma independiente y simultánea, además como controles usamos, células sin tratamiento, células tratadas con lipofectamina y células transfectadas con el vector que expresa el gen reportero de la proteína roja fluorescente (RFP).

De manera interesante las células HPAF-II tratadas de forma simultánea con GAS1 y PTEN-L solubles fue el mejor tratamiento, puesto que disminuyeron su viabilidad desde las 24h, tal como se observa en la gráfica, este efecto fue más evidente a las 48, 72 y 96h (Figura 22 A, B, C, D). Observamos que el tratamiento independiente con Gas1 y PTEN-L ejercen un efecto menor a las 24 h y 48 h comparado con el tratamiento simultáneo, si bien su efecto también disminuye la viabilidad de las células desde las 24,48, 72 y 96 h de manera eficaz, es importante mencionar que la línea HPAF-II no expresa GDNF ni RET, por ello sugerimos que en el caso de GAS1 puede estar actuando a través de una vía independiente de RET, por los antecedentes del laboratorio se ha evidenciado que tGAS1 inhibe la actividad de la artemina de tal manera que impide activar la vía de ERK1/2 [57]. La vía de ERK regula procesos celulares como el crecimiento, proliferación celular, diferenciación y apoptosis [77]. Mientras que el tratamiento con PTEN-L actúa directamente en la vía de AKT al disminuir su fosforilación [57] es por ello que observamos una disminución sobre la viabilidad celular desde las 24h en comparación con los controles, mientras que, con el tratamiento combinado, al estar presentes ambas proteínas, se observa un mejor efecto, al actuar sobre 2 vías de señalización, AKT y ERK1/2 respectivamente.

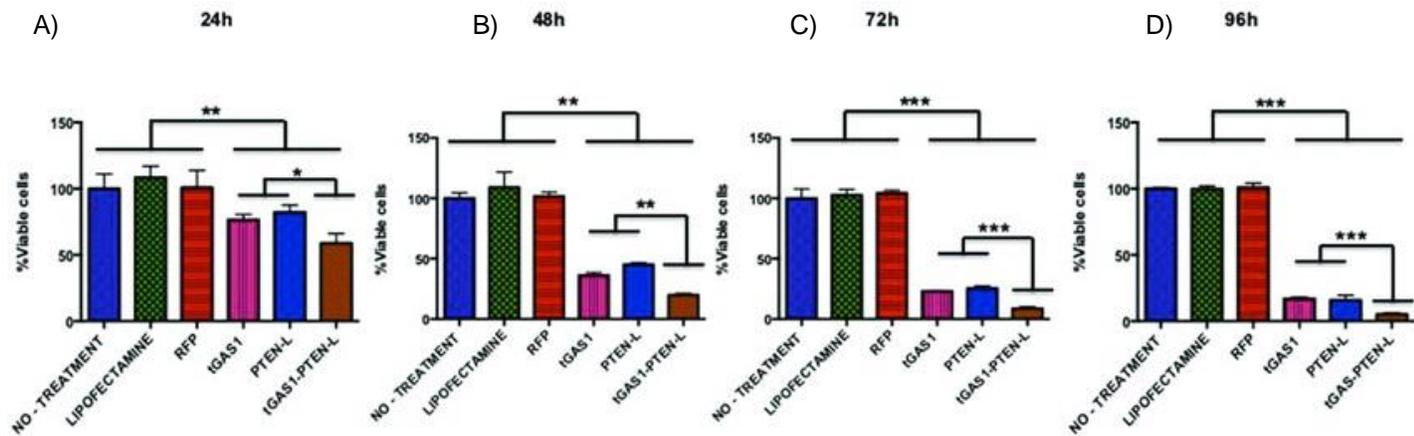


Figura 22. Comparación del efecto de las formas solubles de GAS1 y PTEN sobre la viabilidad celular. Los gráficos muestran el porcentaje de células HPAF-II viables a diferentes tiempos después de la transfección con GAS1, PTEN o ambos transfectados simultáneamente (24,48,72 y 96h). Los controles fueron células HPAF-II no tratadas, células tratadas con lipofectamina o transfectadas con el plásmido de la proteína roja fluorescente (RFP). tGAS1 y PTEN-L fueron más efectivos juntos que cuando se transfectaron de forma individual. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Duncan. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$; $n = 3$.

15.3 Efectos de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L solubles en la vía de señalización de ERK y AKT

Para determinar el mecanismo molecular inducido por tGAS1, PTEN-L y la aplicación simultánea de tGAS1-PTEN-L sobre la viabilidad celular, determinamos la actividad de las vías de señalización asociadas con estas proteínas: AKT y ERK1/2. Las células HPAF-II se transfectaron de forma independiente con tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L de forma simultánea, como controles usamos, células no tratadas, células tratadas con lipofectamina o transfectadas con el plásmido de la proteína roja fluorescente (RFP). 48 h después de la transfección, se observó que PTEN-L inducía una reducción significativa en la actividad de AKT (Figura 23 A). Aunque se observó una tendencia a disminuir, tGAS1 no redujo significativamente la fosforilación de AKT (Figura 23 A). Por otro lado, tanto tGAS1 como PTEN-L promovieron disminuciones significativas en la fosforilación de ERK

1/2, un efecto que fue aún más contundente cuando se transfectaron de forma simultánea (Figura 23 B). Finalmente evaluamos por *Western blot* la activación de

la caspasa-3 como un marcador de muerte celular por apoptosis, los resultados indicaron una activación de caspasa-3, en las células tratadas con tGAS1 y PTEN-L, con tGAS1 es un efecto discreto y se observa que es mayor con PTEN-L y con el tratamiento combinado de tGAS1-PTEN-L (Figura 23 C). Estos datos muestran que el tratamiento combinado con tGAS1 y PTEN-L activa exitosamente un proceso apoptótico en las células de páncreas de origen canceroso HPAF-II (Figura 23).

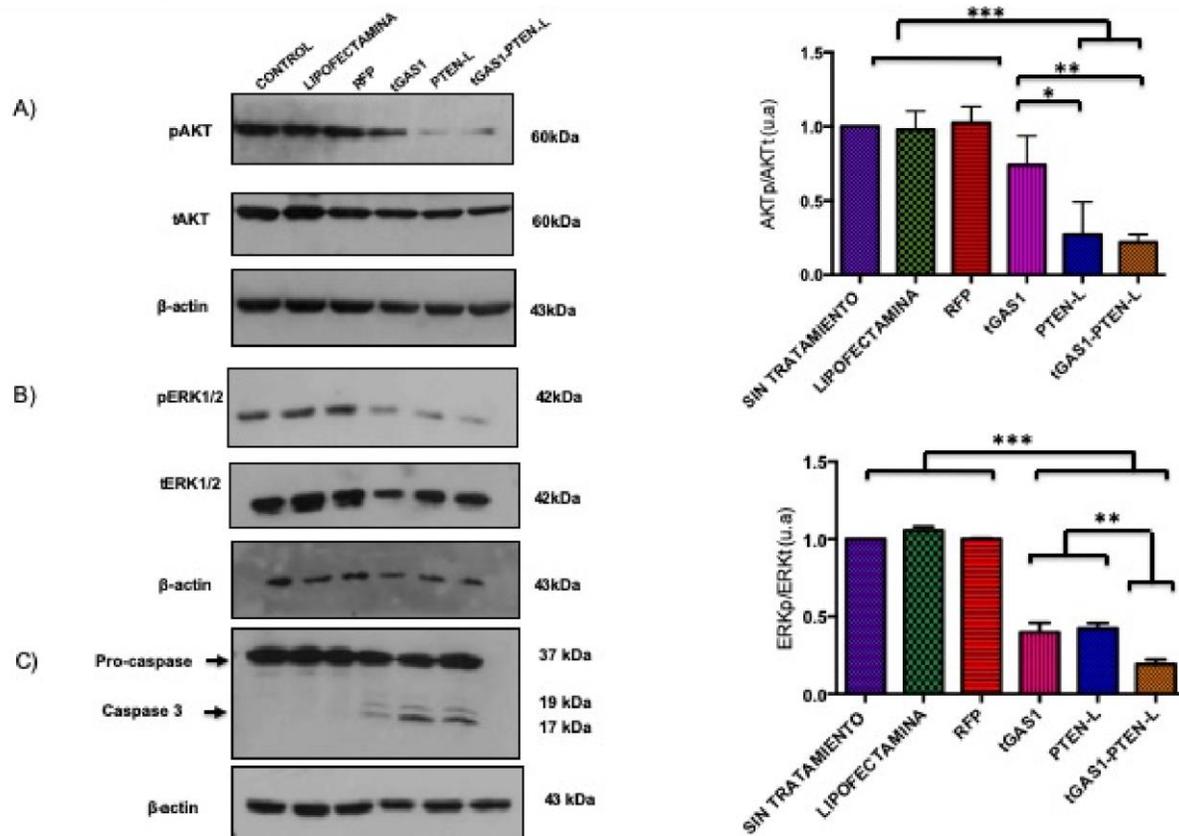


Figura 23. Efectos de las formas solubles de GAS1 y PTEN sobre las vías de señalización intracelular y la apoptosis. (A) Efectos de las formas solubles de GAS1 y PTEN, y cuando se transfectan simultáneamente sobre la actividad de AKT (pAKT es la molécula fosforilada y tAKT es el total); (B) efectos de las formas solubles de GAS1 y PTEN, y transfectadas juntas sobre la actividad de ERK1 / 2 (pERK1 / 2 es la molécula fosforilada y tERK1 / 2 es el total); los paneles de la izquierda muestran experimentos

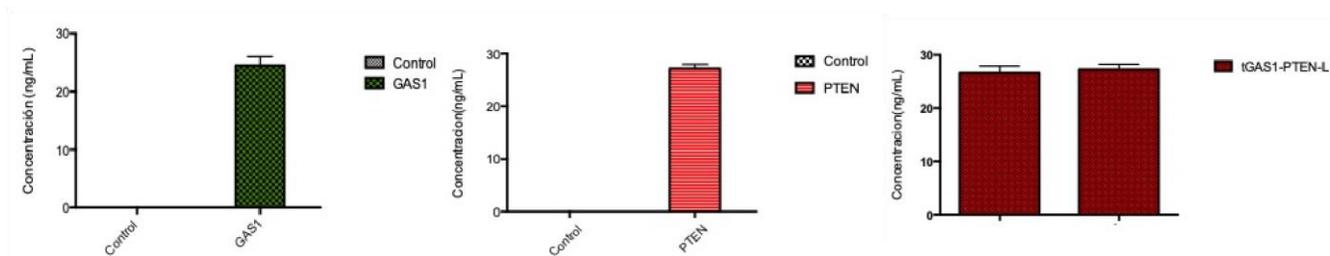
representativos y los paneles de la derecha, el análisis estadístico de tres experimentos independientes; (C) apoptosis demostrada por la activación de la caspasa-3, la β -actina es el control de carga. ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 3$.

15.4 Efecto de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L sobre la invasión de las células de cáncer de páncreas

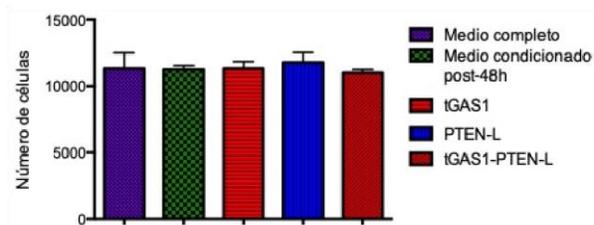
Para evaluar los efectos de tGAS1 y PTEN-L en el proceso de invasión de las células de cáncer de páncreas HPAF-II, utilizamos un modelo *in vitro*. Para ello realizamos los ensayos en cámaras de Boyden. Se sembraron neuronas DRG en la cámara inferior y células HPAF-II en la cámara superior, en filtros con poros de 8.0 μm recubiertos con matrigel. Primero se determinaron los niveles de tGAS1 y PTEN-L en el medio condicionado de las células productoras HPAF-II transfectadas con los plásmidos de tGAS1 y PTEN de forma independiente (Figura 24 A). De manera interesante en contraste con el efecto sobre las células tumorales, observamos que ni tGAS1 ni PTEN-L, ni el tratamiento combinado tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad de las neuronas DRG, lo que sugiere que estos tratamientos no afectan a las células sanas, (no tumorales) (Figura 24 B). También demostramos que los cultivos primarios de DRG estaban enriquecidos con neuronas, como lo demostró la inmunofluorescencia contra la tubulina- β III. En estos cultivos, más del 95% de las células fueron positivas para este marcador neuronal (Figura 24 C). Finalmente, determinamos los efectos de los tratamientos sobre la capacidad de invasión de las células HPAF-II, como se puede observar en la (Figura 24 D), la incubación con medios que contienen tGAS1 o PTEN-L redujo significativamente la migración de las células tumorales. De manera interesante, la aplicación combinada de los dos agentes tuvo un mejor efecto que cuando se usan de manera independiente. Estos datos demuestran

que la presencia de formas solubles de tGAS1, PTEN-L y la combinación de tGAS1-PTEN-L inhiben la invasión de las células cancerosas HPAF-II.

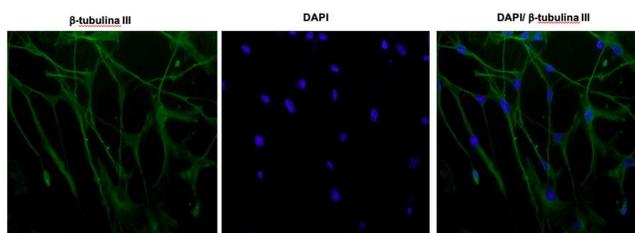
A)



B)



C)



D)

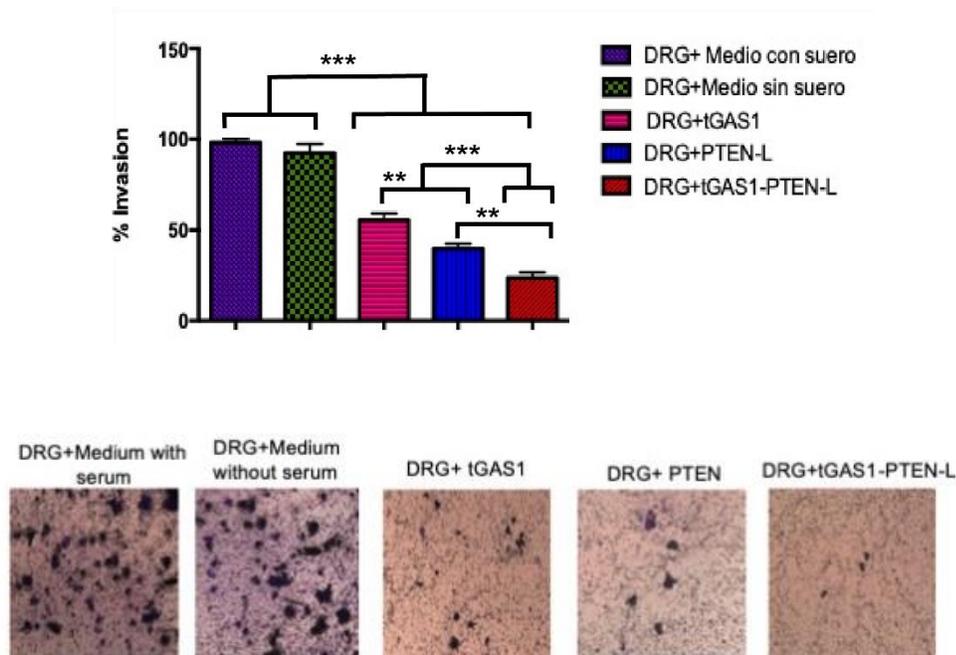


Figura 24. Efecto de las formas solubles de GAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L de forma simultánea sobre la invasividad de las células de cáncer de páncreas. (A) Niveles de las formas solubles de GAS1 y PTEN en medios condicionados de las células productoras HPAF-II (izquierda transfectada con tGAS1; centro con PTEN-L; derecha con tGAS1 y PTEN-L); (B) Número de células viables de DRG en presencia de los diferentes medios condicionados; (C) Inmunofluorescencia de los cultivos de DRG contra tubulina β -III (panel izquierdo), núcleos revelados con DAPI (panel central) y fusión de los dos canales (panel derecho). (D) Porcentaje de células cancerosas HPAF-II que cruzaron la membrana hacia las células DRG incubadas en presencia de los diferentes medios condicionados; el panel inferior muestra un experimento representativo. ANOVA de una sola vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$.

15.5 Efecto *in vivo* del vector lentiviral que expresa la forma soluble de tGAS1-PTEN- L sobre el crecimiento tumoral

Ya que observamos que el tratamiento combinado con tGAS1 y PTEN-L ejercía los efectos más fuertes al inhibir el crecimiento de células tumorales y la invasión de células cancerosas pancreáticas *in vitro*, decidimos probar un sistema de expresión lentiviral que produce cantidades equimolares de ambas proteínas [38] en un modelo *in vivo*. Se inocularon por vía subcutánea células HPAF-II en los flancos de ratones desnudos macho de la cepa (*nu/nu*). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 30 mm³, se inyectaron los lentivirus productores de tGAS1-p2APTEN-L, usamos como controles lentivirus productores de EGFP o el mismo volumen de vehículo a los días 0, 2 y 4. Se determinó el crecimiento tumoral por 28 días después del inicio del tratamiento, cuando se sacrificaron los ratones, se observó una disminución significativa en el crecimiento tumoral ,determinado por el peso y el volumen de los tumores tratados con el virus tGAS1-PTEN-L en comparación con los controles (Figura 25).

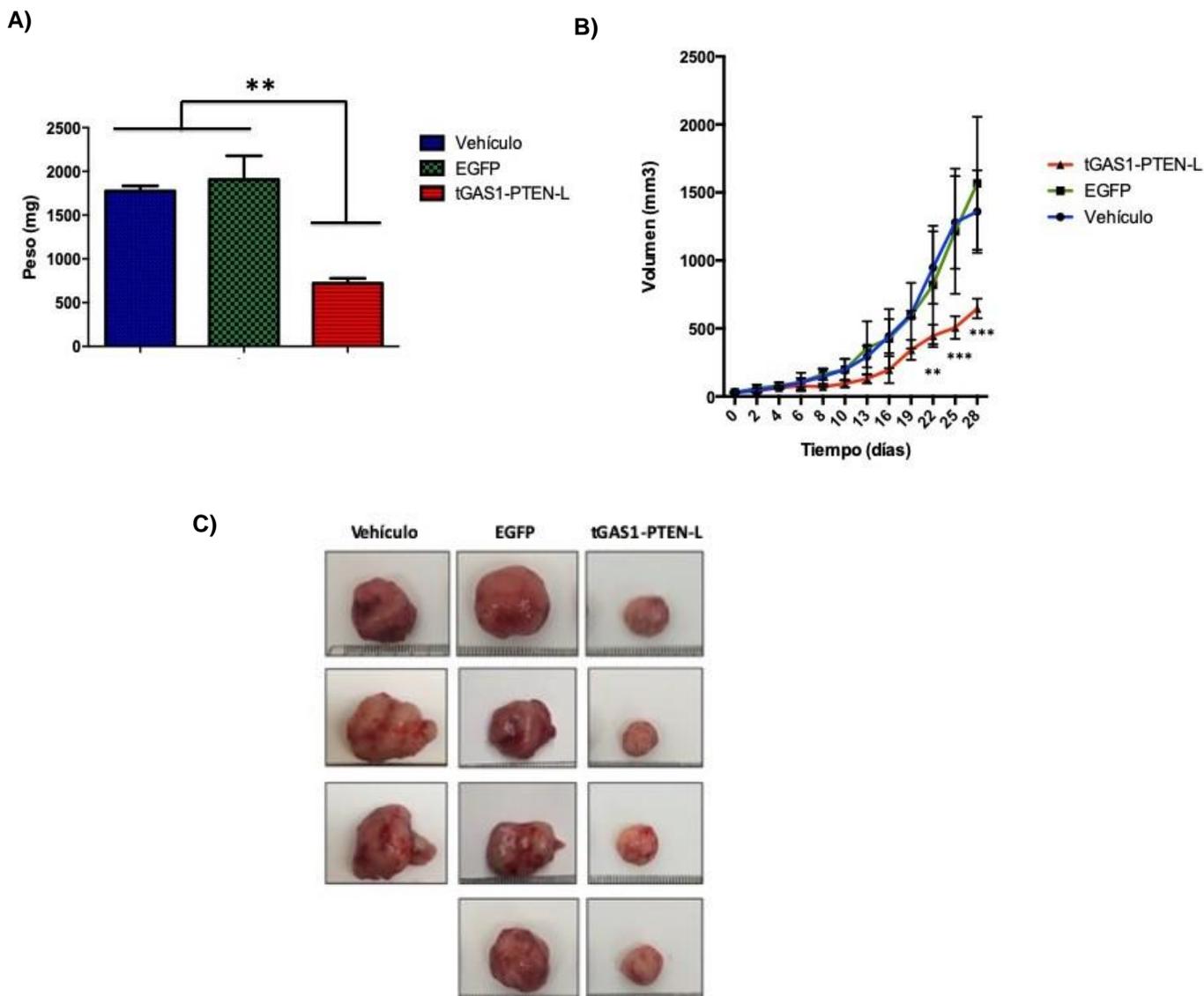


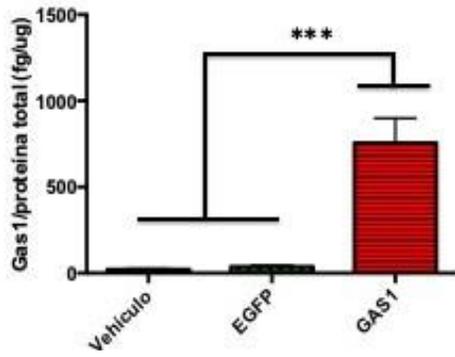
Figura 25. Efecto de la expresión de tGAS1-PTEN-L sobre el crecimiento tumoral.

Se inocularon células HPAF-II en los flancos de ratones *nu/nu*, por vía subcutánea, cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 30 mm³, recibieron el mismo volumen de vehículo (medio de cultivo sin suero), virus que expresan EGFP o tGAS1-PTEN-L (A) Peso de los tumores después de los diferentes tratamientos (B) Volumen de los tumores tratados con tGAS1-PTEN-L en comparación con los controles a lo largo del tiempo. (C) Tamaño de los tumores después de los tratamientos (regla en cm). ANOVA seguido de Tukey (A); prueba *post-hoc* de Duncan (B). ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$ para vehículo; $n = 4$ para EGFP $n = 4$ para tratamientos con tGAS1-PTEN-L.

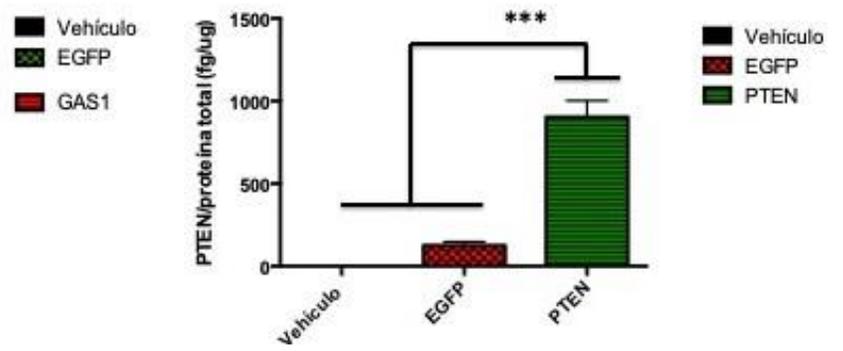
Por otro lado, para determinar los mecanismos moleculares asociados con la inhibición del crecimiento tumoral, medimos los niveles de GAS1 y PTEN en los tumores tratados. Como mencionamos anteriormente, la expresión de ambos indujo niveles de expresión altos e iguales en los tumores tratados, mientras que se observó una expresión baja o indetectable de GAS1 y PTEN-L en los tumores de control (Figura 26 A y B). De acuerdo con los resultados en las pruebas *in vitro* anteriores (Figura 23), observamos disminuciones en las formas activas de AKT y ERK 1/2 en los tumores tratados, en comparación con los grupos control (Figura 26 C y D). Además, también mostramos la activación de caspasa 3 en tumores tratados con tGAS1-PTEN-L, en comparación con los controles, lo que demuestra un proceso apoptótico causado por el tratamiento tGAS1-PTEN-L (Figura 26 E).

En conjunto, los datos aquí presentados demuestran que la expresión simultánea de las formas solubles de GAS1 y PTEN inhiben el crecimiento tumoral, estimulan la apoptosis y reducen la capacidad de invasión de las células de cáncer de páncreas.

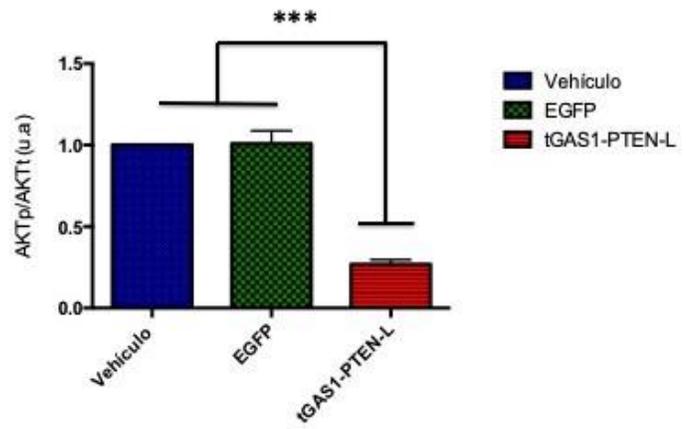
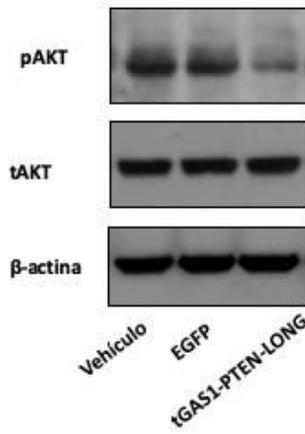
A)



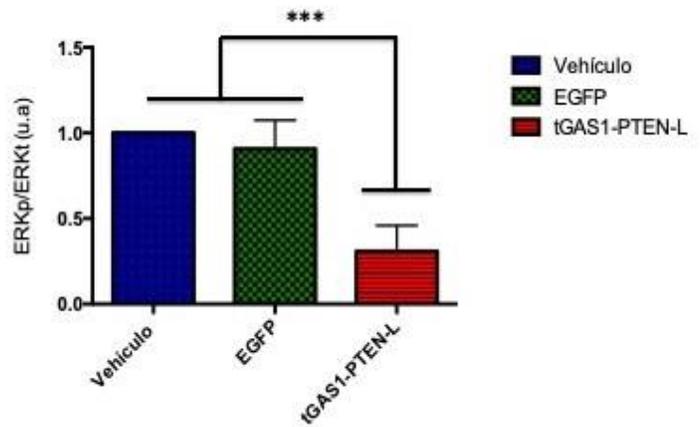
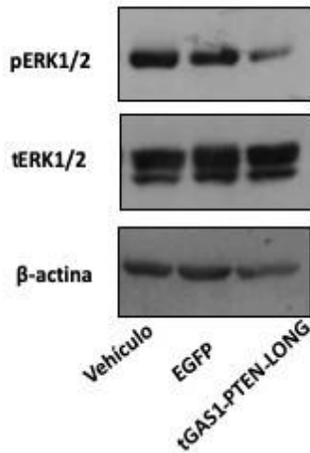
B)



C)



D)



E)

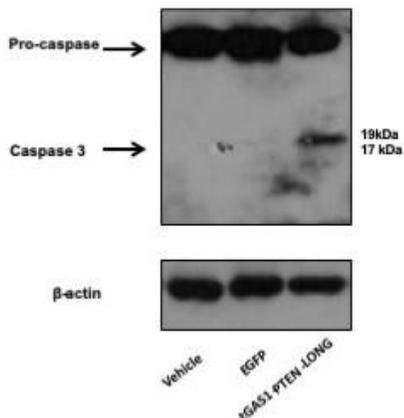


Figura 26. Efectos de tGAS1-PTEN-L sobre las vías intracelulares y la apoptosis de las células tumorales. (A y B) Niveles de Gas1 y PTEN en tumores; (C) actividad de AKT en tumores, experimento representativo (izquierdo) y análisis estadístico (derecho), (D) actividad de ERK1/2 en los tumores, experimento representativo (izquierdo), análisis estadístico (derecho), E) Apoptosis de células tumorales como lo muestra la actividad de la caspasa 3. ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3 - 4$ (A – D).

16. Discusión

En este trabajo demostramos a través de la caracterización celular por PCR que la línea HPAF-II no expresa *Gas1* ni *GDNF*, pero interesantemente si expresan *artemina* (ARTN) y su receptor *GFR α 3*, y se sabe que la ARTN es un ligando de la familia de GDNF que se acopla a su receptor *GFR α 3*, el cual está involucrado en los procesos de proliferación, invasión y angiogénesis, que promueven la malignidad del cáncer. Además, se verificó por *Western blot* la ausencia de la proteína PTEN. Se ha evidenciado que la señalización de los GFL es diversa y ARTN puede señalizar de manera independiente de RET, esto al tener afinidad por otros receptores [40]. Por un lado, la presencia de *GFR α 1* facilita la unión de ARTN con NCAM, activando proteínas tirosina cinasa no receptoras como Fyn en células carentes de RET [45].

Si bien la línea HPAF-II que usamos en este estudio, no expresa *GFR α 1*, si expresa *GFR α 3* y su ligando ARTN, por lo que sugerimos que tanto NCAM como la proteína tirosina cinasa Syn 3 podrían estar implicadas en la señalización de ARTN, es importante señalar que la ARTN puede unirse a las cadenas laterales de heparina de los sindecanos y activar la vía Src, en ausencia de receptores *GFR α 's* [46]. Además, en un estudio previo en nuestro laboratorio se demostró que tGAS1 interrumpe la interacción entre ARTN y *GFR α 3* en un modelo de cáncer de mama MDA-MB-231 en ausencia de RET [56], estos resultados son consistentes con los datos de este trabajo.

Por otro lado, también está demostrado que las formas solubles de tGAS1 y PTEN-L promueven la muerte celular en un modelo de glioblastoma humano, PTEN-L es una forma soluble de PTEN que disminuye la señalización de PI3K tanto en las células productoras como en las células vecinas, inhibiendo el crecimiento tumoral. En este proyecto se usó un sistema lentiviral p2A que produce cantidades equimolares de tGAS1 y PTEN-L [57] por lo que evaluar el

efecto simultáneo de las dos proteínas en un modelo de cáncer de páncreas fue el objetivo principal de este proyecto.

Después de la caracterización celular, demostramos por ensayos de viabilidad que desde las 24 h hasta las 96 h disminuyen el número de células de cáncer de páncreas tratadas solo con tGAS1 o PTEN-L (Figura 22) y que dichas proteínas tienen mejor efecto cuando los cultivos celulares las expresan directamente (lentiviral) (Figura 22A-D), estos resultados son consistentes con lo reportado en nuestro laboratorio.

Con base en estos primeros resultados, nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar el efecto de las formas solubles de GAS1 y PTEN de manera individual y juntas sobre la invasión de las células cancerosas, un proceso característico del cáncer de páncreas [27,28,78-81], ya que al ser proteínas solubles tendrían un mayor alcance y por lo tanto un mejor efecto. Para ello utilizamos cultivos primarios de ganglio de raíz dorsal (GRD) los cuales fueron sembrados en los pocillos de las cámaras de Boyden y en las canastillas las células tumorales sobre una capa de matrigel con los medios de cultivo de las diferentes condiciones, es decir expuestos a los medios que contenían: tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L y los respectivos controles.

De manera interesante demostramos que los medios condicionados redujeron el paso de las células tumorales a través del matrigel, pero se observó que el medio condicionado que contenía las proteínas combinadas de tGAS1-PTEN-L mostró un mejor efecto en comparación de las proteínas de tGAS1 y PTEN-L de manera independiente (Figura 24 D), además demostramos por ensayos de viabilidad celular que los medios condicionados no afectaron a las células de GRD, esto quiere decir que no afectan las células sanas (Figura 24 B). Con estos datos se demuestra que la presencia de las formas solubles de tGAS1 y PTEN-L inhiben la capacidad de invasión de las células tumorales pancreáticas de manera exclusiva. Recientemente se ha reportado que la vía de señalización que se activa por medio de la artemina es AKT y ERK [27,28,82], por lo que sugerimos que la acción de GAS1 disminuye la fosforilación de ERK, como se ha reportado

en trabajos previos en el laboratorio, donde Jiménez *et al.*, evidenció que GAS1 inhibe la migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, bloqueando a ERK, además de que GAS1 disminuye la vascularización tumoral [56] y por otro lado el papel de PTEN que disminuye la fosforilación de AKT, de modo que la combinación de ambas proteínas ejerce un efecto en la reducción de la invasión perineural *in vitro*.

Los resultados *in vitro* llevaron a evaluar nuestro sistema en un modelo heterotópico en ratones *nu/nu* inmunodeficientes, donde probamos un sistema de expresión lentiviral de tercera generación que produce cantidades equimolares de ambas proteínas [57].

Los ratones que fueron tratados con los virus que expresaban ambas proteínas redujeron significativamente el volumen del tumor (Figura 25 B) en comparación con los controles, los ratones tratados con el vehículo o con los virus que expresan la proteína verde fluorescente (Figura 25 B y C). Esta reducción en el tamaño del tumor se debe a la acción conjunta de tGAS1 y PTEN-L, el cual se evidenció con la reducción en la fosforilación de AKT y ERK respectivamente (Figura 26).

Otro punto interesante mencionar es la activación de la caspasa 3 en los tumores tratados con tGAS1-PTEN-L (Figura 26 E), estos resultados coinciden con los reportados por Zarco *et al*, quien demostró que GAS1 induce muerte celular por apoptosis indicando que este es uno de los mecanismos por el que GAS1 actúa.

17. Conclusión

Los resultados de este proyecto mostraron que la aplicación simultánea de las formas solubles de tGAS1 y PTEN disminuye el crecimiento tumoral y la invasividad de las células de cáncer de páncreas. Estos efectos ocurren por la inhibición de las vías de señalización intracelular de AKT y de ERK 1/2. El beneficio de utilizar formas solubles de GAS1 y PTEN es que tienen efectos autocrinos y paracrinos lo cual aumenta el rango terapéutico del tratamiento. Además, también es probable que el GAS1 soluble interfiera con los GFR α 's secretados por los nervios, reduciendo la PNI y la formación de metástasis. Por lo que consideramos que la administración combinada de tGAS1 y PTEN-L podría ser una importante terapia complementaria para el tratamiento del cáncer de páncreas.

18. Perspectivas

- Analizar el efecto de tGAS1-PTEN-L en diferentes líneas de cáncer de páncreas.
- Evaluar el efecto combinado de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L en un modelo ortotópico de cáncer de páncreas.
- Evaluar el efecto de tGAS1, PTEN-L y tGAS1-PTEN-L en el proceso de invasión perineural en un modelo *in vivo*.

19. Bibliografía

- [1] H. Y. Li, Z. M. Cui, J. Chen, X. Z. Guo, and Y. Y. Li, “Pancreatic cancer: diagnosis and treatments,” *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 3, pp. 1375–1384, 2015, doi: 10.1007/s13277-015-3223-7.
- [2] T. Tatarian and J. M. Winter, “Genetics of Pancreatic Cancer and Its Implications on Therapy,” *Surg. Clin. North Am.*, vol. 96, no. 6, pp. 1207–1221, 2016, doi: 10.1016/j.suc.2016.07.014.
- [3] Klein A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(7), 493–502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>.
- [4] Zhao, Z., & Liu, W. (2020). Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in cancer research & treatment*, 19, 1533033820962117. <https://doi.org/10.1177/1533033820962117>.
- [5] Cai, J., Chen, H., Lu, M., Zhang, Y., Lu, B., You, L., Zhang, T., Dai, M., & Zhao, Y. (2021). Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer letters*, 520, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.027>.
- [6] Globocan, Cancer today. <https://gco.iarc.fr/today/home>. (Accesado el 10 enero de 2023).
- [7] P. Rawla, T. Sunkara, and V. Gaduputi, “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors,” *World J. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 10–27, 2019, doi: 10.14740/wjon1166.

- [8] L. Haeberle and I. Esposito, “Pathology of pancreatic cancer,” *Transl. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 4, no. June, pp. 1–12, 2019, doi: 10.21037/tgh.2019.06.02.
- [9] Benzel, J., & Fendrich, V. (2018). Familial Pancreatic Cancer. *Oncology research and treatment*, 41(10), 611–618. <https://doi.org/10.1159/000493473>.
- [10] V. Goral, “Pancreatic cancer: Pathogenesis and diagnosis,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 16, no. 14, pp. 5619–5624, 2015, doi: 10.7314/APJCP.2015.16.14.5619.
- [11] Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M., & Simeone, D. M. (2022). Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*, 163(2), 386–402.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>
- [12] Hayashi, A., Hong, J. & Iacobuzio-Donahue, C.A. The pancreatic cancer genome revisited. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 469–481 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00463-z>.
- [13] S.-H. Chen, B.-Y. Zhang, B. Zhou, C.-Z. Zhu, L.-Q. Sun, and Y.-J. Feng, “Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche.,” *Am. J. Cancer Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–21, 2019.
- [14] Liu, Q., Ma, Z., Cao, Q., Zhao, H., Guo, Y., Liu, T., & Li, J. (2022). Perineural invasion-associated biomarkers for tumor development. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 155, 113691. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113691>.

- [15] Li, J., Kang, R., & Tang, D. (2021). Cellular and molecular mechanisms of perineural invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer communications (London, England)*, 41(8), 642–660. <https://doi.org/10.1002/cac2.12188>.
- [16] D. Liang *et al.*, “New insights into perineural invasion of pancreatic cancer: More than pain,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1865, no. 2, pp. 111–122, 2016, doi: 10.1016/j.bbcan.2016.01.002.
- [17] Li, J., Kang, R., & Tang, D. (2021). Cellular and molecular mechanisms of perineural invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer communications (London, England)*, 41(8), 642–660. <https://doi.org/10.1002/cac2.12188>.
- [18] Liu, Q., Ma, Z., Cao, Q., Zhao, H., Guo, Y., Liu, T., & Li, J. (2022). Perineural invasion-associated biomarkers for tumor development. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 155, 113691. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113691>.
- [19] A. A. Bapat, G. Hostetter, D. D. Von Hoff, and H. Han, “Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 10, pp. 695–707, 2011, doi: 10.1038/nrc3131.
- [20] G. O. Ceyhan *et al.*, “Neural invasion in pancreatic cancer: A mutual tropism between neurons and cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 374, no. 3, pp. 442–447, 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.035.
- [21] Jurcak, N., & Zheng, L. (2019). Signaling in the microenvironment of pancreatic cancer: Transmitting along the nerve. *Pharmacology & therapeutics*, 200, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.010>.

- [22] Gola, M., Sejda, A., Godlewski, J., Cieślak, M., & Starzyńska, A. (2022). Neural Component of the Tumor Microenvironment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 14(21),5246.<https://doi.org/10.3390/cancers1421526>.
- [23] Malekan, M., Nezamabadi, S.S., Samami, E. *et al.* BDNF and its signaling in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04365-8>.
- [24] V. Chopin, C. Lagadec, R. A. Toillon, and X. Le Bourhis, “Neurotrophin signaling in cancer stem cells,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 9, pp. 1859–1870, 2016, doi: 10.1007/s00018-016-2156-7.
- [25] Blondy, S., Christou, N., David, V., Verdier, M., Jauberteau, M. O., Mathonnet, M., & Perraud, A. (2019). Neurotrophins and their involvement in digestive cancers. *Cell death & disease*, 10(2), 123. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1385-8>.
- [26] Bothwell M. (2016). Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-1885. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8434.1>.
- [27] J. Jiang, J. Bai, T. Qin, Z. Wang, and L. Han, “NGF from pancreatic stellate cells induces pancreatic cancer proliferation and invasion by PI3K/AKT/GSK signal pathway,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 10, pp. 5901–5910, 2020, doi: 10.1111/jcmm.15265.
- [28] B. Darvishi, S. Boroumandieh, K. Majidzadeh-A, M. Salehi, F. Jafari, and L. Farahmand, “The role of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) in cancer progression, invasion, metastasis and recurrence:

A novel cancer stem cell marker and tumor-specific prognostic marker,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 115, no. 146, p. 104443, 2020, doi: 10.1016/j.yexmp.2020.104443.

[29] K. H. Oh *et al.*, “Role of laminin 332 in lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma,” *Auris Nasus Larynx*, vol. 44, no. 6, pp. 729–734, 2017, doi: 10.1016/j.anl.2017.01.010.

[30] C. HUANG and J. CHEN, “Laminin-332 mediates proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3892/mmr.2020.11649.

[31] M. Łukaszewicz-Zajac, M. Gryko, and B. Mroczko, “The role of selected chemokines and their specific receptors in pancreatic cancer,” *Int. J. Biol. Markers*, vol. 33, no. 2, pp. 141–147, 2018, doi: 10.1177/1724600817753094.

[32] Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron*. 1998;21(6):1291-1302.

[33] Bennett DL, Boucher TJ, Michael GJ, et al. Artemin has potent neurotrophic actions on injured C-fibres. *J Peripher Nerv Syst*. 2006;11(4):330-345.

[34] Zhu, S., Li, Y., Bennett, S., Chen, J., Weng, I. Z., Huang, L., Xu, H., & Xu, J. (2020). The role of glial cell line-derived neurotrophic factor family member artemin in neurological disorders and cancers. *Cell proliferation*, 53(7), e12860. <https://doi.org/10.1111/cpr.12860>.

- [35] Wang, J, Wang H, Cai J, et al. Artemin regulates CXCR4 expression to induce migration and invasion in pancreatic cancer cells through activation of NF- κ B signaling. *Experimental Cell Research*, 1; 365(1) 12-23, doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.008.
- [36] Li T-J, Li H, Zhang W-H, et al. Human splenic TER cells: A relevant prognostic factor acting via the artemin-GFR α 3-ERK pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*. 2021; 148:1756–1767. <https://doi.org/10.1002/ijc.33410>.
- [37] G. C. Fielder *et al.*, “The GDNF Family: a Role in Cancer?” *Neoplasia (United States)*, vol. 20, no. 1, pp. 99–117, 2018, doi: 10.1016/j.neo.2017.10.010.
- [38] L. M. Mulligan, “GDNF and the RET receptor in cancer: New insights and therapeutic potential,” *Front. Physiol.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–13, 2019, doi: 10.3389/fphys.2018.01873.
- [39] N. Zarco, R. González-Ramírez, R. O. González, and J. Segovia, “GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway,” *Apoptosis*, vol. 17, no. 6, pp. 627–635, 2012, doi: 10.1007/s10495-011-0696-8.
- [40] Sariola, H., & Saarma, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *Journal of cell science*, 116(Pt 19), 3855–3862. <https://doi.org/10.1242/jcs.00786>.
- [41] Ibáñez, C. F., Paratcha, G., & Ledda, F. (2020). RET-independent signaling by GDNF ligands and GFR α receptors. *Cell and tissue research*, 382(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03261-2>.

- [42] J. Nielsen *et al.*, “Role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)neural cell adhesion molecule (NCAM) interactions in induction of neurite outgrowth and identification of a binding site for NCAM in the heel region of GDNF,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 36, pp. 11360–11376, 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3239-09.2009.
- [43] M. C. Sergaki and C. F. Ibáñez, “GFR α 1 Regulates Purkinje Cell Migration by Counteracting NCAM Function,” *Cell Rep.*, vol. 18, no. 2, pp. 367–379, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.039.
- [44] D. Sjöstrand, J. Carlsson, G. Paratcha, B. Persson, and C. F. Ibáñez, “Disruption of the GDNF binding site in NCAM dissociates ligand binding and homophilic cell adhesion,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 17, pp. 12734–12740, 2007, doi: 10.1074/jbc.M701588200.
- [45] Ilieva M, Nielsen J, Korshunova I, et al. Artemin and an artemin-derived peptide, artefin, induce neuronal survival, and differentiation through ret and NCAM. *Front Mol Neurosci.* 2019; 12:47.
- [46] Beshpalov, M. M., Sidorova, Y. A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhães, A. C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., & Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *The Journal of cell biology*, 192(1), 153–169. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009136>.
- [47] O. Schueler-Furman, E. Glick, J. Segovia, and M. Linal, “Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 72–77, 2006, doi: 10.1016/j.tips.2005.12.004.

- [48] A. Zamorano, M. Lamas, P. Vergara, J. R. Naranjo, and J. Segovia, "Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis," *J. Neurosci. Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 256–263, 2003, doi: 10.1002/jnr.10461.
- [49] J. A. Benítez, L. Arregui, P. Vergara, and J. Segovia, "Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas," *Cancer Gene Ther.*, vol. 14, no. 10, pp. 836–846, 2007, doi: 10.1038/sj.cgt.7701076.
- [50] L. Izzi *et al.*, "Boc and gas1 each form distinct shh receptor complexes with ptch1 and are required for shh-mediated cell proliferation," *Dev. Cell*, vol. 20, no. 6, pp. 788–801, 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.04.017.
- [51] J. R. Cabrera *et al.*, "Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors α and regulates Ret signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 20, pp. 14330–14339, 2006, doi: 10.1074/jbc.M509572200.
- [52] D. Monzon, Benitez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J, "Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh., *Int J Dev Neurosci* 27, 2009, doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.03.009.
- [53] Van Roeyen CR, Zok S, Pruessmeyer J, Boor P, Nagayama Y, Fleck- enstein S, Cohen CD, Eitner F, Grone HJ, Ostendorf T, Ludwig A, Floege J (2013) Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney Int* 83:251–263.
- [54] Ayala-Sarmiento, A.E., Estudillo, E., Pérez-Sánchez, G. *et al.* GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochem Cell Biol* **146**, 325–336 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1449-0>.

- [55] Lopez-Ornelas A, Mejía -Castillo T, Vergara P, Segovia J, Lentiviral transfers of an inducible transgene expresan a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene There* 18 (2011) 87-99.
- [56] Lopez- Ornelas A, Vergara P, Segovia J, Neural stem cells producing an inducible and soluble forms of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy* 7(2014) 1011-23.
- [57] A. Jiménez, A. López-Ornelas, E. Estudillo, L. González-Mariscal, R. O. González, and J. Segovia, "A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model," *Exp. Cell Res.*, vol. 327, no. 2, pp. 307–317, 2014, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.016.
- [58] L. Sánchez-Hernández, J. Hernández-Soto, P. Vergara, R. O. González, and J. Segovia, "Additive effects of the combined expression of soluble forms of GAS1 and PTEN inhibiting glioblastoma growth," *Gene Ther.*, vol. 25, no. 6, pp. 439–449, 2018, doi: 10.1038/s41434-018-0020-0.
- [59] C. Y. Chen, J. Chen, L. He, and B. L. Stiles, "PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, no. JUL, pp. 1–12, 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00338.
- [60] V. Álvarez-Garcia, Y. Tawil, H. M. Wise, and N. R. Leslie, "Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 59, no. January, pp. 66–79, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.02.001.
- [61] Worby, C. A., & Dixon, J. E. (2014). PTEN. *Annual review of biochemistry*, 83, 641–669. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-082411-113907>.

- [62] L. Wang, G. Lu, and H. M. Shen, “The Long and the Short of PTEN in the Regulation of Mitophagy,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. May, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00299.
- [63] Haddadi, N., Lin, Y., Travis, G., Simpson, A. M., Nassif, N. T., & McGowan, E. M. (2018). PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Molecular cancer*, 17(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0803-3>.
- [64] Fang, Y., Ji, W., & Yan, C. (2022). Research Progress of PI3K/PTEN/AKT Signaling Pathway Associated with Renal Cell Carcinoma. *Disease markers*, 2022, 1195875. <https://doi.org/10.1155/2022/1195875>.
- [65] Hopkins B, Hodakoski C, Barrows D, Mense S and Parsons R.E. PTEN function, the long and the short of it. *Trends Biochem Sci.*2014;39(4): 183-190. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.006.
- [66] Wang L,Lu G, Shen H.M. The Long and the Short of PTEN in the Regulation of Mitophagy. *Front.Cell Dev. Biol.* 8:299. doi: 10.3389/fcell. 2020.00299.
- [67] Putz U, et al. the tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. 2012. *Science Signaling.* 5 (243) doi: 10.1126/ scisignal.2003084.
- [68] Hopkins BD, et al. 2013. A secreted PTEN phosphatase the enter cells to alter signaling and survival. *Science.*341(6144): 399–402. doi:10.1126/ science.1234907.

- [69] Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977.
- [70] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Jan;75(2):193-208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28733901; PMCID: PMC5756260.
- [71] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J*. 2011 Aug 31;30(17):3481-500. doi: 10.1038/emboj.2011.286. PMID: 21878991; PMCID: PMC3181477.
- [72] Van Balkom BW, Eisele AS, Pegtel DM, Bervoets S, Verhaar MC. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles*. 2015 May 29;4:26760. doi: 10.3402/jev.v4.26760. PMID: 26027894; PMCID: PMC4450249.
- [73] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016 Feb 22;428(4):688-692. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.019. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26434508; PMCID: PMC4783248.
- [74] Hopkins BD, Parsons RE. Molecular pathways: intercellular PTEN and the potential of PTEN restoration therapy. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 1;20(21):5379-83. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2661. PMID: 25361917; PMCID: PMC4362520.

- [75] Malaney P, Uversky VN, Davé V. The PTEN Long N-tail is intrinsically disordered: increased viability for PTEN therapy. *Mol Biosyst.* 2013 Nov;9(11):2877-88. doi: 10.1039/c3mb70267g. PMID: 24056727.
- [76] López-Ramírez MA, Domínguez-Monzón G, Vergara P, Segovia J. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci.* 2008 Aug;26(5):497-503. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.02.006. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18394855.
- [77] C. Liebig, G. Ayala, J. A. Wilks, D. H. Berger, and D. Albo, "Perineural invasion in cancer: A review of the literature," *Cancer*, vol. 115, no. 15, pp. 3379–3391, 2009, doi: 10.1002/cncr.24396.
- [78] G. Gasparini *et al.*, "Nerves and pancreatic cancer: New insights into a dangerous relationship," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 7, pp. 1–26, 2019, doi: 10.3390/cancers11070893.
- [79] Zhu, S., Li, Y., Bennett, S., Chen, J., Weng, I. Z., Huang, L., Xu, H., & Xu, J. (2020). The role of glial cell line-derived neurotrophic factor family member artemin in neurological disorders and cancers. *Cell proliferation*, 53(7), e12860. <https://doi.org/10.1111/cpr.12860>.
- [80] Gao, L., Bo, H., Wang, Y., Zhang, J., & Zhu, M. (2015). Neurotrophic Factor Artemin Promotes Invasiveness and Neurotrophic Function of Pancreatic Adenocarcinoma In Vivo and In Vitro. *Pancreas*, 44(1), 134–143. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000223>.
- [81] Hezam, K., Jiang, J., Sun, F., Zhang, X., & Zhang, J. (2018). Artemin promotes oncogenicity, metastasis and drug resistance in cancer cells. *Reviews in the neurosciences*, 29(1), 93–98. <https://doi.org/10.1515/revneuro-201>.

- [82] Wu PK, Becker A, Park JI. Growth Inhibitory Signaling of the Raf/MEK/ERK Pathway. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 30;21(15):5436. doi: 10.3390/ijms21155436. PMID: 32751750; PMCID: PMC7432891.

Terapia génica con tGAS1 y PTEN-LONG en la línea de cáncer de páncreas HPAF-II y en un modelo murino de cáncer pancreático.