

Cinvestav

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Identificación del perfil de microRNAs (miRNoma) en células
troncales cancerosas provenientes de PANC-1**

TESIS

Que presenta

L.B.G. MARICELA MEDRANO SILVA

Para obtener grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directoras de la Tesis:

DRA. ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS

DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO

Ciudad de México

Agosto, 2020

ASESORES

DR. MIGUEL ÁNGEL VARGAS MEJÍA

INVESTIGADOR TITULAR 3C
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
CINVESTAV-IPN

DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA

INVESTIGADORA TITULAR 3C
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR
CINVESTAV-IPN

DR. MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS

INVESTIGADOR TITULAR 3D
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR
CINVESTAV-IPN

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado durante el desarrollo de este trabajo y otorgarme la beca con el número de registro 935566.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas por su apoyo, tiempo, paciencia, quien con sus conocimientos y apoyo me guio a través de cada una de las etapas de este proyecto.

A la Dra. Elena Aréchaga Ocampo por su tiempo, disposición y asesoramiento, gracias por el apoyo que brindó durante este proyecto.

A mi comité tutorial: Al Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos por su valiosa asesoría, disponibilidad, consejos y mejoras a nuestro trabajo.

Al M.C Pedro Antonio Ávila López, gracias por tu ayuda en incontables ocasiones, por servirme de guía cuando me enfrentaba con algún problema y por hacer mis largas horas de trabajo más llevaderas.

A la M. C. Lissuly Álvarez, la M. C. Isabel Quintanilla, el M.C. Iván Saldivar y la Dra. Daniela Lozano, por su cooperación dentro y fuera del laboratorio, y por todas las horas que hemos compartimos.

A José Luis Gómez Brito, por su gran ayuda técnica en el laboratorio.

A mi amigo David Alejandro Almaguer Molina, que me acompañaste desde el comienzo de este viaje, por la gran cantidad de horas que pasamos juntos, algunas buenas otras malas, pero siempre ofreciéndome palabras de aliento y en especial gracias por ser parte de mi vida.

A mi amiga Arely Yaranhy Rodríguez Villela, aún en la distancia conté con tu apoyo y presencia, gracias por darme ánimos cuando más lo necesitaba y motivarme a seguir adelante, por los consejos que me has dado y tiempo que hemos compartido. Gracias por poder contar contigo.

A mis hermanos: Marco, que sin importar las circunstancias y la distancia siempre contaré con tu presencia. Aunque no lo diga con frecuencia, quiero que sepas cuanto valoro lo que haces por mí. Carolina, mi compañera de vida y compañera de juegos, gracias por tus consejos y por escucharme las veces que hayan sido necesarias; gracias por estar ahí para mí. Y Daniel, gracias por creer en mí, y convencerme también de que puedo lograr todo lo que me proponga. A los tres, gracias por ser mis mejores compañeros de equipo.

A mis padres Maricela Silva Núñez y Marco Antonio Medrano Juárez, que sin su apoyo incondicional nunca hubiera alcanzado esta meta. Gracias por ser mi soporte en estos últimos años, en que a pesar de la distancia siempre han estado cerca de mí. Gracias por su amor y su cariño, los cuales me han hecho la persona que hoy en día soy.

A todas aquellas personas y amigos que me ayudaron de manera desinteresada, gracias por su apoyo.

DEDICATORIAS

A mi familia por su apoyo incondicional

Índice

RESUMEN	15
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	19
Generalidades del páncreas (Anatomía)	19
Epidemiología	21
Etiología	23
Cáncer pancreático	24
Adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP)	25
<i>Lesiones precursoras de ACDP</i>	26
Neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN)	27
Neoplasia intraductal papilar mucinosa (IPMN)	28
Neoplasia Quística Mucinoso (MCN)	28
Aspectos clínicos de cáncer de páncreas	29
<i>Manifestaciones clínicas</i>	29
<i>Diagnóstico en cáncer de páncreas</i>	29
Estudios de imagenología	30
Estudios de laboratorio	30
Estudios Histológicos	31
<i>Etapificación del ACDP</i>	31
<i>Tratamiento</i>	33
Células troncales	35
<i>Regulación intrínseca del estado de pluripotencia</i>	36

<i>Epigenética en células troncales</i>	38
<i>Papel de los miRNAs en las CTs</i>	42
Biogénesis de los miRNAs y su papel en la regulación postranscripcional	42
miRNAs y células troncales	43
Células troncales cancerosas características	45
<i>miRNAs y su papel en las vías de señalización en las CTC</i>	47
<i>miRNAs diferencialmente expresados en las CTCs</i>	50
Células troncales cancerosas pancreáticas	52
<i>miRNAs presentes en células troncales de cáncer de páncreas</i>	53
HIPÓTESIS	55
OBJETIVO GENERAL	56
OBJETIVOS PARTICULARES	56
MATERIALES Y MÉTODOS	57
Estrategia Experimental	57
Cultivo celular de la línea cancerosa pancreática PANC-1	58
Formación de “páncreo-esferas”	58
Detección de marcadores de superficie específicos a CTCs	59
Inmunofluorescencia en páncreo-esferas	60
Aislamiento de poblaciones mediante Fluorescencia de clasificación de células activadas (FACS)	61
Evaluación de la capacidad tumorigénica de las paCTC	63
Extracción de RNA	64
Cuantificación de RNA	65
Integridad del RNA	65

Síntesis de cDNA	66
PCR cuantitativa (Sybr Green)	67
Caracterización del perfil de miRNAs mediante microarreglo	68
Validación de miRNAs en población CTCs.....	72
<i>Diseño de “primers”</i>	73
Evaluación de blancos mediante programas predictivos (<i>In silico</i>).....	75
Análisis estadístico	76
RESULTADOS	77
Obtención de páncreo-esferas.....	78
Enriquecimiento de las CTCs obtenidas de las páncreo-esferas.....	79
Aislamiento de paCTCs mediante FACS	82
Tumorigenicidad <i>in vivo</i>	83
Aislamiento del RNA de las células Triple positivas y triple negativas.....	84
Las paCTC ⁺ presentan una mayor expresión de factores de transcripción (SOX-2, KLF4 y OCT4) asociados a pluripotencia	85
Identificación del perfil de miRNAs de CTCs mediante microarreglos.....	86
Genes blancos de los miRNAs expresados diferencialmente	90
11 miRNAs participan en las vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células paCTC ⁺ -like y que regulan la expresión de factores de transcripción involucrados en la pluripotencia	95
DISCUSIÓN	102
microRNAs implicados en la diferenciación de las células paCTC.....	104
CD133 como un marcador de selección de células paCTC no diferenciadas	111

11 microRNA están presentes en las paCTC que promueven su diferenciación	112
CONCLUSIONES	119
PERSPECTIVAS	120
REFERENCIAS	121

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del páncreas.	19
Figura 2. Número de nuevos casos a nivel mundial de distintos tipos de cáncer	21
Figura 3. Epidemiología del cáncer en México en el 2018	22
Figura 4. Modelo de progresión del cáncer pancreático	27
Figura 5. Circuito central de pluripotencialidad celular	37
Figura 6. Número de genes regulados positiva y negativamente por Oct4, Sox2 y Nanog.	37
Figura 7. Bivalencia en la expresión génica.....	41
Figura 8. miRNAs que regulan características de células troncales cancerosas (CTCs), a través de la regulación de diversas vías de señalización.	48
Figura 9. Mecanismo general de regulación de vías de señalización mediante miRNAs en células troncales cancerosas	50
Figura 10. Estrategia experimental empleada en este proyecto.....	57
Figura 11. Obtención de páncreo-esferas.....	79
Figura 12. Inmunofluorescencia de esferas provenientes de la línea celular PANC-1.....	80
Figura 13. Citometría de flujo de células obtenidas de las páncreo-esferas y de monocapa a partir de la línea celular PANC-1	81
Figura 14. Aislamiento mediante FACs, para obtener las poblaciones triple positivas (CD44+, CD133+ y CD24+) y triple negativas (CD44-, CD133- y CD24-).	83
Figura 15. Ensayo de tumorigenicidad <i>in vivo</i> a partir de células provenientes de esferas	84
Figura 16. Imagen que muestra la integridad de las muestras del RNA	85
Figura 17. PCR de tiempo real para determinar la expresión de Sox2, Klf4 y Oct4.....	86
Figura 18. miRNAs expresados diferencialmente en la población paCTC ⁺ like	88
Figura 19. Vías de mayor de enriquecimiento para los mRNA blancos de los miRNAs expresados diferencialmente en paCTC-like.	94
Figura 20. Esquema de vías involucradas en la regulación de pluripotencia en células troncales.	95
Figura 21. Esquema que muestra cómo podrían estar interactuando los miRNAs con sus mensajeros blancos, en vías de señalización importantes para el mantenimiento y diferenciación de las CTCs	97
Figura 22. Cuatro de los 11 miRNAs identificados se comparten con miRNAs que participan en la diferenciación de las células troncales embrionarias de ratón	100
Figura 23. Interacciones miRNA-mRNA blanco, predichas a través de <i>Target Scan</i>	101
Figura 24. Diagrama que esquematiza las vías de señalización de células troncales.	110
Figura 25. Los 11 miRNAs identificados en este trabajo miRNAs regulan negativamente a los factores de pluripotencia promoviendo de esta forma la diferenciación de las paCTC	117
Figura 26. Los 11 miRNAs identificados en este trabajo podrían estar regulando negativamente vías de señalización que permiten regular la autorenovación y diferenciación de las paCTC.....	118

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación del cáncer de páncreas por estadios	32
Tabla II. miRNAs involucrados en la biología de las células troncales	44
Tabla III. Lista de miRNA que regulan la agresividad del tumor, invasión y propiedades de las CTCs	51
Tabla IV. Anticuerpos primarios conjugados	62
Tabla V. Configuración de láseres y filtros del citómetro FACS Aria II	63
Tabla VI. Oligos usados para realizar la PCR cuantitativa de factores de transcripción	68
Tabla VII. <i>Master Mix</i> para la adición de la cola de PoliA a los miRNAs	69
Tabla VIII. Master mix de hibridación	70
Tabla IX. Protocolo de lavado y tinción del microarreglo.	71
Tabla X. Componentes para la transcripción reversa de miRNA	73
Tabla XI. Oligos que se utilizaron para amplificar los 11 miRNAs identificados en este trabajo	75
Tabla XII. miRNAs diferencialmente expresados en las paCTCs ⁺ like	89
Tabla XIII. mRNA blancos de miRNAs validados experimentalmente	91
Tabla XIV. Matriz de miRNAs que interaccionan con factores de transcripción	98
Tabla XV. Los miRNAs identificados en este trabajo con sus probables mRNAs blanco	99
Tabla XVI. Los miRNAs miR-103a-3p, miR-320a, miR-107, miR-15b-5p y miR-196a-5p 5 podrían reconocer la región 3' UTR de genes implicados en pluripotencia	116

ABREVIATURAS

3'-UTR	Región 3' no traducida
ACDP	Adenocarcinoma Ductal Pancreático
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ALDH1	Aldehído Deshidrogenasa 1
APC	Aloficocianina
APC	<i>Axin poliposis coli adenomatosa</i>
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
CA19-9	Antígeno carbohidratado 19-9
CA-50	Antígeno del cáncer 50
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	DNA complementario
CK1 α	Caseína quinasa 1 α
CTC	Célula troncal cancerosa
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
CTE	Células troncales embrionarias
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DcIK1	<i>Doublecortin Like Kinase 1</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Critical Region 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT1	DNA metiltransferasa 1
DNMT3a	DNA metiltransferasa 3a
DNMT3b	DNA metiltransferasa 3b
DPC4	<i>Deleted in pancreatic carcinoma 4</i>
DSV	<i>Dishevelled</i>
DUB	Desubiquitinasa
DUPAN-2	Antígeno monoclonal tipo 2 pancreático de Duke
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio mesénquima
ESA	<i>Epithelial-specific antigen</i>
Exp5	Exportina 5
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isocianato de fluoresceína

FOLFIRINOX	Fluorouracilo, irinotecan, oxaliplatino
FoxM1	Proteína M1 de caja de horquilla
FSC	<i>Forward scatter</i>
FT	Factor de transcripción
FU	5-fluorouracilo
FZD	<i>Frizzled</i>
GSK-3 β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3
H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 de la histona 3
HH	<i>Hedgehog</i>
HIF 1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
HMGA2	<i>High-mobility group AT-hook 2</i>
IFA	Inmunofluorescencia
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IPMN-BD	IPMN del ducto ramificado
IPMN-MD	IPMN del ducto pancreático principal
IPMN	Neoplasia Intraductal Papilar Mucinoso
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i>
Klf4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
KRAS	Oncogen en el virus del sarcoma de Kirsten Rat
Lgr5	<i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i>
lncRNA	RNA largos no codificantes
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MBD	Dominio de unión a metil-CpG
MCN	Neoplasia Quística Mucinoso
mCTE	Células troncales embrionarias murinas
miRNA	microRNA
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
Mtor	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
ncRNA	RNA no codificante
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
paCTC	Célula troncal pancreática cancerosa
PanIN	Neoplasia intraepitelial pancreática
PC	Polycomb
PE	Ficoeritrina
PIK3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>

PRSS1	<i>Trypsin-1 precursor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PTM	Modificación post-traducciona
qPCR	PCR cuantitativa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RM	Resonancia Magnética
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAm	RNA mensajero
SET1A/B	<i>SET Domain Containing 1a</i>
SFB	Suero fetal bovino
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
Sox2	<i>SRY-box 2</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TAD	Dominio asociado topológicamente
TC	Tomografía computarizada
TGFβ	Factor de crecimiento de transformación beta
TP53	Proteína tumoral 53
UES	Ultrasonografía endoscópica
UICC	Unión Internacional contra el cáncer

RESUMEN

El adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) es el más importante cáncer pancreático y sigue siendo uno de los cánceres más letales con una alta tasa de mortalidad debido a su crecimiento agresivo, alta tasa metastásica y recurrencia. Estudios recientes sobre células madre cancerosas (CTC) han sugerido que el crecimiento agresivo, la alta tasa metastásica y la recurrencia pueden ser causados por la capacidad de las células troncales cancerosas (CTC) de autorrenovarse, diferenciarse e impulsar la tumorigénesis. Por lo tanto, se espera que las CTC sean un objetivo terapéutico para el ACDP. Por lo que entonces entender los mecanismos moleculares que participan en la autorenovación, pluripotencia y diferenciación de las células troncales es muy importante. Dentro de los mecanismos moleculares que regulan estas propiedades en las CTCs, se encuentran los miRNAs, una clase de RNAs pequeños no codificantes, que modulan varias actividades biológicas de las CTCs que van desde la invasión, metástasis, así como la resistencia a fármacos. Por lo que la identificación de los miRNAs presentes en las células troncales pancreáticas (paCTC) sería importante ya que estos en un futuro podrían ser empleados como blancos terapéuticos contra este cáncer tan fatal. Con esta idea en mente procedimos a enriquecer a las paCTC, mediante la técnica de formación de esferas a partir de la línea celular PANC-1. Se demostró el enriquecimiento de 49 veces más de las células paCTC en las esferas mediante la presencia de tres marcadores de superficie específicos para las paCTC (CD44, CD133 y CD24). Además de que las células obtenidas a partir de las esferas tuvieron una mayor capacidad tumorigénica *in vivo* que las células crecidas en monocopa. Mediante la técnica de FACS se aisló a la población paCTC⁺-like (triple positiva) y a la población nopaCTC⁻ (triple negativa). Ensayos de RT-qPCR demostraron que las paCTC⁺-like presentaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción pluripotentes Oct4, Klf-4 y Sox2 que las células nopaCTC⁻. Para conocer el perfil de miRNAs presentes en las células paCTC⁺-like se utilizó un microarreglo de miRNAs. El miRNoma de las células paCTC⁺-like se estableció por comparar los miRNAs de las paCTC⁺-like con los miRNAs provenientes de las células nopaCTC⁻. Se identificaron 42 miRNAs diferencialmente expresados en las paCTCs⁺, ($p < 0.001$ y

un FC<2), todos ellos expresados a la baja. Los análisis de enriquecimiento de vías y GO (*Gene Ontology*), mostraron que estos miRNAs regulan procesos como: ciclo celular, varias vías de transducción de señal y de manera importante la vía que regula la pluripotencia de las células troncales. En donde, solamente 11 de los 42 miRNAs identificados participan en esta vía. Análisis bioinformáticos sugieren que estos 11 miRNAs podrían tener como RNA mensajeros blanco componentes de las vías de transducción de señal como Wnt, Hedgehog, Notch,, BMP y FGF y también a RNAs mensajeros de factores de transcripción pluripotentes como Myc, Klf4 y Lin28. Finalmente, y tomando en cuenta que algunos de estos miRNAs se han encontrado sobreexpresados en el proceso de diferenciación de las células troncales y los datos obtenidos con el software *TargetScan*. Nosotros sugerimos que estos 11miRNAs presentan una expresión disminuida para permitir que los factores de transcripción pluripotentes se expresen y dejen que las paCTCs mantengan un estado pluripotente y menos diferenciado. Por lo que de corroborarse esto, se podría desarrollar una terapia dirigida hacia estos 11 miRNAs para incrementar sus niveles de expresión y de esta forma inducir la diferenciación de las CTCs reduciendo la población de células troncales.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most important pancreatic cancer and it's one of the most lethal cancer, with a high mortality rate principally cause by its aggressive growth, high metastatic rate and recurrence. Recent studies in cancer stem cells (CSC) had suggested that the aggressive growth, high metastatic rate and recurrence it can be caused by the CSC capacity to self-renew, differentiate and promoting tumorigenesis. Therefore, is expected that CSC could be a therapeutic target for PDAC. For that reason, understanding the molecular mechanisms that participate in self-renew, pluripotency and stem cell differentiation is essential. Within the molecular mechanisms that regulate the properties in CSC are the miRNAs, a type of small non-coding RNA, they are molecules that modulate diverse biological activities of CSC, from invasion, metastasis, to drug resistance. So, identification of the miRNAs that are present in pancreatic cancer stem cell (paCSC) would be important in order to use them as therapeutic target against this lethal cancer. We proceed to enrich the paCTC population, for that we employ the sphere formation assay using the cell line PANC-1. We demonstrate an enrichment of 49 times more of paCSC from the sphere through the presence of three specific surface markers for paCSC (CD44, CD133 y CD24). Furthermore, the obtained cells from the spheres had a greater tumorigenic capacity *in vivo* in contrast with adherent cells. Through the method of FACS we isolated the population paCSC+like (triple positive) and the population no paCSC-(triple negative). RT-qPCR assays demonstrated that paCSC+like had greater expression levels of the pluripotent transcription factors Oct-4, Klf-4 and Sox-2 in comparison with nopaCTC⁻ cells. To know the profile of miRNAs expression in paCSC+-like we used an microarray of miRNAs. The paCSC+-like miRNoma was established to comparing the miRNAs of the paCSC+like with the miRNAs from the nopaCSC-. We identified 42 miRNAs differentially expressed in paCSC+ like ($p < 0.001$ and $FC < 2$). All 42 miRNAs were decreased in their expression. The pathway and GO (Gene Ontology) enrichment analyzes showed that these miRNAs regulate process such as cell cycle, several transduction signals pathways and importantly the signaling pathways regulating

pluripotency of stem cells. In which 11 of the 42 miRNAs identified were participating in this pathway. Bioinformatic analyzes suggested that these 11 miRNAs could have as targets mRNA that are components of transduction signals such as Wnt, Hedgehog, Notch, BMO and FGF, as well have targets of mRNA of pluripotent transcription factors as Myc, Klf4 and Lin28. Finally, and taking into account that some of these miRNAs have been founded overexpressed in the process of differentiation of stem cells and the data obtained from Target Scan software, we suggested that this 11 miRNAs whose expression are reduced allowing the expression of the pluripotent transcription factor to let that paCSC maintain a pluripotent state less differentiate. So, if this is corroborated, it could be developed a guided therapy toward increasing the expression of these 11 miRNAs in order to induce the differentiation of the CSC and reduce the population of stem cells.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del páncreas (Anatomía)

El páncreas es una glándula alargada, retroperitoneal que se encuentra adosada a la pared posterior del abdomen en una ubicación prevertebral detrás del estómago. Posee un tamaño de alrededor de 14-25 cm de largo y un peso de aproximadamente 100 g. Por su singular posición contacta de forma directa con el intestino delgado y el hígado, se comunica con una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos; así como de estructuras nerviosas tanto propias como de los órganos que lo rodean. En el páncreas se distinguen 4 secciones anatómicamente diferentes que son: 1) la **cabeza**, constituida por el extremo ancho derecho del páncreas, se encuentra dentro de la curva duodenal; 2) el **cuello**, que es la porción estrecha del páncreas que une la cabeza y el cuerpo; 3) el **cuerpo**, compuesto por la porción izquierda del páncreas que se extiende hacia arriba y 4) la **cola**, la cual es la extremidad izquierda del páncreas y es la prolongación del cuerpo dirigida hacia el hilio del bazo (Fig. 1) (1,2).

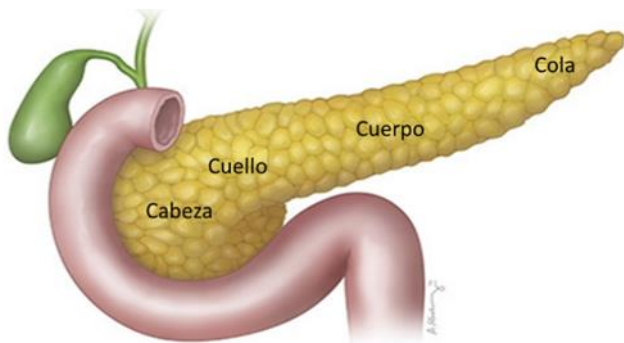


Figura 1. Anatomía del páncreas. Imagen con las cuatro secciones anatómicas que conforman el páncreas (3).

El páncreas se considera una glándula mixta por estar constituida por dos componentes glandulares estructuralmente distintos, que son el componente **exocrino** y el **endocrino**.

El componente exocrino comprende más del 95% de la masa pancreática y es el encargado de producir, almacenar y secretar enzimas digestivas hacia el duodeno, está formado por los acinos y el sistema ductal, su unidad funcional está compuesta por células acinares, centroacinares y células ductales, las cuales están asociadas con tejido conectivo. Las células acinares se agrupan formando acinos que contienen gránulos de zimógenos acidófilos, los cuales sintetizan, almacenan y secretan enzimas y proenzimas digestivas pancreáticas, como son tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa, amilasa, lipasa y carboxilesterasa (4). Respecto a las células ductales, éstas contienen anhidrasa carbónica y algunas de ellas se proyectan hacia la luz del acino. De esta manera, las enzimas de las células acinares son liberadas en una solución rica en bicarbonato que es secretada por las células centroacinares y ductales, viajando por el sistema ductal hacia el duodeno (1,5).

En lo que respecta al componente endocrino, este constituye del 1-2% del total de la masa pancreática y está conformado por pequeñas agrupaciones celulares conocidas como islas pancreáticas (islas de Langerhans). El páncreas humano puede contener más de un millón de isletas distribuidas a lo largo de la glándula, pero principalmente se localizan en la cola. Estas islas están compuestas por aproximadamente 1000 células, dentro de las cuales se pueden distinguir varios tipos según las hormonas que secretan, células alfa (α) productoras de glucagón, células beta (β) productoras de insulina, células delta (δ) productoras de somatostatina, células PP productoras de polipéptido pancreático y células épsilon (ϵ) productora de ghrelina (5). Estas hormonas pancreáticas tienen un papel fundamental en la regulación del metabolismo de los nutrientes en el organismo y mantienen la homeostasis de la glucosa (6).

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

Epidemiología

A pesar de no tener una incidencia comparable con la de otros tipos de cáncer la tasa de mortalidad del adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), es la más alta de entre todos los tipos de cáncer con una supervivencia promedio de 6 meses al momento del diagnóstico y una supervivencia de 5 años menor al 8% (7). Se estima que de continuar la tendencia como hasta ahora para el año 2030 el ACDP será la segunda causa de mortalidad producida por cáncer a nivel mundial (8). De acuerdo con estimaciones del GLOBOCAN en el año 2018, el cáncer de páncreas se ubica en el 12° lugar en incidencia en el mundo, con 458,918 nuevos casos (Fig. 2), de los cuales 432,242 mueren a causa de esta enfermedad, por lo que esto, posiciona al cáncer de páncreas en el 7° lugar de muertes producidas por cáncer (9). El cáncer de páncreas se considera una de las neoplasias más letales, ya que, a pesar de los avances en el manejo y la detección del cáncer de páncreas, la tasa de supervivencia a los 5 años es de tan solo 8%. Esto se debe a que los pacientes presentan síntomas cuando la enfermedad ya está muy avanzada (9,10).

Número estimado de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades

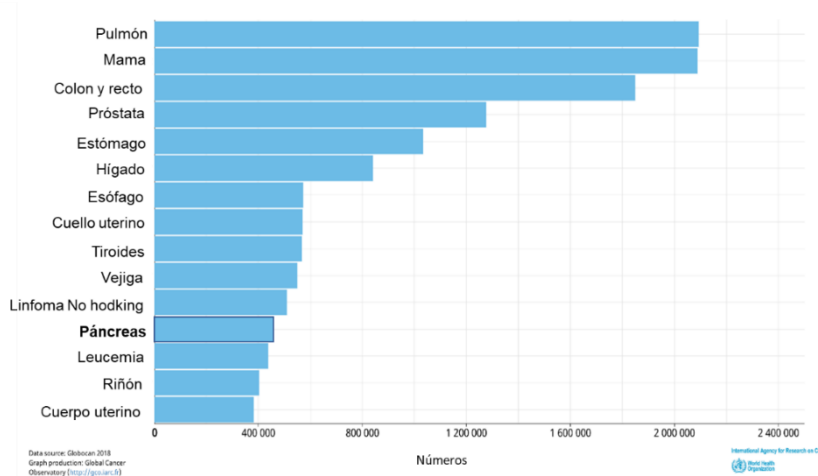
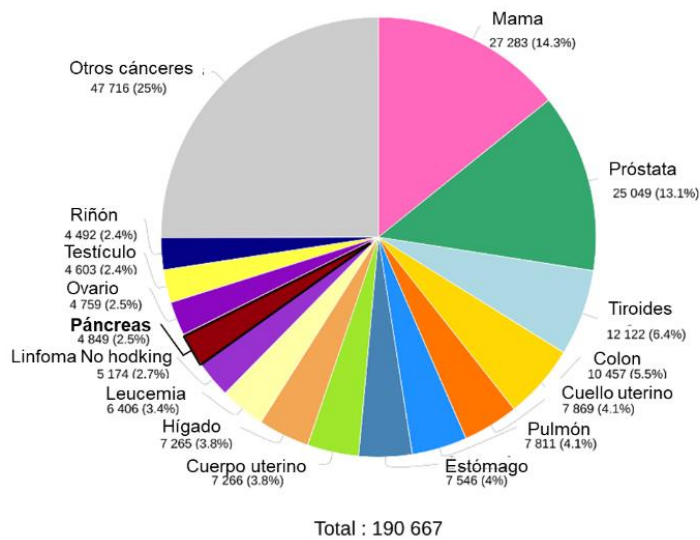


Figura 2. Número de nuevos casos a nivel mundial de distintos tipos de cáncer (9) Gráfica de barras donde se observa que el cáncer de páncreas ocupa el 12° lugar en incidencia.

En México el cáncer de páncreas se ubica en el 12° lugar en incidencia con 4,849 casos nuevos en el 2018 y el 7° en mortalidad con 4,475 muertes en el 2018 (Fig. 3 A y B).

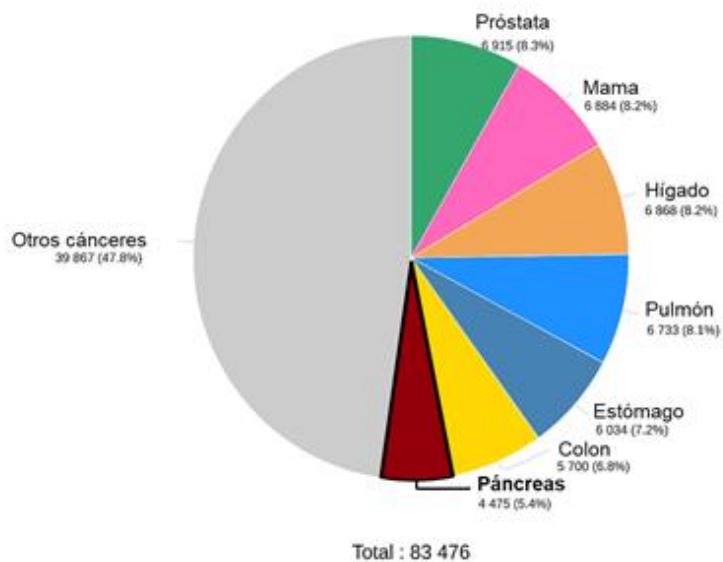
A)



Data source: Globocan 2018
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

B)



Data source: Globocan 2018
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Figura 3. Epidemiología del cáncer en México en el 2018. A) Número de nuevos casos de cáncer en México en el 2018 B) Muertes asociadas a diferentes tipos de cáncer. Como se aprecia en la gráfica, el cáncer de páncreas ocupa el 12° lugar en incidencia en México y el séptimo lugar de muertes asociadas a cáncer (9).

Etiología

No se tiene suficiente información de cuáles son las causas exactas que conducen al cáncer de páncreas, sin embargo, se han identificado ciertos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar este cáncer. Entre estos factores se encuentran el tabaquismo, diabetes, dieta rica en grasas, inactividad y su fondo genético. A continuación, describiremos brevemente cada uno de estos factores de riesgo.

El tabaquismo. Aproximadamente el 20% de todos los cánceres de páncreas son atribuibles al tabaquismo. Los fumadores poseen un riesgo de aproximadamente 2 veces de desarrollar cáncer pancreático comparado con las personas que nunca fumaron, y este riesgo persiste por 10-20 años después de dejar de fumar. Además, este riesgo se incrementa proporcionalmente con el número de cigarrillos fumados por día y los años que han fumado. Se piensa que riesgo de desarrollar ACDP por los fumadores se debe a que el tabaco es una mezcla compleja que contiene al menos 50 carcinógenos conocidos los cuales probablemente inicien y faciliten el desarrollo de los tumores pancreáticos (10,11).

Otro factor de riesgo es la diabetes, ya que se ha estimado que el 80% de pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas padecen de intolerancia a glucosa o diabetes (12). Aunque la diabetes se ha considerado como un factor de riesgo, este podría ser una consecuencia del cáncer de páncreas. Por lo que la aparición de diabetes podría servir como un indicador en la detección de cáncer pancreático (12).

El incremento en el índice de masa corporal también incrementa el riesgo de cáncer de páncreas entre individuo obesos (13). Un mecanismo propuesto que explica el incremento del riesgo en personas con un índice de masa corporal alto es la resistencia a la insulina, esto lleva a una mayor secreción de insulina resultando en hiperinsulinemia y en un incremento en los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) el cual inhibe apoptosis y promueve al desarrollo de tumores pancreáticos (14).

Otro factor altamente asociado es el consumo de alcohol, ya que se ha demostrado que el consumo excesivo de alcohol está asociado con pancreatitis (15), un factor de riesgo establecido para el cáncer pancreático. La inflamación y el daño causado por una pancreatitis crónica pueden llevar al desarrollo de cáncer pancreático (16). Sin embargo, individuos con cáncer de páncreas también experimentan pancreatitis como consecuencia del cáncer.

Finalmente, uno de los más fuertes factores de riesgo para desarrollar cáncer pancreático es la historia familiar, ya que se ha encontrado que el riesgo incrementa 6.79 veces entre individuos con familiares de primer grado que padecen cáncer pancreático. Aproximadamente del 5 al 10% de los casos de ACDP se presentan en pacientes con una historia familiar con este tipo de cáncer y esto se atribuye a factores genéticos heredables. Además, un alto riesgo de un cáncer pancreático está asociado a síndromes heredables donde se presentan alteraciones en genes como PRSS1, TP53, CDKN2A, BRCA1 y BRCA2. Sin embargo, esto debe tomarse con ciertas reservas ya que en diversos cánceres pancreáticos, mutaciones en genes como: KRAS, BRAF y SMAD4 no son parte de síndromes heredables (17,18).

Cáncer pancreático

Debido a que el páncreas es un órgano mixto se generan dos tipos de tumores: 1) los tumores endocrinos pancreáticos, los cuales tienen su origen en las células endocrinas y representan menos del 5% de todos los casos de cáncer de páncreas y 2) los tumores exocrinos que tienen su origen en las células exocrinas del páncreas y representan aproximadamente el 95% de los cánceres pancreáticos (11).

El tipo de cáncer pancreático exocrino más común es el ACDP y constituye el 90% de todos los casos de tumores exocrinos, El ACDP puede desarrollarse a partir de cualquiera de las tres células del tejido exocrino del páncreas (células ductales, células acinares y células centroacinares), teniendo al final un fenotipo ductal (19).

El ACDP puede desarrollarse en cualquier porción del páncreas, aunque más frecuentemente se origina en la cabeza del páncreas. Después del ACDP la neoplasia más común son los tumores neuroendocrinos los cuales comprenden el 5%. Las neoplasias neuroendocrinas pueden llevar a una producción activa de hormonas y como consecuencia a la aparición de síntomas graves como hipoglucemia y eritema necrolítico migratoria (20). Por todo lo anteriormente expuesto, es evidente que el ACDP es de suma importancia a nivel de salud pública por lo que a continuación describiremos más detalladamente a este tipo de cáncer.

Adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP)

El ACDP son lesiones que forman masas que se infiltran en el tejido suave del parénquima pancreático. Estos carcinomas pueden invadir el ducto biliar, el ducto principal pancreático o ambos, lo que resulta en una atrofia en el parénquima pancreático. La mayoría de los ACDP ocurren en la cabeza del páncreas y en menor proporción en el cuerpo y la cola (21). Cuando aparece en la cabeza de la glándula puede resultar en la aparición de ictericia dado por la invasión o compresión de ducto biliar, también aparecen otros síntomas como pérdida de peso y dolor abdominal. Mientras que la aparición de ACDP en el cuerpo o cola de la glándula, usualmente son asintomáticos, por lo que se dificulta su diagnóstico.

El ACDP se caracteriza por la capacidad de infiltración de las células neoplásicas, las cuales pueden aplanarse y crecer en la superficie endotelial de los vasos, tomando la apariencia de un ducto; otra característica del ACDP es la formación de estroma desmoplásico denso lo que impide que la quimioterapia llegue a las células neoplásicas (21,22). El hecho de que el diagnóstico de este cáncer en el 52% de los casos se realice en etapas avanzadas de la enfermedad, (cuando el cáncer ya se ha diseminado y creado metástasis) se debe a la ausencia de síntomas específicos que permitan detectarlo en etapas tempranas y a la falta de biomarcadores lo suficientemente sensibles y específicos para realizar un diagnóstico temprano cuando la resección quirúrgica del tumor representa la única opción de tratamiento potencialmente curativa para los pacientes. Por lo que

entonces, solamente del 15-20% de los pacientes diagnosticados con ACDP son candidatos para que se realice la pancreatometomía. No obstante, aún en esas circunstancias la tasa de sobrevivencia para estos pacientes a 5 años se mantiene por debajo del 20% incluso con quimioterapia adyuvante (7,23).

Otro factor que impacta en la agresividad del ACDP, es que es un tumor altamente resistente a la quimioterapia convencional y a la radiación. Actualmente la gemcitabina, es la opción más empleada para el tratamiento del ACDP. Sin embargo, su empleo no ha mostrado aportar un beneficio a la sobrevivencia de estos pacientes, por lo que existe una urgente necesidad en desarrollar nuevas terapias que estén dirigidas específicamente a las vías alteradas más relevantes en la patobiología del ACDP (24).

Lesiones precursoras de ACDP

Yachida en el 2010 sugiere que los cambios genéticos observados en el ACDP y metástasis toman alrededor de 12 años desde la mutación inicial hasta el desarrollo de un ACDP invasivo. Es decir, es un cáncer que pasa por lesiones preneoplásicas antes de considerarse un ACDP. Hasta la fecha, tres diferentes tipos de lesiones precursoras han sido identificadas que dan origen al ACDP como son: Neoplasia Intraductal Papilar Mucinoso (IPMNs), Neoplasia Quística Mucinoso (MCN), y Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN). Todas estas lesiones precursoras poseen los criterios para ser consideradas como lesiones precancerosas, ya que exhiben una morfología multipasos y progresión a carcinoma invasivo (Fig.4) (25,26).

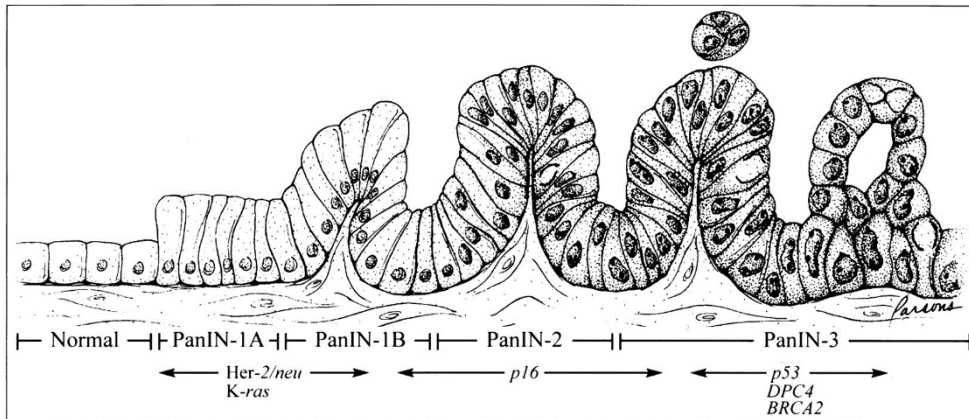


Figura 4. Modelo de progresión de cáncer pancreático. Sobreexpresión de HER-2/neu y mutaciones puntuales en K-Ras ocurren en una etapa temprana, la inactivación de p16 ocurre en una etapa intermedia, y la inactivación de p53, DPC4 y BRCA2 ocurren tardíamente (25).

Neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN)

La neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) es el precursor más común del ACDP. Los PanIN pueden encontrarse en un 82% de los carcinomas invasivos pancreáticos, un 60% en pancreatitis crónica y un 16% en páncreas normal. Las lesiones PanIN son neoplasias epiteliales, no invasivas y microscópicas de un tamaño menor a 1 cm y se encuentran situados principalmente en la cabeza del páncreas. Sin embargo, debido a su tamaño pequeño su detección por técnicas de imagenología es muy difícil.

Dependiendo de su grado de atipia celular los PanIN se clasifican en tres grados: PanIN-1, PanIN-2, y PanIN-3. La PanIN-1 a su vez se divide en PanIN-1A y PanIN-1B. Las PanIN-1A presentan una arquitectura plana mientras que las PanIN-1B poseen una arquitectura papilar. Las PanIN-1 presentan un bajo grado de atípia, se caracterizan por presentar un epitelio columnar mucinoso. En el caso de las PanIN-2 se definen por mostrar una displasia moderada, pérdida de polaridad y una arquitectura epitelial papilar. Finalmente, las PanIN-3 poseen una marcada atipia,

figura mitótica, pérdida de la polaridad y una arquitectura micropapilar o aplanada. Las lesiones PanIN-3 se encuentran casi exclusivamente asociadas a adenocarcinoma (27).

Por lo que actualmente se acepta que la progresión de los tipos de PanIN 1 a 3 es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas tal y como se esquematiza en la figura 4 (25).

Neoplasia intraductal papilar mucinosa (IPMN)

Otra lesión preneoplásica que puede conducir al ACDP son los IPMN y representan tan solo del 3-5%, es una neoplasia usualmente papilar, productoras de mucina y dependientes del epitelio ductal, con un tamaño de al menos 1.0 cm. La IPMN puede desarrollarse en el ducto pancreático principal o en algunas de sus ramas accesorias. Cuando ocurre en el ducto principal es más probable que se presenten síntomas. Las IPMNs pueden clasificarse de acuerdo al conducto pancreático de donde se originan: del ducto pancreático principal (IPMN-MD), de los ductos ramificados (IPMN-BD) y los que involucran el ducto principal y los ductos ramificados (tipo mixto). De todos estos, los que poseen un mayor grado de malignidad son los provenientes del ducto pancreático principal, ya que el 62% de los IPMN-MD tienen un alto grado de displasia en comparación con un 24% de los IPMN-BD (28).

Neoplasia Quística Mucinoso (MCN)

La Neoplasia Quística Mucinoso son las lesiones precursoras menos comunes (>5%) se presentan con mayor prevalencia en mujeres (26,27), y al igual que las dos anteriores pueden llevar al desarrollo del adenocarcinoma ductal invasivo. Las MCN son neoplasias formadoras de quistes las cuales no se encuentran en contacto con el sistema ductal pancreático, varían en tamaño de uno a varios centímetros y cuentan con pared fibrosa. El contenido del quiste con frecuencia es mucoide. Estos quistes semejan a las neoplasias mucinosas de ovario. Los quistes están revestidos por epitelio cilíndrico productor de moco rodeado de estroma similar al ovario. Estas neoplasias pueden presentar diferentes grados de atipia arquitectural y citológica,

en un espectro que va desde displasia leve hasta carcinoma *in situ*. A diferencia de las IPMN que se originan principalmente en la cabeza del páncreas, las MCN se localizan típicamente en el cuerpo y cola del páncreas

Aspectos clínicos de cáncer de páncreas

Manifestaciones clínicas

Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer de páncreas en una etapa temprana es asintomática, o bien los síntomas que se presentan son inespecíficos y pueden ser confundidos con otras enfermedades. La enfermedad se hace evidente después de que el tumor invade los tejidos circundantes u ocurre metástasis en órganos distantes. Algunos síntomas son: orina oscura, heces pálidas, pérdida de peso sin causa conocida, dolor abdominal, náuseas, vómito, debilidad o sensación de cansancio, ictericia obstructiva. Sin embargo, estos síntomas pueden ser causados por otro tipo de cáncer o por otros problemas de salud. Por lo que es necesario que el paciente informe a su médico para ser diagnosticado a tiempo (29).

Diagnóstico en cáncer de páncreas

El diagnóstico de este tipo de cáncer es un reto debido a su localización inaccesible en el abdomen. Actualmente, en la clínica se cuenta con tres herramientas de diagnóstico, las cuales además de detectar la presencia del tumor, ayudan a la estadificación de la enfermedad. Estos métodos de diagnóstico son: 1) los estudios de imagenología, los cuales son importantes para la detección de la masa tumoral, 2) los estudios de laboratorio que se encargan de detectar marcadores tumorales en muestras biológicas como sangre y jugo pancreático, y 3) los estudios histológicos realizados en biopsias del tejido canceroso, los cuales confirman los dos estudios anteriores, razón por la cual es considerada como el estándar de oro

para el diagnóstico del cáncer de páncreas (29,30,31). A continuación describiremos cada uno de ellos.

Estudios de imagenología

El diagnóstico del cáncer de páncreas en la mayoría de las instituciones se realiza mediante técnicas de imagen, como son: la ultrasonografía endoscópica (UES), tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (RM) y laparoscopia (32). Las pruebas por imagen permiten a los médicos determinar la ubicación del cáncer y si se ha diseminado desde el páncreas hacia otras partes del cuerpo. El ACDP, en las etapas iniciales puede ser difícil de reconocer por imagenología. Sin embargo, la tomografía computada (TC) reproduce imágenes de alta calidad que facilitan la detección de la enfermedad avanzada y metastásica. El protocolo TC trifásica, para el ACDP, es la mejor prueba diagnóstica inicial, proporciona una precisión del 80%. Por su parte, el ultrasonido endoscópico también es muy preciso para el diagnóstico de ACDP, y además durante el ultrasonido se puede realizar el muestreo para el diagnóstico citológico. Por otro lado, la laparoscopia puede detectar metástasis peritoneales, pero no se realiza rutinariamente antes de proceder con la cirugía pancreática (31,17). Sin embargo, las pruebas por imagen no detectan tumores menores a 1 cm por los que no es el método más apropiado para detectar a las lesiones preneoplásicas más frecuentes (90%) que conllevan al desarrollo del ACDP, las PanIN.

Estudios de laboratorio

Además del diagnóstico por imagenología, existen los estudios de laboratorio que se encargan de detectar marcadores tumorales en muestras biológicas como sangre y jugo pancreático. Existen 2 tipos de marcadores, los antigénicos y los moleculares. Entre los antigénicos se incluyen marcadores sanguíneos como: antígeno carbohidrato de 19-9 (CA19-9), antígeno de cáncer 50 (CA-50), antígeno monoclonal tipo 2 pancreático de Duke (DUPAN-2), mucinas asociadas a superficies celulares, antígenos carcinoembrionarios y proteínas de choque térmico. Entre los marcadores moleculares se encuentra la detección de genes como K-RAS,

p53, DPC4 y BRCA2 (32). No obstante, estos estudios son costosos y poco específicos ya que estas moléculas están presentes en varios tipos de cáncer.

Estudios Histológicos

Hasta la fecha, el diagnóstico definitivo de los pacientes con sospecha de tumores pancreáticos depende de la obtención de material mediante biopsias del tejido canceroso para sus estudios histológicos o citológicos. Estos estudios sirven para confirmar el hallazgo de los estudios de imagen. Además de que permiten descartar tumores benignos presentes en el páncreas. Por lo que este método se considera el estándar de oro para el diagnóstico de esta enfermedad.

Finalmente, los médicos utilizan estas pruebas diagnósticas para averiguar la etapa clínica del cáncer ya que esto ayudará a determinar cuál es el mejor tratamiento y a predecir el pronóstico de un paciente.

Etapificación del ACDP

La etapificación es primordial para el manejo adecuado del cáncer de páncreas, de esta forma se pueden identificar pacientes que pueden ser candidatos a tratamiento quirúrgico además de predecir el pronóstico del paciente, es decir, la probabilidad de recuperación.

El sistema de etapificación más reconocido para el ACDP es el propuesto por la unión internacional contra el cáncer (UICC) conocido como el sistema TNM. Este sistema, se basa en el tamaño y extensión del tumor primario (T). En donde, la N, describe la propagación hacia los ganglios (nódulos) linfáticos regionales y la M, indica si el cáncer ha hecho metástasis a otros órganos del cuerpo (32). Dependiendo de lo avanzado que se encuentra el cáncer en el momento del diagnóstico, se pueden asignar grados a estas categorías. Posterior a la asignación de la categoría TMN se asigna una etapa general que va de la etapa I a la etapa IV (Tabla I).

En la Tabla I se muestra las características macroscópicas de cada etapa, así como el porcentaje de sobrevida para cada una de ellas. Finalmente, toda esta información ayudara al médico para establecer el tratamiento más adecuado para el paciente.

Tabla I. Clasificación del cáncer de páncreas por estadios (32).

Estadio	Clasificación	Clasificación clínica	Distribución por estadios	Supervivencia a 5 años
0	Tis N0 M0	Resecable	7.5%	15.2%
IA	T1 N0 M0	Resecable		14%
IB	T2 N0 M0	Resecable		12%
IIA	T3 N0 M0	Resecable		7%
IIB	T1-3 N1 M0	Localmente avanzado	29.3%	6.3%
III	T4 N0-1 M0	Localmente avanzado		3%
IV	Tis-4 N0-1 M1	Metastásico	47.2%	1.6%

Tumor (T) Tis: Carcinoma *in situ*, T1: El tumor está limitado al páncreas y mide ≤ 2 cm de diámetro, T2: El tumor está limitado al páncreas y mide ≥ 2 cm en su diámetro, T3: El tumor se extiende más allá del páncreas, pero sin implicación de arterias, T4: El tumor se extiende a arterias (irresecable). **Ganglios linfáticos regionales (N)**. NX: Los ganglios linfáticos regionales no son evaluables, N0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales, N1: Existe metástasis a los ganglios linfáticos regionales. **Metástasis (M)**. MX: La metástasis a distancia no puede evaluarse, M0: No hay metástasis a distancia, M1: Existen metástasis distante del origen.

Otro método que se emplea para clasificar el cáncer de páncreas se basa en la posibilidad de extirparlo con cirugía y las partes a las que se ha diseminado:

Extirpable

Este tipo de cáncer de páncreas puede extraerse quirúrgicamente. A menudo, la cirugía se realiza enseguida después del diagnóstico. A veces, se puede recomendar un tratamiento adicional antes de la cirugía. El tumor puede estar ubicado únicamente en el páncreas o extenderse más allá, pero no ha crecido hasta afectar arterias o venas importantes del área. No hay evidencia de que el tumor se

haya diseminado a otras áreas fuera del páncreas. Entre el 10 % y el 15 % de los pacientes, aproximadamente, reciben el diagnóstico en este estadio.

Extirpable límite

Esta categoría describe un tumor que posiblemente será difícil, o imposible, de extirpar quirúrgicamente, cuando se lo diagnostica por primera vez, pero si la quimioterapia y/o la radioterapia pueden reducir el tumor en primer lugar, es posible que se extirpe en el futuro con márgenes negativos. Esto significa que no quedarán células cancerosas visibles.

Localmente avanzado

Este tipo aún está ubicado únicamente en el área alrededor del páncreas, pero no se lo puede extirpar quirúrgicamente porque ha crecido hasta afectar arterias, venas u órganos cercanos. Esto significa que no se puede extirpar con cirugía porque el riesgo de dañar estas estructuras cercanas es muy alto. No hay signos de que se haya diseminado a ninguna parte distante del cuerpo. Entre el 35 % y el 40 % de los pacientes, aproximadamente, reciben el diagnóstico en este estadio.

Metastásico

El tumor se ha diseminado más allá del área del páncreas y a otros órganos, como el hígado, los pulmones u otras áreas alejadas del abdomen. Entre el 45 % y el 55 % de los pacientes, aproximadamente, reciben el diagnóstico en este estadio. Al clasificar los diferentes tipos de cáncer en una de estas categorías, el equipo de atención médica puede planificar la mejor estrategia de tratamiento.

Tratamiento

Una vez confirmado el diagnóstico del ACDP, el médico puede optar por varios tratamientos dependiente de la etapa en la que se encuentre el paciente. El manejo del cáncer de páncreas en casos selectos y en un estadio temprano, es mediante el tratamiento quirúrgico, el cual es el único con posibilidad curativa. Este tratamiento depende de que el paciente sea un candidato adecuado, por lo cual es

necesario un estudio histológico previo. Las técnicas usadas según la extensión del tumor de páncreas son: pancreatectomía parcial o total y cirugía radical.

El alto riesgo de recurrencia de la enfermedad local y sistemática, establecen la base para el tratamiento adyuvante. El tratamiento adyuvante se basa en el uso de quimioterapia (32). Durante decenios, la gemcitabina ha sido el valor de referencia (estándar de oro); sin embargo, ahora hay varias opciones más efectivas que los médicos tratantes pueden considerar. La elección del tratamiento debe adaptarse al paciente, teniendo en cuenta su estado funcional y los perfiles de efectos secundarios de los agentes de quimioterapia. Resultados han demostrado que en el cáncer de páncreas avanzado, la gemcitabina es superior al 5-fluorouracilo (FU); y que en comparación con la gemcitabina sola, las combinaciones multimedicamentos mejoran los resultados de supervivencia y las tasas de respuesta en el ACDP. El FOLFIRINOX, el GEMOXEL y la gemcitabina/cisplatino/epirubicina y el 5FU son regímenes activos. Estos datos indican que, en los pacientes adecuados, los regímenes multimedicamentos pueden ser apropiados, aunque debe tenerse en cuenta la posibilidad de una mayor toxicidad (33)

El tipo de radiación que se usa con más frecuencia para tratar el cáncer de páncreas es la radioterapia de rayo externo que enfoca la radiación desde una fuente externa al cuerpo en dirección hacia el cáncer. Cada tratamiento dura sólo unos minutos y se administran 5 días a la semana por varias semanas. Los efectos secundarios de este tratamiento pueden incluir náusea, vómito, diarrea o estreñimiento, cansancio, mareo, pérdida de apetito, pérdida de peso dolor muscular y de articulaciones (32). Para el tratamiento de cáncer de páncreas que se encuentra localmente avanzado, se utiliza la administración de quimioterapia y radioterapia y para un cáncer de páncreas diseminado, la estrategia a seguir es el uso combinado de gemcitabina con otros fármacos (32).

Sin embargo, pese al empleo de estos tratamientos existe una alta resistencia y recurrencia de este tipo de cáncer y se cree que esto se debe a la presencia de una pequeña subpoblación de células troncales cancerosas (CTCs) presentes en el

tumor. Pero antes de definir a las células troncales y sus implicaciones en el cáncer revisaremos brevemente que son las células troncales y los mecanismos epigenéticos que regulan a esta subpoblación de células.

Células troncales

Una de las razones por la que las células madre son importantes se debe a que el desarrollo humano se da a partir de células troncales.

Las células troncales se definen por su capacidad de auto-renovación y su potencial para diferenciarse en distintos tipos celulares. Tienen la capacidad de dividirse asimétricamente, formando una célula troncal y una célula progenitora la cual se somete a diferenciación, o bien de dividirse simétricamente donde la célula troncal se divide y las dos células indiferenciadas continúan como células troncales la división simétrica es usada por las células troncales normales cuando ellas necesitan expandir su número, ya que como mencionamos previamente esta clase de división genera solo células troncales.

Las células troncales pueden dividirse en dos tipos generales: las células troncales embrionarias, las cuales están presentes en etapas tempranas de desarrollo y las células troncales somáticas o adultas, las cuales aparecen durante el desarrollo fetal y permanecen a lo largo de la vida (34).

Las células troncales embrionarias (CTE) son células derivadas de la masa celular interna del estadio de blastocito del embrión, estas células poseen dos propiedades importantes que las definen: pluripotencialidad y auto-renovación. Esta pluripotencialidad permite que puedan diferenciarse en todas las posibles células de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) (35). Para mantener el destino de las CTE es necesario una red compleja de factores intrínsecos y extrínsecos en conjunto con la remodelación de la cromatina

En el caso de las células troncales adultas, éstas son células indiferenciadas cuyo principal papel es reponer las células que van muriendo y reparar el tejido dañado. Tienen la capacidad de autorenovarse con el fin de mantener un “pool” de células indiferenciadas y también son multipotentes, lo que significa que tienen la habilidad de diferenciarse en tipos celulares limitados al tejido u órgano de donde se originaron (35).

Regulación intrínseca del estado de pluripotencia

Se han identificado reguladores muy importantes de la pluripotencialidad, los cuales son proteínas que reconocen secuencias específicas de DNA y que regulan la síntesis del RNA. Hasta la fecha se han identificado más de 100 genes involucrados en pluripotencialidad, de los cuales se encontraron que tan solo tres factores como Oct4, Sox2 y Nanog permiten a las células troncales permanecer en un estado de pluripotencia. En células troncales humanas se ha demostrado que estos tres factores de transcripción (FT) tienen un círculo de retroalimentación positiva entre ellos además de que comparten muchos de los genes que regulan. Sox 2 se expresa de manera más abundante que los otros dos FTs. Sin embargo, la presencia de Oct4, el cual se encuentra en baja expresión permite que Sox2 y Oct4 formen heterodímeros y que se unan al promotor de Nanog, permitiendo su transcripción. Una vez presentes los tres factores promueven la transcripción de genes propios de las células troncales embrionarias, además de unirse a sus propios promotores, formando un círculo de retroalimentación positiva consigo mismos y con los otros dos FTs (36)(Figura 5).

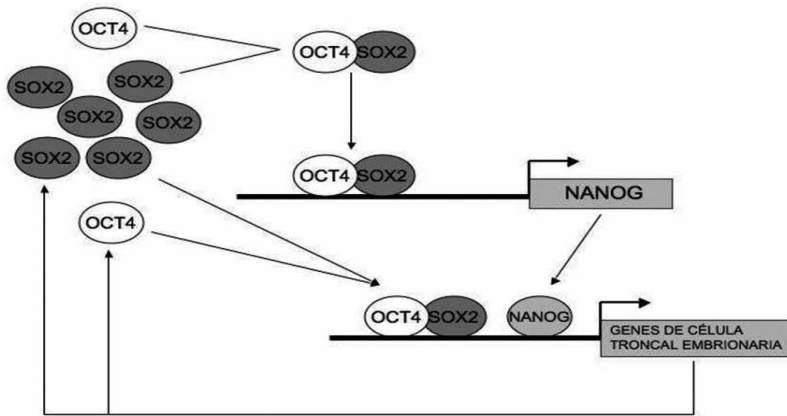


Figura 5. Circuito central de pluripotencialidad celular. Circuito formado por los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog, FTs que forman un triple circuito de retroalimentación positiva que estabiliza ese estado celular (36)

Más tarde en el trabajo de Boyer y colaboradores publicado en el 2005, fue propuesto el esquema de regulación en forma de cascada (Figura 6). Encontrándose que cada uno de estos FT regulan la expresión de un gran número de genes (37) Figura 6.

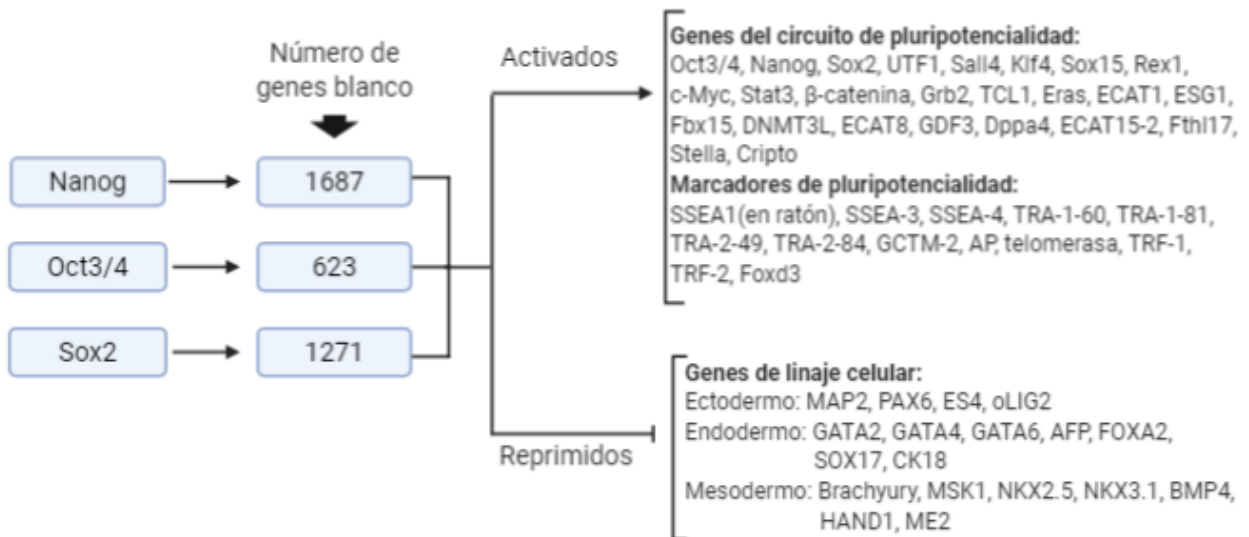


Figura 6. Número de genes regulados positiva y negativamente por Oct4, Sox2 y Nanog. Junto a cada uno de los genes se observa el número de genes que tienen sitios de unión en promotores y *enhancers* para el factor en cuestión (37).

Por ejemplo, Oct4 interactúa con los promotores de 623 genes blancos, incluyendo Oct4, Sox2, Nanog, LEFTY2/EBAF, CDX2, HAND1, DPPA4, GJA1/CONNEXIN43,

FOXO1A, CRIPTO/TDGF1, ZIC3, Ibx15. Mientras que Sox2, se une a promotores de 1271 genes; por su parte Nanog se une a 1687 genes. Es notable que los tres factores coinciden en la ocupación de 353 promotores. De estos genes blanco en células pluripotentes, aproximadamente el 50% sirven para autorenovación y pluripotencialidad, mientras que el otro 50% son genes específicos de linaje (la mayoría son genes de homeodominio) que codifican factores de diferenciación para las tres capas embrionarias y también para células extraembrionarias (37). Esto quiere decir que Oct4, Sox2 y Nanog activan a los promotores de genes que mantienen la pluripotencialidad y reprimen los promotores de genes específicos de diferenciación. Por lo tanto, el mismo grupo de reguladores transcripcionales presenta una acción dual de activador/represor, activando el circuito de pluripotencialidad y reprimiendo el circuito de diferenciación.

Además de los tres genes previamente descritos se sumaron a esta red transcripcional genes conocidos por su contribución a la carcinogénesis tales como c-Myc y Klf4. Actualmente se sabe que para la inducción de la pluripotencialidad a partir de células diferenciadas solo es necesaria la expresión de los factores Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. A las células pluripotenciales generadas con esta metodología las nombraron “induced pluripotent stem cell” iPSC (38).

En células diferenciadas, los genes de pluripotencialidad no se expresan, porque son silenciados por mecanismos epigenéticos los cuales se describirán a continuación.

Epigenética en células troncales

Se ha demostrado que la regulación a nivel epigenético define el estado de troncalidad en las células. Cambios como modificaciones químicas de la cromatina, alteraciones en los constituyentes de la cromatina y cambios en la organización 3D de la cromatina, y los RNA no codificantes (ncRNA), incluyendo tanto largos (lncRNA) como cortos entre los que se incluyen los microRNAs (miRNA) regulan el

estado de troncalidad, estado definido por sus propiedades de autorenovación y pluripotencialidad (39).

Todos estos mecanismos trabajan en conjunto para regular el funcionamiento del genoma, alterando la arquitectura de la cromatina al regular principalmente su nivel de compactación y por ende la accesibilidad de la maquinaria de transcripción, reparación y replicación hacia sus genes blanco (40). ¿Pero cómo ocurre esto?

Esto se entiende mejor si partimos de que el ADN en el núcleo forma parte de la cromatina. La cromatina a su vez se compone de unidades repetidas de nucleosomas, las cuales consisten de ~146 pares de bases de ADN enrollados 1.7 veces alrededor de un octámero de histonas, conformado por un tetrámero H3-H4 y dos dímeros de H2A-H2B (23)

Las células troncales pluripotentes poseen una cromatina abierta e hiper-dinámica (eucromatina) la cual llega a transformarse a una cromatina más compacta y restrictiva (heterocromatina) durante la diferenciación. (41)

Pero esta regulación epigenética no solamente ocurre en un contexto de cromatina, sino que también se lleva a cabo en el DNA. Uno de los mecanismos claves en la regulación epigenética es la metilación del ADN, este mecanismo proporciona un silenciamiento estable de los genes. La metilación del ADN interfiere con la unión de factores de transcripción y simultáneamente atraer proteínas con dominio de unión a metil-CpG (MBD) que inicia la compactación de la cromatina y el silenciamiento de genes (41). Las enzimas encargadas de metilar al ADN son llamadas ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) y son las responsables del agregar el grupo metilo para mantener o crear los patrones de metilación (23) Un número creciente de evidencias muestran que en células troncales embrionarias de ratón *Dnmt1*^{-/-}, *Dnmt3a*^{-/-}, *Dnmt3b*^{-/-}, son incapaces de diferenciarse in vitro debido a una apoptosis excesiva resultado de la deficiencia de *Dnmt1* o por la falta de represión en genes pluripotentes tales como *Oct4* y *Nanog* a causa de la deficiencia en *Dnmt3a* y *Dnmy3b* (39). Por lo que entonces la regulación en la metilación del ADN es necesaria para que las células troncales

salgan de un estado de pluripotencialidad y puedan diferenciarse apropiadamente. (42).

Otro mecanismo epigenético que ocurre a nivel de la cromatina son las modificaciones post-traduccionales (PTMs), de las histonas, las cuales incluyen metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación y fosforilación de residuos específicos de los extremos amino y carboxilo terminal de las histonas con diferentes grados de modificación (40).

Las PTMs de las histonas, alteran la arquitectura de la cromatina, resultando en cambios en la estructura del nucleosoma y en la accesibilidad de la maquinaria de transcripción. Las modificaciones de las histonas pueden llevar a activar o reprimir la expresión de un gen dependiendo de que residuos son modificados y el tipo de modificación que se lleve a cabo (40)

En células troncales, reguladores de la expresión de genes linaje-específico se encuentran reprimidos pero “poised” con el fin de obtener una respuesta rápida al momento de la diferenciación. Estas áreas de cromatina se les denomina dominios bivalentes, los cuales poseen marcas opuestas, como son la trimetilación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) que está asociada con activación transcripcional, la cual es llevada a cabo por el complejo tritorax (SET1A/B, MLL) y la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) asociada con el silenciamiento transcripcional (42) realizada por el complejo Polycomb (PRC2/PRC1). Esta bivalencia juega un papel importante durante la diferenciación de las células troncales embrionarias y un papel decisivo en el momento de activar o reprimir la expresión del gen (42). En el estado bivalente, los estímulos activadores y los complejos represivos se equilibran entre sí en un equilibrio metaestable (denominado estado poised). La activación de TF en conjunto con las demetilinas H3K27 y las enzimas H2.A-desubiquitinasa (DUB) desplazan el equilibrio hacia la activación, eliminando los factores represivos y convirtiendo los loci bivalentes en genes activos. Por el contrario, la eliminación de los estímulos activadores que están presentes en niveles bajos de dominios bivalentes desplaza los genes a un estado reprimido, un proceso que requiere una fuerte actividad de la H3K4 demetilasa. La

trimetilación de H3K9 y la metilación de ADN pueden reforzar la represión (Figura 7) (43).

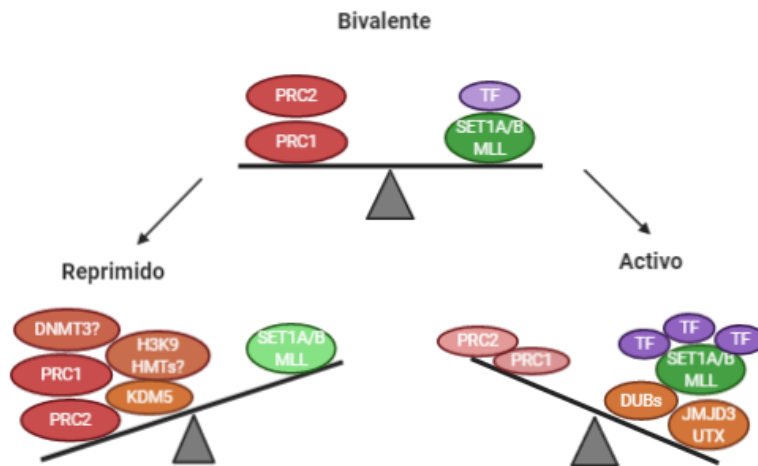


Figura 7. Bivalencia en la expresión génica. La bivalencia representa un equilibrio dinámico entre la activación y la represión que mantiene los genes en un estado plástico e inducible (43).

También se ha encontrado que las modificaciones en la estructura 3D de la cromatina también tienen un papel importante en la regulación epigenética. El genoma en interfase se encuentra en dominios asociados topológicamente (TADs) los cuales son las unidades estructurales y funcionales de la cromatina. Las TADs se forman gracias a proteínas como CTCF- cohesina, las cuales delimitan una TAD de otra, permitiendo así establecer límites y restringir la propagación de las marcas epigenéticas. Estudios en humanos indican que las interacciones entre TADs también se encuentran organizados en loops conectados llamados vecindades aisladas (“insulated neighbourhoods”), las cuales representan *clusters* de sub-TADs. En células troncales embrionarias “naive”, las cuales representan el estadio de preimplantación del blastocisto, y “primed”, que representan al blastocisto post-implantación que aunque bien sigan siendo pluripotentes tienen un bias hacia el ectodermo , son estados celulares cercanas, y las interacciones entre sub-TADs son estables. Sin embargo, cuando las células troncales se encuentran en diferenciación, estas interacciones de sub-TADs cambian drásticamente (44). Por lo que en conclusión todos estos hallazgos sugieren que diferentes mecanismos

epigenéticos participan en regular regulan las propiedades de autorenovación y pluripotencialidad de las células troncales cancerosas (42).

Papel de los miRNAs en las CTs

Dentro del control epigenético también se ha demostrado que los miRNAs son importantes en regular el desarrollo de las células troncales y tienen un papel crítico en el mantenimiento y la diferenciación de las células troncales (35). ¿Pero cómo los miRNAs regulan estas funciones?, para entenderlo describiremos como se sintetizan los miRNAs y como estos regulan postranscripcionalmente la expresión de casi el 60% de los transcritos que codifican para proteínas (45).

Biogénesis de los miRNAs y su papel en la regulación postranscripcional

Los microRNA son una clase de RNA no codificantes cortos los cuales participan en el control postranscripcional de la expresión de genes. Se estima que existen aproximadamente 2300 miRNAs en el humano (46), los cuales influyen en el control de la expresión de una gran parte del proteoma celular. Los miRNAs cumplen su función de regulación al inhibir la síntesis de proteínas, ya sea mediante represión postranscripcional que ocurre cuando el miRNA se une a su RNA mensajero (RNAm) blanco, promoviendo así la degradación del RNAm o mediante la inhibición de la traducción del RNAm blanco (45).

En el núcleo el miRNA se transcribe por la RNA polimerasa II como un precursor primario denominado pri-miRNA . Después este pri-miRNA es procesado por las enzimas DROSHA en complejo con DGCR8, esta última es una proteína de unión a RNA que mide el punto de corte, como resultado del corte se forma los precursores pre-miRNA los cuales tienen una estructura de horquilla de un tamaño aproximadamente de 65 nt. Posteriormente este precursor es reconocido y exportado al citosol por la proteína Exportina 5 (Exp5). En el citosol este pre-miRNA es procesado por DICER y se asocia con la proteína ARGONAUTA formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). A través del complejo RISC,

el miRNA maduro dirige el reconocimiento específico a su RNAm blanco. De esta forma induce el silenciamiento por la unión al sitio que se encuentra en la región no traducida 3' (3'-UTR) del RNAm blanco (47). Esta represión puede darse a través de tres mecanismos: 1) Inhibición del inicio de la traducción, 2) inhibición de la elongación en la traducción, 3) degradación del RNAm, que recluta complejos de deadenilación causando inestabilidad en el RNAm y su degradación (48). Mas recientemente se ha descrito que en muchos casos los miRNAs interactúan no solamente con la región 3' no traducida (3'UTR) de su mensajero blanco para inducir la degradación del mRNA o su represión traduccional. Sin embargo, interacciones del miRNA con otras regiones de su mRNA blanco que incluyen su región 5' UTR, la región codificadora y el promotor del gen han sido descritas (49).

miRNAs y células troncales

Para mantener el destino de las CTEs (células troncales embrionarias), es necesario la actividad conjunta de factores de transcripción y de miRNAs. Se han definido factores de transcripción que juegan un papel central en el mantenimiento y adquisición de troncalidad "stemnes", entre los que se encuentran Oct4, Sox2 y Nanog. Los cuales son factores de transcripción centrales capaces de activar los promotores de diversos miRNAs en CTEs, que incluyen a los *clusters* miR-290-295, miR-302/367 y miR-92, miR-106b-25 y miR-106a-363. Algunos de los cuales participan en regular el ciclo celular (miR-290-295) al facilitar la transición G1/S (34); promueven la pluripotencialidad (miR-302/367) y la diferenciación (miR206 y miR486) (Tabla II). Es decir que hasta ahora la función de los miRNAs en las células troncales puede clasificarse en tres mecanismos:

- 1) Participación en el mantenimiento de la autorenovación y pluripotencialidad a través de la inhibición de factores que controlan estos eventos;
- 2) iniciación de la diferenciación de las células troncales a través de la inhibición de factores de pluripotencia maestros;
- 3) mantenimiento de la definición de linaje por restringir la expresión de genes de otro linaje

Tabla II. miRNAs involucrados en la biología de las células troncales (34,35).

miRNA	Blanco	Efecto	Función
<i>clusters</i> miR-290-295	Ciclina D-CDK4/6, RB	Facilita transición G1/S	Autorenovación y proliferación
miR-20a	p21	Promueve transición G1/S	
miR-302	NR2F2	Expresión incrementada de Oct4	Pluripotencialidad y mantenimiento
miR-367	MECP1-p66, MECP2	Facilita la transcripción de genes pluripotentes	
miR-125a	Bak-1	Inhibición de apoptosis	
miR-124	Sox9, REST	Induce neurogénesis	Diferenciación
miR-1, miR-206 and miR-486	Pax7	Promueve la diferenciación a mioblastos y células satélite	
miR-203	p63	Promueve diferenciación epidermal , restringiendo el potencial proliferativo	

¿Pero cómo estos miRNAs realizan estas funciones?

El *cluster* miR-290, que consiste en los miRNAs miR-291a-3p, miR-291-3p, miR-294 y miR-295, se encuentran sobreexpresado en las mCTEs (células troncales embrionarias murinas) indiferenciadas de ratón, pero su expresión disminuye rápidamente durante la diferenciación. Las células troncales pueden entrar rápidamente a la fase S, ya que los miembros del *cluster* miR-290-miR-295 tienen como blanco a las ciclinas D-CDK4/6 y de manera indirecta regulan al complejo ciclina E-CDK2 (Tabla II) (34). regulando de esta forma una rápida transición G1/S en las mCTE (Tabla II). También el *cluster* miR-290-295 afecta el ciclo celular por disminuir la expresión de algunos inhibidores del ciclo celular tales como p21 y

Lats2, lo que promueve la transición de la fase G1 a S (50) Otra manera en la que está involucrado este *cluster* en las mCTEs es mediante la inhibición de la apoptosis ya que su blanco es la caspasa 2, la cual tiene funciones en la muerte celular inducida por estrés (34). En humanos el *cluster* de miRNAs 371/372/373 y su homólogo en ratón (miR290/295) se les conoce como miRNAs *enhancers* del proceso de reprogramación ya que promueven la expresión de los factores maestros de pluripotencia (Oct4, Sox2 y Nanog) (51).

Otros miRNAs que tienen un papel importante en la pluripotencialidad de las CTEs es el *cluster* miR-302-367, se encuentra altamente expresados en los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Este *cluster* disminuye la expresión de desmetilasas de lisina y proteínas de unión a CpG MECP1-p66 y MECP2, facilitando la transcripción de genes pluripotentes lo cual contribuye al mantenimiento de la pluripotencialidad en CTEs (34). El factor de transcripción Pax 7 tiene un papel central en la supervivencia, a la autorenovación y a la proliferación de las células satélites. Las células satélites disminuyen la expresión de Pax7 durante la diferenciación y una manera de regular este factor para la transición de estas células a células diferenciadas miogénicas es a través de miRNAs, entre ellos se encuentran los miRNAs -206 y 1, estos se inducen durante la diferenciación a mioblasto y regulan negativamente a el factor de transcripción Pax7, al unirse a la región 3'UTR de Pax7 (52).

Células troncales cancerosas características

Desde hace años se sabe que los tumores son masas celulares con un crecimiento anómalo, que causan invasión y destrucción de órganos y tejidos. Sin embargo, la masa tumoral está constituida por una población altamente heterogénea de células en diferentes etapas de diferenciación (52). Esto tienen un impacto muy importante en esta enfermedad, ya que se ha demostrado que los pobres resultados que se obtienen después del tratamiento contra el cáncer se deben a que estos provocan un enriquecimiento de una pequeña subpoblación de células, denominadas células troncales cancerosas (CTCs), las cuáles son resistentes a la quimioterapia y

promueven la metástasis por lo que se considera son las responsables de la recurrencia del tumor (54). Además, se ha demostrado que las CTCs que sobreviven a los tratamientos eventualmente dan lugar a nuevos tumores en los sitios primarios o metastásicos.

Dependiendo del microambiente, una subpoblación de CTCs son quiescentes, lo cual las protege de los agentes quimioterapéuticos que se dirigen a las células en división activa (54). Alternativamente, una subpoblación de CTCs puede dividirse y generar células hijas que dan lugar a todos los tipos de células que se encuentran en un volumen particular del tumor, y / o generar células hijas que no se diferencian, pero mantienen el potencial completo de diferenciación como célula madre original (auto-renovación). De esta forma, la capacidad de auto-renovación mantiene el número de CTCs dentro del tumor, mientras que su progenie constituye la mayor parte del tumor (54).

Las CTC son más resistentes que las células troncales normales a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia porque tienen niveles de expresión más altos de proteínas antiapoptóticas, transportadores ABC y genes de resistencia a múltiples fármacos (55). Estas células residen en un nicho, un microambiente hipóxico / necrótico específico que incluye diferentes tipos de células (cada una con propiedades metabólicas distintas), como las células fibroblásticas, inmunes, endoteliales y perivasculares, así como componentes de la matriz extracelular, citocinas y factores de crecimiento. En este entorno, los CTC protegen y reprograman su metabolismo y responden al metabolismo de las células circundantes, aumentando el crecimiento tumoral y preservando la plasticidad fenotípica (56) La inducción y el mantenimiento de los fenotipos CTC están relacionados con más de 20 factores de transcripción diferentes, incluidos NF- κ B y los factores inducibles por hipoxia (57,58). Además, las CTC ajustan su metabolismo a su microambiente mediante la adquisición de fenotipos metabólicos intermedios o el cambio de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) al efecto de la glucólisis /Warburg. Los CTC también se caracterizan por un alto flujo autofágico, que está involucrado en la resistencia al estrés del microambiente, como la hipoxia

(59). Por lo tanto, se supone que la autofagia desempeña un papel importante en la resistencia a la terapia anticancerígena relacionada con las CTC (60).

Otra diferencia entre las CTC y las células troncales normales involucra la composición del nicho. Los nichos de las troncales normales, CT, son supresivos al tumor, ya que consisten de varias vías de señal activadas para arrestar el crecimiento. En contraste, el nicho de las CTC incluye fibroblastos asociados al cáncer que estimulan el crecimiento de las CTC y su diferenciación a través de la secreción de factores de crecimiento o activación de vías de supervivencia a través de interacciones célula-célula.

miRNAs y su papel en las vías de señalización en las CTC

Existen diversas vías de señalización que participan en la biología de las CTC, entre ellas se encuentran vías que pueden estar activadas o inactivadas para estimular o inhibir el desarrollo de las CTCs. Entre las que estimulan la formación de CTCs están la activación de la vía Wnt/ β catenina, la cual al promover la dediferenciación permite que las células adquieran el fenotipo de CTC; la activación de ciclina D1, STAT3, y la vía de señalización Notch, promoviendo características como autorenovación; o la inactivación de PTEN, lo que promueve una mayor capacidad de formación de esferas y mayor capacidad de autorenovación. Con respecto a la inhibición en el desarrollo de CTC están: la inhibición de ADAM, encargado de la proteólisis de ligandos de Notch, llevando a la inactivación de la vía de Notch y promoviendo la diferenciación de las células; la activación de la vía de las caspasa promoviendo la muerte celular; la inhibición de BM1 que lleva a la pérdida de autorenovación; y la inhibición de mTOR, cuya actividad es importante para autorenovación (61). En conjunto existen varias vías que pueden llevar al desarrollo de CTCs, entre los mecanismos que regulan estas vías están los miRNAs, ya que sus mensajeros blancos son participantes de estas vías descritas (Figura 8).

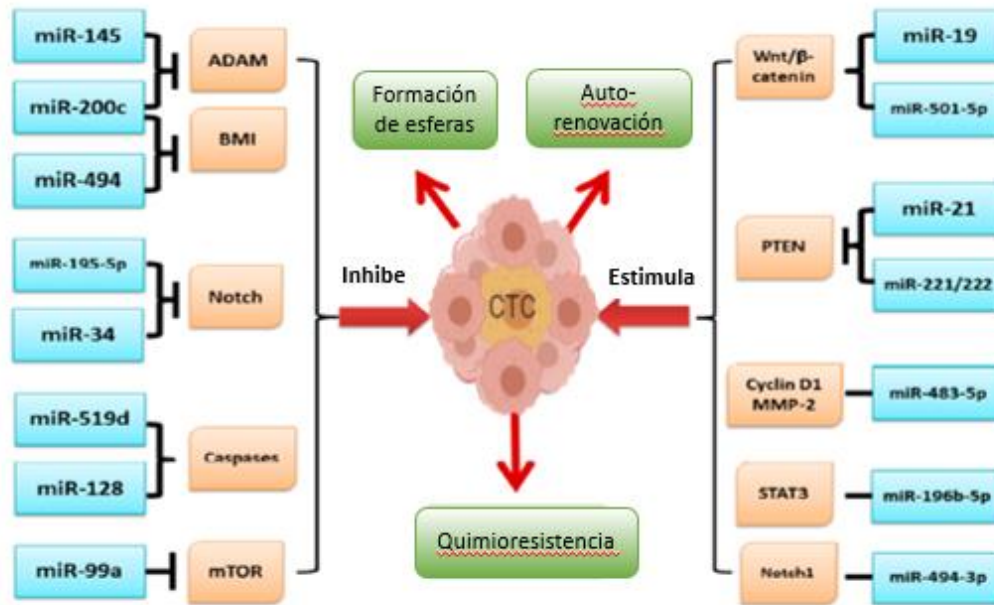


Figura 8. miRNAs que regulan características de células troncales cancerosas (CTCs), a través de la regulación de diversas vías de señalización. Los miRNAs pueden estimular o inhibir las CTC dependiendo de los mensajeros que tengan como blanco (61).

También los miRNAs pueden modular/desregular la expresión de genes funcionales y de sus productos los cuales pueden estar asociados a vías de señalización los cuales son esenciales para el mantenimiento, crecimiento y función de las CTCs, tales como Wnt/ β catenina y Notch, entre otros (61).

Se han descrito diversos miRNAs que regulan características de las CTC por tener blancos participantes en diversas vías de señalización, estos miRNAs pueden actuar como supresores o activadores de características de células troncales tales como autorenovación, formación de esferas, recurrencia, migración, invasión y quimio y radio resistencia. Entre estos miRNAs se encuentran los que tienen como blanco la vía de señalización Wnt/ β catenina, algunos ejemplos son miR-19, miR-501-5p y miR-744 los cuales al estar aumentados activan β -catenina, por lo que es translocado al núcleo y promueve la expresión de genes tales como MDR1 y Survivina, promoviendo de esta manera la resistencia a la quimio y radioterapia. Por el contrario, el aumento en la expresión de miR-708-5p y miR-142-3p inhibe la activación de β -catenina y previene que se acumule en el citoplasma. Otra vía de

señalización que es blanco de miRNAs es la vía AKT/PI3K/PTEN, cuyos tres miRNAs miR-221/222, miR-21 y miR-106b-5p inhiben la función de PTEN, promoviendo la activación de la vía AKT/PI3K; en donde el miR-21 estimula directamente la activación de AKT/PI3K, promoviendo la auto-regulación, mientras que en contraste el miR-128 inhibe su activación. Finalmente, el miR-106b actúa en la vía TGF- β a través de Smad promoviendo el fenotipo EMT. Por el lado de la vía de Notch la disminución del miR-200c estimula su activación, promoviendo características de las CTCs como autorenovación. Otra vía de señalización asociada con el desarrollo de las CTC es la vía JAK/STAT. El aumento de miR-196-5p y miR-500a-3p y la disminución miR-218 estimula la activación de STAT3 y puede llevar al desarrollo de características como invasión. Además, la inhibición de miR-136 estimula al desarrollo de las CTCs como resultado de la activación de diversas proteínas que incluyen NF- κ B, survivina, ciclina D1 y Bcl2, promoviendo la supervivencia de las CTCs, otro miRNA que activa NF- κ B es miR-155, lo que lleva la activación de factores pluripotententes como Sox2 y factores EMT como Snail. Como podemos observar las características de las células troncales pueden ser estimuladas o inhibidas por la regulación de los mensajeros mediante miRNAs (Fig.9)

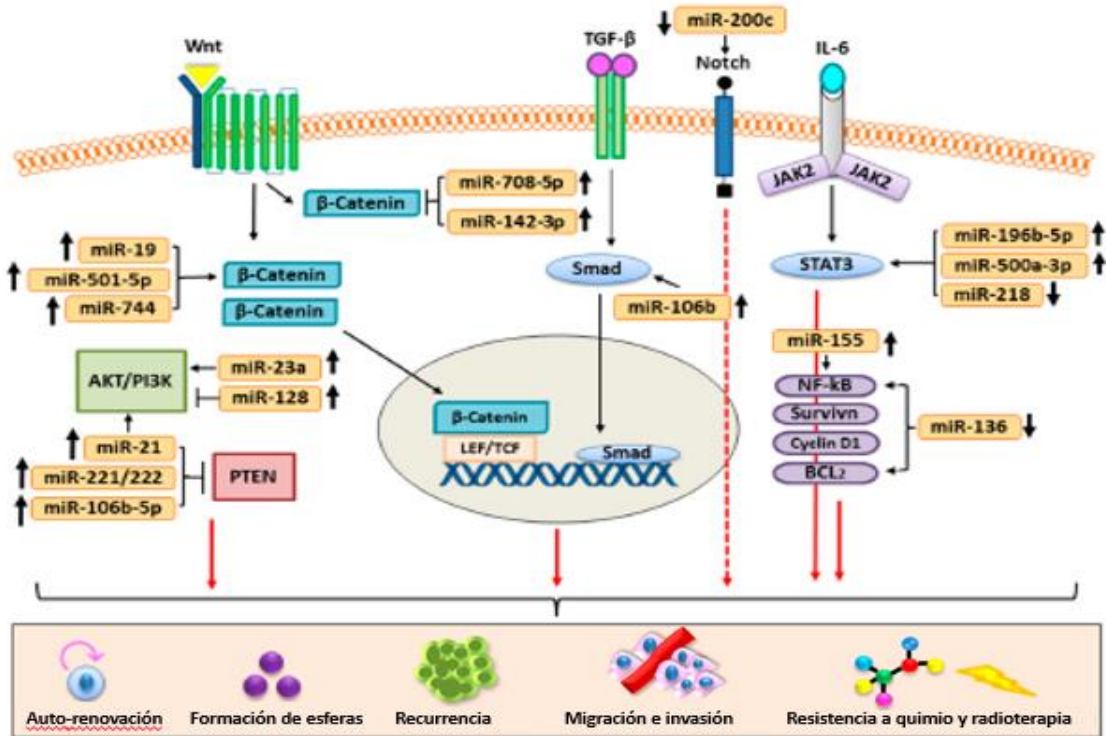


Figura 9. Mecanismo general de regulación de vías de señalización mediante miRNAs en células troncales cancerosas. Los miRNAs pueden regular diversas propiedades de las CTCs (61).

miRNAs diferencialmente expresados en las CTCs

Mediante la caracterización de los perfiles de miRNAs que se encuentran en las CTCs comparados con células cancerosas o poblaciones de células troncales provenientes del mismo tejido, se ha podido determinar que existe un patrón específico de miRNAs que se encuentran tanto sobreexpresados o disminuidos en CTCs. Este patrón varía dependiendo del tejido de origen (35), como se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Lista de miRNA que regulan la agresividad del tumor, invasión y propiedades de las CTC (35).

Sobreexpresado en tumores agresivos y CTC		Disminuido en tumores agresivos y CTC	
miRNA	Tipo de cáncer	miRNA	Tipo de cáncer
miR-130b	Hígado	miR-125b	Glioma
miR-17-92	Leucemia	miR-200s	Pulmón, ovario, corazón, cuello, hígado, páncreas, mama.
C19MC	Tiroides, mama	let-7	Pulmón, mama, hígado, y cuello
miR-371-373	Hígado, tiroides, Mama	miR-34	Páncreas, estomago, glioma, Próstata
		miR-145	Sarcoma Ewing

Además, se han identificado algunos miRNAs, entre los cuales destaca la familia let-7, que regulan las propiedades de auto-renovación y diferenciación de las CTC. La familia let-7 desempeña una función supresora de tumores y está reprimida en muchos tipos de tumores incluido el cáncer de mama. En el tejido normal let-7 participa en regular la auto-renovación y actúa como un miRNA pro-diferenciación, ya que la disminución de let7 conlleva a la sobreexpresión de oncogenes como MYC, RAS, HMNGA2 y BLMP1 (34). También se han identificado otros miRNAs que regulan negativamente a los factores maestros de la pluripotencia como miR145. La sobreexpresión del cual al estar dirigido al RNAm de Klf4, Sox2 y Oct4 promueve que la célula troncal salga de su estado pluripotente e induce la diferenciación

El factor esencial para capacidad de auto-renovación, Bmi1 es regulado por miR-200, de tal forma que la represión de la expresión miR-200 en CTCs, conduce al aumento de la expresión de Bim1 que a su vez suprime los genes codificados en el locus Ink4a, p16Ink4a y p19Arf encargados de regular, el ciclo celular, la senescencia y la apoptosis.

Otros miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados en las CTCs, es la familia miR-17-92. Estos miRNAs se caracterizan por tener como blancos RNA

mensajeros que codifican para proteínas involucradas en la replicación del ADN, en la regulación del ciclo celular y en la transcripción del RNA. También la familia miR-34a, b y c, están implicados en el control del ciclo celular, su expresión se encuentra disminuida en diferentes tipos de cáncer incluyendo adenocarcinomas, cáncer de colon y cáncer de hígado. Por ejemplo, miR-34a, induce el arresto celular en la fase G1/S1 y también promueve apoptosis vía caspasa 3, por lo que aumenta la sensibilidad a tratamientos anti-cáncer. Importantemente, mir-34a también reprime la expresión de genes pluripotentes como NANOG, SOX2 y MYC (34).

Células troncales cancerosas pancreáticas

Recientemente, la comprensión de la carcinogénesis pancreática ha mejorado y se han sugerido algunas nuevas opciones terapéuticas. Por ejemplo, se ha demostrado que FOLFIRINOX, un régimen de quimioterapia compuesto por cuatro medicamentos (ácido folínico, 5-fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino) o nab-paclitaxel más gemcitabina proporciona un beneficio de supervivencia sobre la gemcitabina sola (62). Sin embargo, todavía estamos lejos de tener una esperanza de vida sustancialmente mejor para los pacientes, ya que estas nuevas opciones terapéuticas aumentan la supervivencia media en solo unos pocos meses.

Un creciente cuerpo de evidencia sugiere que la resistencia a los medicamentos y la metástasis de ACDP están influenciadas principalmente por la presencia de células madre cancerosas pancreáticas (paCTC).

Las CTC pancreáticas, descritas por primera vez en 2007 (63), representan menos del 1% de todas las células de cáncer pancreático (64). Las paCTC pueden identificarse mediante marcadores de superficie, como CD133, CD24, CD44, ESA / EpCAM (antígeno epitelial específico), c-Met, ALDH1, DclK1, CXCR4 y Lgr5. Sin embargo, todavía falta una firma universal (57,65).

Las principales vías de señalización de las paCTC, que son esenciales para la autorrenovación, son el proceso de transición de epitelio a mesenquimales (EMT), y la resistencia a las terapias convencionales incluye Wnt/ β -catenina, Sonic

Hedgehog (SHH) y Notch. Además, se ha demostrado que otros aspectos biológicos, como la autofagia, la proteína M1 de caja de horquilla (FoxM1), diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), Bmi-1, NODAL / ACTIVIN, NF- κ B y PTEN, están implicados en paCTC actividad.

Es importante destacar que las paCTC coexisten con otros componentes celulares y no celulares que constituyen el microambiente tumoral (incluidos los fibroblastos asociados con el cáncer, las células estrelladas pancreáticas y los macrófagos asociados con el tumor). Comprender la relación entre paCTC y todos estos componentes es extremadamente importante para mejorar el conocimiento de la biología de paCTC (62). Recientemente, se ha demostrado que las paCTC tienen un *cross-talk* altamente dinámico con las células parenquimatosas ACDP (66) necesarios para el inicio y mantenimiento de la infiltración y metástasis del ACDP. En particular, el secretoma de las paCTC inhibe paracrinamente el crecimiento de las células parentales y estimula autocrinamente su propio crecimiento y vascularización, mientras que el secretoma de las células parentales inhibe paracrinamente el crecimiento de las paCTC y autocrinamente inhibe su propio crecimiento. Está claro que, para tener un impacto sustancial en el cáncer de páncreas, es necesario erradicar las paCTC con terapias dirigidas (66,67).

miRNAs presentes en células troncales de cáncer de páncreas

Sin embargo, a pesar de la importancia que tiene las paCTC, hasta la fecha solamente dos trabajos han sido realizados con el propósito de identificar el perfil de miRNAs presentes en las paCTC. Uno de estos trabajos fue ejecutado por el grupo de Young Song en el 2011 y otro más reciente, por Zhacong Yang (68,69). En ambos trabajos, obtuvieron el miRNoma de las de las páncreo-esferas. El primero mediante microarreglos y el segundo mediante secuenciación masiva. Sin embargo, en ambos trabajos el haber obtenido el perfil de miRNAs a partir de páncreo-esferas, (las cuales están constituida minoritariamente por las células troncales <20% y el resto por células no troncales), condujeron a que los miRNAs

identificados no correspondan solamente a los miRNAs presentes en las células troncales, sino que en su mayoría estos miRNAs provienen de las células no troncales. Por lo que entonces, en este trabajo planteamos obtener el perfil de miRNAs a partir de solamente las células troncales cancerosas con la idea de que este conocimiento en un futuro ayude en el diseño de mejores estrategias que ayuden a la erradicación de las paCTC.

JUSTIFICACIÓN

Los miRNAs poseen un papel importante en las células troncales cancerosas, ya que participan en la proliferación, diferenciación y formación de tumores. Por lo que el desarrollo de terapias dirigidas hacia las CTC mediante el uso de estos miRNAs sería de gran utilidad ya que permitiría prevenir recurrencias.

HIPÓTESIS

Existen microRNAs que se encuentran diferencialmente expresados en las células troncales cancerosas pancreáticas

OBJETIVO GENERAL

Identificar el perfil de miRNAs (miRNoma) de células troncales cancerosas pancreáticas provenientes de la línea celular PANC-1.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Enriquecer a la población de células troncales cancerosas mediante la formación de esferas.
- 2) Verificar la presencia/enriquecimiento de células troncales cancerosas en el modelo de esferas.
- 3) Aislar las células troncales cancerosas pancreáticas.
- 4) Caracterizar a las células troncales cancerosas aisladas a partir de esferas.
- 5) Identificar los miRNAs que se encuentren expresados diferencialmente en las paCTCs mediante microarreglos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia Experimental

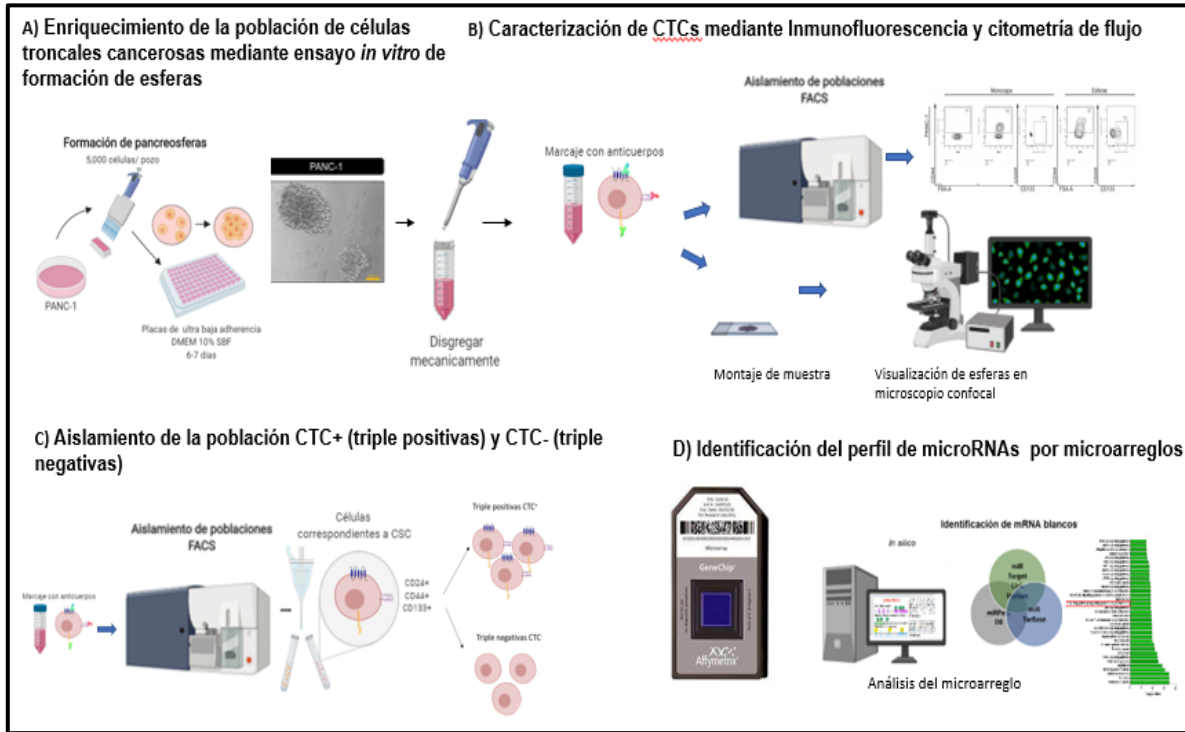


Figura 10. Estrategia experimental empleada en este proyecto. **A)** Para identificar los miRNAs que se encuentran involucrados en la regulación de CTCs primero se enriqueció la población de CTCs mediante la formación de esferas a partir de la línea celular pancreática cancerosa PANC-1. **B)** Se verificó el enriquecimiento de las CTCs presentes en las esferas mediante la presencia de marcadores de superficie específicos de CTC como: CD44, CD133 y CD24 mediante Inmunofluorescencia y citometría de flujo. **C)** Para aislar a las CTC presentes en las esferas se utilizó la técnica de FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) empleando nuevamente los tres marcadores de superficie previamente descritos. Una vez que se obtuvieron las CTCs se extrajo su RNA y se realizaron RT-qPCR para saber si factores *stemness* Oct4, KLF4 y Sox2 estaban enriquecidos en esta subpoblación de células. **D)** La caracterización del perfil de microRNAs se realizó mediante el uso del microarreglo miRNA 4.0 y para su análisis se utilizó el programa “Transcriptome Analysis Console” (TAC) y mediante el análisis de *Gene Ontology* se identificaron los procesos biológicos regulados por los miRNAs.

Cultivo celular de la línea cancerosa pancreática PANC-1

La línea celular PANC-1(ATCC® CRL-1469™) se utilizó para la obtención de las CTC porque esta línea (proveniente de un adenocarcinoma localizado en la cabeza del páncreas metastásica), es capaz de formar tumores en ratones desnudos atímicos y páncreo-esferas (70,71). Brevemente, la línea celular PANC-1, se creció en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D-5030), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco 10437028) a una concentración final del 10% y en presencia de 1X de penicilina/estreptomicina (100x) (Gibco, 10378016).

Formación de “páncreo-esferas”

Diversos métodos para la obtención de páncreo-esferas han sido descritos (71,72). Por lo que, para obtener las esferas, que nos permitiera enriquecer a las células troncales cancerosas en este trabajo, se empleó el protocolo descrito por Ishiwata y que a continuación describiremos (73). Brevemente, la línea celular PANC-1 se cultivó en placas P100 (Corning® 430167), hasta obtener una confluencia del 80%. Posteriormente se descartó el medio y se realizó un lavado con PBS 1X (137 mM de NaCl, 27 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄), para posteriormente tripsinizar las células durante 5 minutos a 37°C con 2 mL de Tripsina EDTA (BIOWEST L0931-500). Después, se inactivó la tripsina con 5ml de medio DMEM (suplementado con SFB). Las células se recuperaron en un tubo de 15mL, y se centrifugaron a 1500 rpm por 5min. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en un mililitro de medio DMEM (SFB 10%), del cual se tomaron 10µl de la suspensión y 90µl de azul de tripano (dilución 1:10), y se realizó el conteo de células con ayuda de una cámara de Neubauer.

Para la obtención de las esferas. Se colocaron 5000 células de PANC-1 por pozo en una placa de 96 pozos de ultrabaja adherencia (Sigma CLS3474) y a cada pozo

se le adicionaron 200µl de medio DMEM. Una vez sembradas las células, se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 7 días. Para permitir que las esferas crecieran más se optó por transferir las esferas a placas de P60 (Corning® 430166) con 3mL de medio DMEM nuevo y se incubaron nuevamente a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 7 días más.

Detección de marcadores de superficie específicos a CTCs

Una vez obtenidas las esferas se procedió a aislar las CTCs, presentes en ellas. Para esto se emplearon distintos marcadores de superficie que han sido asociados a un fenotipo de células troncales cancerosas en cáncer de páncreas, tales como CD24, CD44, y CD133, (72) mediante la técnica de citometría de flujo. Brevemente, se recolectaron las esferas en tubos de 50mL, se centrifugaron a 1500rpm por 5min, se descartó el sobrenadante, y el botón se resuspendió en 1 mL de PBS y las células se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 1500rpm por 5 min. Nuevamente las células se lavaron con 1 mL de PBS 1X y se centrifugaron a 1500rpm por 5 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y al botón de células se le añadió 1mL de TrypLE™ Express Enzyme (Gibco™ 12605010) por cada millón de células para disgregar las esferas y se incubó durante 20min. Durante este tiempo cada 5 min se pipetearon las esferas para facilitar la disgregación. Concluidos los 20 min la muestra se centrifugó a 1500rpm por 5min. Se descartó el sobrenadante, y el botón celular se lavó con 1 mL PBS1X y las células se resuspendieron con pequeños golpes al tubo. Las células se bloquearon con 1 mL de PBS-SFB 3% por 20 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 µL de la mezcla de anticuerpos (anti-CD24 (BD, 555427), anti-CD44 (BD, 555479), anti-CD133 (Miltenyi, 130-113-106) y DAPI (Invitrogen, D3571) diluidos en PBS 1X con SFB al 1.5%. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se agregó 1 mL de PBS 1X para lavar las células con agitación suave, este paso se repitió dos veces y se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos para obtener el botón celular.

Antes del análisis en el citómetro, las células se filtraron en una membrana con poro de 40 micrómetros para retirar las células aglomeradas y evitar problemas con el sistema de fluidos del citómetro. El conteo celular se realizó en el citómetro BD FACSCanto™ II. Los datos se analizaron en el software *FlowJo* v10, donde se determinó el porcentaje de la población CD24⁺CD44⁺CD133⁺, correspondiente a las paCTC. Los resultados se graficaron en el software *GraphPad Prism* v6.01 (*GraphPad Software*, San Diego, CA), donde se representó la media±SEM de dos replicas biológicas.

Inmunofluorescencia en páncreo-esferas

Con el fin de comprobar el enriquecimiento de CTCs dentro de las páncreo-esferas se realizaron ensayos de inmunofluorescencia por emplear los anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie CD24, CD44 y CD133. Para lo cual se recolectaron las páncreo-esferas en tubos de 15 mL y para evitar disgregar a las esferas estas se dejaron sedimentar durante 5 minutos. Posteriormente, se recuperó el botón en 1 mL PBS/frío y se trasladaron a tubos de 1.5 mL, las esferas se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Concluida la incubación se procedió a lavar tres veces las esferas con PBS 1X (cada lavado se realizó con pequeños golpes al tubo y dejando sedimentar por 5 minutos entre cada lavado). Después las esferas se bloquearon con PBS1X-BSA 3% por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se marcaron las esferas con anticuerpo acoplado con fluoróforo por 20 minutos a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche, después se realizaron lavados con PBS (2 veces por inversión por 5 minutos), se marcaron con DAPI (300nM) y se incubó por 10min a temperatura ambiente, después se realizaron 2 lavados con PBS Tween 0.05% durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se realizó un último lavado con PBS1X durante 5 minutos para eliminar el exceso del Tween. Finalmente, las esferas se montaron en portaobjetos siliconizados y se llevaron a la Unidad de

imagenología- IFC, UNAM, para su observación en el microscopio confocal Zeiss LSM 800. Las imágenes se capturaron utilizando el objetivo 10X.

Aislamiento de poblaciones mediante Fluorescencia de clasificación de células activadas (FACS)

Una vez que corroboramos que las esferas tenían células troncales pancreáticas, procedimos a aislar a la población de células que tuvieran los tres marcadores (triples positivas) CD24⁺, CD44⁺, CD133⁺ o células troncales, así como a las células que carecen de estos tres marcadores de superficie denominadas células triple negativas o no troncales mediante la técnica de FACS. El FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*) es un tipo especializado de citometría de flujo, que ordena una población de células en subpoblación utilizando etiquetado fluorescente. Al igual que la citometría de flujo convencional, se recopilan los primeros datos FS, SC y fluorescentes. A continuación, la máquina aplica una carga (negativa o positiva) y un sistema de desviación electrostática (electroimanes) que facilita la recolección de gotas cargadas que contienen células en tubos apropiados. El FACS es una técnica de elección para purificar las poblaciones de células de fenotipo conocido, es el método preferido cuando se requiere una alta pureza de la población deseada (74).

Brevemente, las páncreo-esferas fueron dissociadas enzimáticamente con 1mL de TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco12605010) para disgregar a las células que constituyen a las esferas y se incubaron 20min a temperatura ambiente procurando pipetear a las esferas cada 5 min para facilitar la disgregación. Después de este tiempo las células se centrifugaron a 1500rpm por 5min, se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con 1mL de PBS1X y después se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Hecho lo anterior se procedió a bloquear con 1mL PBS 1X-SFB 3% por 20 minutos a temperatura ambiente. Después las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-CD133-APC, anti-CD24-FITC, anti-CD44-PE por 30min a temperatura ambiente y 1µl de

anticuerpo por cada millón de células, a una dilución de 1:100 y DAPI (300nM) (Tabla IV). Transcurrida la incubación, la muestra se centrifugó a 1500rpm por 5min, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1mL de PBS. Los controles incluyeron células sin teñir que fueron empleadas para tener un control de autofluorescencia (autofluorescencia), perlas con solo un anticuerpo primario (compensación), y células sólo con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo). Esta tinción permite discernir entre las células muertas y las células vivas.

Tabla IV. Anticuerpos primarios conjugados

Anticuerpo	Isotipo	Fluorocromo acoplado	Marca/ n° de catalogo	Dilución
CD133/1 (AC133)-APC, Human	Ratón IgG1κ	APC (aloficocianina)	Miltenyi Biotec/ 130-113-106	1:100
FITC Mouse Anti-Human CD24	Ratón IgG2a, κ	FITC (isocianato de fluoresceína)	BD Pharmingen™/ 555427	1:100
PE Mouse Anti-Human CD44	Ratón IgG2b, κ	R-ficoeritrina (PE)	BD Pharmingen™/ 555479	1:100

Después, las muestras se filtraron al hacerlas pasar por tela organza con el fin de separar las células, después se transfirieron a la máquina de FACS (FACS Aria II BD Biosciences 643180, Tabla V) y se recuperaron las células en tubos para citometría de 5ml. Durante el procedimiento de citometría de flujo, se excluyeron todas las señales positivas para DAPI. Al igual se utilizaron los parámetros “forward scatter” (FSC) “side scatter” (SSC) altura, anchura y mediciones de área para excluir todas las células potencialmente apoptóticas. Células individuales y vivas fueron analizadas y aisladas mediante FACS por las señales CD133, CD24 y CD44. Las células se recuperaron en tubos de citometría para su extracción del RNA (74).

Tabla V. Configuración de láseres y filtros del citómetro FACS Aria II

Laser	Azul (488 nm)					Rojo (633 nm)		Violeta (407 nm)	
	530/30	576/26	610/20	695/40	780/60	670/30	780/60	450/40	530/30
Ejemplo de fluorocromo	<u>FITC</u> CFSE GFP AF 488	<u>PE</u> AF 555	<u>PE/</u> <u>Tx Red</u>	<u>PerCP</u> PE Cy5 PECy5.5 7AAD	<u>PE Cy7</u>	<u>APC</u> AF 647	<u>APC Cy7</u> APC/AF 750 APC/H7	<u>P. Blue</u> AF 405 DAPI	<u>Pacific</u> <u>Orange</u> BV 510
→									

Evaluación de la capacidad tumorigénica de las paCTC

Para determinar si las paCTC recuperadas a partir de las líneas celulares de PANC-1 tienen capacidad para generar tumores se realizó un ensayo de xenoinjerto en ratones de la cepa NOD/SCID. Estos experimentos fueron realizados de acuerdo a los lineamientos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL, CINVESTAV. Ciudad de México, México) y a los estándares marcados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio". El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la UPEAL, CINVESTAV (número de aprobación: 0258-17).

Este ensayo se realizó de la siguiente manera. Brevemente, las esferas fueron disgregadas con 1 mL TrypLE Express a 37°C por 20 minutos hasta obtener células individuales. Se generaron 4 grupos de ratones macho de 5-6 semanas de edad de la cepa NOD/SCID, los cuales fueron inoculados con 1,000, 5,000, 10,000 y 50,000 paCTC por vía subcutánea utilizando agujas de grosor 25G. Después de la inoculación, los ratones fueron examinados 3 veces por semana monitoreando el crecimiento tumoral. Los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y una vez recuperados los tumores se enviaron al Laboratorio de Histología y Microscopía Confocal del INMEGEN donde realizó la inclusión en parafina y los análisis histológicos.

El crecimiento tumoral se graficó en el software GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA), donde se representó la media \pm SEM de los tumores analizados.

Extracción de RNA

A partir de la población de células triple positivas (CD24⁺, CD44⁺, CD133⁺) y triple negativa (CD24⁻, CD44⁻, CD133⁻), se extrajo el RNA total por emplear el reactivo de Trizol (Tiocinato de guanidino-fenol-cloroformo) (Invitrogen™, 12034977). Este reactivo permite la recuperación del RNA, DNA y proteínas a partir de la misma muestra (75). Las células triple positivas se recuperaron en tubos de citometría en medio DMEM (SFB 10%, Pen/Estr 1%), y se centrifugaron por 10 min a 1500rpm a temperatura ambiente. Concluida la centrifugación se retiró el medio y al botón se le añadió 200uL de Trizol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se recuperó la mezcla en tubos de 1.5mL y a este se le añadió 40µl de cloroformo (0.2mL de cloroformo por cada 1mL de Trizol). La mezcla células-trizol y cloroformo se homogeneizó con la ayuda del vortex por 15 segundos y se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Después de esto la muestra se centrifugó a 12,000g a 4°C durante 45 minutos lo que permitió obtener una fase acuosa superior en donde se encontraba el RNA y una fase orgánica inferior que contenía a las proteínas y al DNA. Se recuperó la fase acuosa y el RNA fue precipitado por añadir 100µl de isopropanol y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente la muestra se centrifugó a 12,000g (~11100rpm) a 4°C durante 45 minutos. El botón obtenido se lavó con 200µl de etanol al 70-80% (1mL de etanol por cada 1mL de Trizol) y la muestra se centrifugó durante 10 min a 10,000 g a 4°C. Concluida la centrifugación se retiró el sobrenadante y el botón se dejó secar al aire. Finalmente, el RNA se resuspendió en agua DEPC (75).

Cuantificación de RNA

Se determinó el rendimiento del RNA obtenido mediante su cuantificación en un espectrofotómetro a una longitud de onda 260nm y 280nm. Esto nos permitió conocer la pureza y su concentración. La muestra de RNA con una buena pureza deberá tener una relación 260/280 por encima de 1.8. Las mediciones se realizaron en el Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, el cual permitió realizar la cuantificación y la evaluación de la pureza del RNA.

Integridad del RNA

Posteriormente la integridad del RNA se verificó por medio de geles de agarosa desnaturizante de acuerdo con el protocolo descrito por Kyes S (76). Para lo cual se preparó un gel de agarosa al 1.2%, por pesar 0.36g de agarosa, los cuales se disolvieron en 30mL de buffer TBE 1X, preparado con agua DEPC. Al mismo tiempo, se pesaron 118 mg de tiocianato de guanidina, los cuales se disolvieron en 1 ml de agua DEPC, de los cuales se tomaron 150 µl para adicionarlos a la agarosa previamente fundida para que este reactivo nos quede a una concentración final de 5 mM. Posteriormente esta mezcla (agarosa/TBE/isocianato de guanidina) se vertió en un molde y el gel se dejó reposar durante 1 hora antes de correr las muestras.

Por otra parte, 2ug de RNA se mezclaron con un volumen igual de formamida (Relación 1:1). La muestra se incubó a 65°C durante 2 minutos y se centrifugó a 12,000rpm 1 minuto. Finalmente, la muestra se cargó en los pocillos del gel de agarosa y en un pocillo libre se colocó buffer de carga para poder seguir la migración de las muestras en el gel. El gel se corrió empleando las siguientes condiciones: 110 Volts durante 15 minutos y posteriormente se corrió a 80 Voltios empleando TBE 1X como buffer de corrida. Una vez que concluyó la migración de la muestra, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.5 ug /ml) durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo se lavó el gel con TBE 1X. Finalmente, el gel se observó en el transiluminador o fotodocumentador para evaluar la integridad del RNA (76).

Síntesis de cDNA

Para evaluar la expresión de los factores de transcripción maestros de la pluripotencialidad Oct4, Klf-4 y Sox-2 en las muestras de las poblaciones triple positivas (CTC⁺) y triples negativas (CTC⁻) se realizaron ensayos de RT-qPCR, para lo cual inicialmente se procedió a realizar la síntesis del cDNA, de acuerdo al siguiente protocolo.

Primero eliminamos las trazas de DNA contaminante que pudieran contener las muestras de RNA obtenidas. Por lo que se realizó el tratamiento con DNAasa I libre de RNAasa a 2 µg de RNA total, al que se le agregó agua DEPC a un volumen final de 43 µL, después se agregaron 5 µL de buffer de DNasa 5X y 2 µL de *DNase I RNase free* (1 U/µL) (Thermo Fisher, EN0521). La reacción se mezcló suavemente y se incubó en baño María a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregó 1 µL de DNasa (1 U/µL) y se incubó por otros 30 minutos más a 37°C, para garantizar una completa degradación del DNA. Para detener la reacción se agregaron 5.5 µL de perlas con inactivador de DNasa (Ambion, am1907) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Después, la muestra se centrifugó a 3,000 rpm durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante que contiene el RNA libre de DNA en un eppendorf nuevo. Posteriormente, se cuantificó el RNA procurando mantenerlo siempre en hielo. Después a los 200ng de RNA tratado con DNasa I, se le agregaron 1.5µl de oligo – dT 0.5ug/uL, 1.25L de dNTPs 10mM (concentración final 0.5mM) y se incubó a 70°C durante 5 minutos. Después de este tiempo el vial se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente a esta muestra se le agregaron 2.5µl de DTT 0.1M, 5µl de Buffer 5X y la reacción se llevó a un volumen final de 25µl con agua DEPC. Esta mezcla se incubó a 42°C por 2 minutos. Para sintetizar el cDNA, se agregó 1µl de la enzima SuperScript II (Invitrogen™, 18064014) y se incubó la mezcla a 42°C durante 90 minuto y posteriormente a 70°C durante 5

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

PCR cuantitativa (Sybr Green)

Para conocer el nivel de expresión de los transcritos de Klf4, Sox2 y Oct4, utilizando como templado el cDNA obtenido a partir de las células triple positivas y negativas se realizaron ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), empleando oligonucleótidos específicos para cada transcrito (Tabla VI).

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando *Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems, 4367659). Para cada reacción se utilizaron 2 µL de cDNA a una concentración de 50 ng/µL (concentración final de 100 ng/µL), 0.4 µL del mix de oligonucleótidos (10 mM), 5 µL de *Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X* y 2.6 µL de agua inyectable. Se realizaron 3 réplicas técnicas por corrida y 3 réplicas biológicas para tener una significancia estadística. Para cada reacción se consideró un control negativo el cual contiene todo lo anterior excepto el cDNA. Las reacciones de qPCR se corrieron en el equipo *StepOne™* (Applied Biosystems). Las condiciones de corrida fueron: 95°C por 10 minutos para activar la enzima, 40 ciclos de: 95°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos, y posteriormente la curva de disociación. Finalmente, para cuantificar los niveles de expresión se utilizó el método de DDCt (77). Para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

1) $DCt = Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del gen housekeeping}$ (GAPDH en todos los casos)

2) $DDCt = DCt \text{ de la muestra problema} - DCt \text{ de la muestra control}$

3) 2^{-DDCt}

Para representar los resultados, se utilizó el software GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA), donde se representó la media±SEM.

Tabla VI. Oligos usados para realizar la PCR cuantitativa de factores de transcripción.

Factor de transcripción	Oligo Forward	Oligo Reverse
SOX-2	TACAGCATGTCCTACTCGCAG	GAGGAAGAGGTAACCCACAGGG
F OCT-4	GCAGCGACTATGCACAACGA	CCAGAGTGGTGACGGAGACA
KLF4	GCAATATAAGCATAAAAGATCACCT	AACCAAGACTCACCAAGCACCC

Caracterización del perfil de miRNAs mediante microarreglo

Una vez aislada la población de CTCs se extrajo el RNA total, mediante la extracción por Trizol como se describió previamente. Una vez obtenido el RNA de las células triple negativas y positivas se cuantificó y se resuspendió en 8µl a una concentración final de ~80ng/µl. Todo este material se llevó a la Unidad de Microarreglos en el INMEGEN. El microarreglo que se utilizó para el desarrollo de este proyecto fue el de GeneChip™ miRNA 4.0 Array (Thermo Fisher Scientific, 902412). Este microarreglo permite evaluar la expresión de múltiples miRNAs de forma paralela al cuantificar por niveles de fluorescencia la hibridación entre la sonda y el miRNA de interés. De esta manera se obtuvo un perfil del miRNoma perteneciente a las células troncales pancreáticas. El GeneChip™ miRNA 4.0 Array cuenta con todos los miRNAs maduros del miRBase Release 20, los cuales son 30424 miRNAs maduros, y posee información sobre los genes blancos validados de los miRNAs. Para este estudio se utilizaron dos muestras independientes de CTCs y dos muestras independientes de CTC negativas.

Las reacciones empleadas se describen a continuación

Se utilizaron 130 ng de RNA los cuales se llevaron a un volumen final de 8µl con agua libre de RNAsas (vial 11). A esta muestra se le agregaron 2µl de oligo control (vial 8) y se colocó en hielo. Al mismo tiempo y de manera independiente en otro tubo se diluyó el mix de ATP (vial 3) en 1mM de Tris a 1:500. Hecho lo anterior en

un tubo nuevo libre de RNAsas se mezclaron los reactivos mostrados en la tabla VII para obtener un *master mix*.

Tabla VII. Master Mix para adición de PoliA a los miRNAs.

Componente	Volumen por arreglo miRNA
Buffer 10X (vial 1)	1.5µl
MnCl ₂ 25nM (vial 2)	1.5µl
Mezcla ATP (vial 3 diluido previamente)	1.0 µl
Enzima PAP (vial 4)	1.0µl

Este *master mix* fue empleado para realizar una reacción en donde se le agregó una cola de poliA a los miRNAs en su extremo 3'. Para esto a los 5 µl de este *master Mix* se le agregaron 10 µl de RNA/oligo control para tener un volumen de 15 µl, todos los reactivos se mezclaron suavemente y se centrifugaron. Posteriormente esta mezcla se incubo a 37°C por 15 minutos, de tal manera que ahora este tubo contenía el RNA con cola poliA en su extremo 3'. Después a estos miRNAs poliadenilados se les ligó una sonda de DNA marcada con biotina. Para ello se agregó a la muestra de miRNAs 4 µl de *Flash Tag Biotin HSR Ligation Mix* (vial 5) y 2 µl de T4 DNA ligasa (vial 6). Todos estos reactivos se mezclaron suavemente y se centrifugaron. Después, se incubó a 25°C por 30 minutos y se detuvo la reacción agregando 2.5 µl de *HSR Stop Solution* (vial 7). Los 23.5 µl de la muestra de RNA que ahora tiene ya ligada la sonda con biotina se mezcló y se centrifugó. Esta mezcla permaneció en hielo mientras que los componentes de la tabla VIII alcanzaran la temperatura ambiente para preparar el *master mix* de hibridación. Una vez que los reactivos alcanzaron la temperatura ambiente estos fueron agregados al tubo que contenía la mezcla (23.5µl) del RNA/sonda con biotina en el orden como se muestra en la tabla VIII .

Tabla VIII. Master mix de hibridación.

Componente	Volumen por arreglo	Concentración final
RNA/ sonda con biotina	23.5	
Mix Hibridación 2X	66 μ l	1X
Formamida 27.5 % (vial 12)	19.2 μ l	4%
DMSO	12.8 μ l	9.7%
Controles de hibridación 20X	6.6 μ l	1X
Oligo control B2 3nM	2.2 μ l	50 pM
Agua libre de nucleasas	3.7 μ l	
Volumen total	134.0 μ l	

Realizada esta mezcla la muestra se incubó a 99°C por 5 minutos y concluida la incubación se colocó dentro del arreglo. Se cubrió el arreglo con 1/2" *Tough-Spots* para minimizar la evaporación y prevenir que se secase la muestra. El microarreglo se colocó dentro de un horno de hibridación modelo 640 (*Affymetrix*) en donde se incubó a 48°C y a 60 rpm de 16 a 18 horas. Después de este tiempo de incubación se removió el arreglo del horno. Se retiró el *cocktail* de hibridación y se transfirió a un tubo nuevo para su almacenamiento a -80°C. El arreglo fue equilibrado a temperatura ambiente con *Array Holding buffer* antes de su lavado y tinción. Para realizar el proceso de tinción y lavado el microarreglo se colocó en una estación de fluido y se continuó con el protocolo que se describe en la tabla IX.

Tabla IX. Protocolo de lavado y tinción del microarreglo.

	Protocolo
Lavado post hibridación 1	10 ciclos de 2 mezclas /ciclo con Wash buffer A a 30°C.
Lavado post hibridación 2	6 ciclos de 15 mezclas/ciclo con Wash Buffer B a 50°C.
Tinción 1	Tinción del arreglo por 5 minutos con Cóctel de tinción 1 a 35°C.
Lavado post tinción	Lavado por 10 ciclos de 4 mezclas/ciclo con Wash Buffer A a 30°C.
Tinción 2	Tinción del arreglo por 5 minutos con Cóctel de tinción 2 a 35°C.
Tinción 3	Tinción del arreglo por 5 minutos con Cóctel de tinción 1 a 35°C.
Lavado final	15 ciclos de 4 mezclas/ciclo con Wash buffer A a 35°C.
Holder Buffer	Colocar en el arreglo Array Holder Buffer.

Después del lavado y tinción de las sondas del arreglo, se procedió a su lectura en un escáner de microarreglos modelo 3000 7G con *autoloader* y estación de trabajo (Affymetrix).

Para el análisis de los datos y para conocer la expresión diferencial de los miRNAs se utilizó el programa “Transcriptome Analysis Console” para el análisis de los resultados del microarreglo y se utilizaron los siguientes parámetros para el análisis de los datos: Fold Change ≥ 2 o < 2 , p-value < 0.001 y FDR < 0.005 . Este análisis tiene como objetivo encontrar los genes diferencialmente expresados que sean

estadísticamente significativos. En este caso TAC cuenta con Limma que es un método paramétrico que usa modelos lineales bayesianos empíricos (78). Con ello se hicieron gráficos para visualizar los miRNAs candidatos que son diferencialmente expresadas. Estos gráficos (*heatmap* y gráfica de volcán) se obtuvieron a través de la plataforma TAC.

Validación de miRNAs en población CTCs

Se realizó PCR cuantitativa (Sybr Green) para la validación de los miRNAs que se encuentran expresados diferencialmente en las CTCs.

A partir del RNA obtenido de las CTCs obtenidas de las esferas (como previamente se describió), se obtuvo el cDNA. Con estos cDNAs, se realizaron ensayos de RT-qPCR de acuerdo al protocolo descrito por Busk P. Este método se basa en adición de colas de poly (A) a las secuencias de los miRNAs y la transcripción reversa con el uso de un “primer” poly (T), de una qPCR empleando dos “primers” específicos para cada miRNA (79).

Para la adición de la cola de poly(A) se utilizó la polimerasa poly (A) de *E. coli* en conjunto con su buffer de reacción de *E.coli* polimerasa poly (A). Para la formación de cDNA a partir del RNA se utilizó la transcriptasa reversa M-MuLV y un oligo universal : RT-“primer” 5' CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTT TTVN, donde **V** se refiere a los nucleótidos A, C y **N** a los nucleótidos A, C, G, y T. A esta mezcla se le añade la muestra de RNA (10pg a 100ng) y se lleva a un volumen de 10µL con agua libre de RNAsa. Se incubó por 1hr a 42°C. Los componentes de la reacción se adicionaron en el orden y cantidades descritas en la Tabla X. Una vez concluida la reacción se inactivo la transcriptasa reversa por incubarla a 95°C por 5 min. Finalmente, el cDNA resultante fue diluido entre 4 a 8 veces en agua libre de RNAsas (80). La PCR cuantitativa se realizó como se describió anteriormente.

Tabla X. Componentes para la transcripción reversa de miRNA

Componente	Concentración	Volumen por reacción
Buffer poly A polimerasa	10X	1 μ l
Adenosina trifosfato ATP	1 mM	1 μ l
RT primer	10 μ M	1 μ l
dNTP mix (<i>Stratagene</i> , USA)	1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP	1 μ l
Transcriptasa reversa (<i>New Englands Biolabs</i> , USA)	200 U/ μ l	0.5 μ l
Poly A polimerasa (<i>New Englands Biolabs</i> , USA)	5000 U/mL	0.2 μ l
Agua	-	

Diseño de “primers”

Después de que se obtuvo el cDNA de las células triple positivas, así como el de las células triples negativas se realizó un ensayo de PCR cuantitativo con SYBR Green para amplificar los miRNAs presentes en nuestras células. Se utilizaron pares de “primers” específicos para los miRNAs identificados en los microarreglos realizados en este trabajo. El diseño de los *primers* se realizó de acuerdo con las reglas descritas por Balcells I. en el 2011 (79) y por emplear el software miRprimer

v2.0. De acuerdo con Balcells I., se siguieron los siguientes pasos para el diseño de los “primers”(79,80):

1. Se eliminaron todas las A's del extremo 3' de la secuencia del miRNA hasta que la mayoría de las bases fueran C, G, o T.
2. Se diseñó el “primer forward” lo más largo posible (12-20 bases) dejando al menos 4 bases al final del 3' para el diseño del “primer reverse”, donde se tomaron en cuenta los siguientes criterios:
 - A. El “primer” incluye un residuo A o T en las dos bases cercanas al extremo 3'.
 - B. El “primer” incluye uno o dos residuos A o T en las tres bases cercanas al extremo 3'.
 - C. El “primer” incluye dos o tres residuos A o T en las cinco bases cercanas al extremo 3'.
3. Se calculó la Tm mediante el método “nearest neighbor” con una concentración de 115mM de NaCl.
4. Si la Tm del “primer forward” era menor a 59°C, se añadieron uno a uno las bases G, A, C, G, y C al extremo 5' del “primer”, hasta llegar a una Tm de 59°C.
5. Si la Tm del “primer forward” era mayor a 59°C se removieron uno a uno bases del extremo 5' hasta alcanzar una Tm de 59°C.
6. Se eligió el “primer reverse” más largo posible (4-8 bases) que no fuera complementario al extremo 3' del “primer forward”.
7. Se eligió el “primer reverse” con el mejor extremo 3' de acuerdo con los criterios del paso 2.
8. Se añadieron 15 residuos T al extremo 5' del “primer reverse”.
9. Calcular la Tm del “primer reverse” como en el paso 4.
10. Si la Tm del “primer reverse” era menor a 59°C, se añadieron uno a uno las bases G, A, C, C, T, G, G, A, y C al extremo 5' del “primer”, hasta llegar a una Tm de 59°C Finalmente, también se empleó un “primer” para amplificar el RNA RNU6

(RNA, U6 Small Nuclear), el cual fue diseñado para normalizar la reacción durante la tesis de maestría de Alvarez L. en el 2018 (81). La tabla con los oligos empleados en este trabajo se describen en la Tabla XI.

Tabla XI. Oligos de los miRNAs que se utilizaron para amplificar los 11 miRNAs identificados en este trabajo.

miRNA	Forward	Reverse
miR-24-3p	AGTGGCTCAGTTCAGCA	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTTC
miR-103a-3p	GCAGAGCAGCATTGTACAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCATAG
miR-320a	CAGAAAAGCTGGGTTGAGA	CAGTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCCCT
miR-26a-5p	GCAGTTCAAGTAATCCAGGAT AG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGC
miR-107	GCAGAGCAGCATTGTACAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGATAG
miR-93-5p	GCAAAGTGCTGTTCGTG	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCTACCT
miR-15b-5p	GCAGTAGCAGCACATCA	CCAGTTTTTTTTTTTTTTGTAAACCA
miR-196a-5p	GCAGTAGGTAGTTTCATGTTG T	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCCCA
let-7a-5p	GCAGTGAGGTAGTAGGTTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACTAT AC
let-7c-5p	GCAGTGAGGTAGTAGGTTGT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACCA
let-7e-5p	GCAGTGAGGTAGGAGGTTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACTAT AC
let-7d-5p	CGCAGAGAGGTAGTAGGTTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACTAT G

Evaluación de blancos mediante programas predictivos (*In silico*)

Hasta la fecha existen un gran número de programas para la predicción de los RNAm blancos para un miRNA en particular. Entre los que se encuentran: *TargetScan*, *PicTar*, *miRanda*, *PITA* y *RNA22*. Al mismo tiempo se han establecido

bases de datos que recolectan información de blancos experimentales y blancos validados, como son *TarBase* y *miRecords*. Para este proyecto se utilizaron dos bases de datos (miR TarBase y TarBase 8.0) para identificar blancos probables y corroborar los datos arrojados por TAC. Otro análisis que se realizó fue el enriquecimiento de vías a través del programa *KEGG Pathway*, esto con el fin conocer cuáles son los miRNAs involucrados en vías relacionadas con la biología de las células troncales cancerosas.

Para identificar si algunos de los miRNAs identificados en este trabajo tenían como blanco el RNAm de genes maestros de la Pluripotencia empleamos la matriz desarrollada por Yanni Ma. 2015 (82). Esta matriz permite predecir si un miRNA tienen como blanco factores de transcripción asociados a pluripotencia. Además de que estas interacciones (miRNA-FTpluripotente), fueron validadas experimentalmente.

Finalmente, para evaluar las interacciones entre miRNA y mRNA se utilizó el programa *TargetScan Release 7.2*, programa que predice los blancos biológicos de miRNAs mediante la búsqueda de la secuencia del mRNA blanco complementaria a la región semilla de cada miRNA (83).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa *GraphPad Prisma 6.01*. La correlación estadística de los datos entre los grupos fue analizada por análisis de varianza de una cola (ANOVA) o por la muestra de T de student según fuera el caso.

RESULTADOS

El cáncer de páncreas más común es el ACDP, el cual es una neoplasia infiltrante, casi siempre mortal, refractaria a los tratamientos convencionales y, en consecuencia, tiene una tasa de supervivencia de tan solo cinco años en el 8% de los pacientes. Además de que los pacientes rara vez presentan síntomas. Por lo tanto, el diagnóstico temprano de este tumor es muy difícil. De hecho, la mayoría de los pacientes son diagnosticados cuando se han producido eventos metastásicos o cuando la enfermedad está muy avanzada. Actualmente, la cirugía junto con la quimioterapia o la radioterapia son los principales tratamientos, aunque ninguno de ellos presenta resultados satisfactorios (84) ya que la enfermedad puede persistir o reaparecer con metástasis locales y distantes. La mayoría de los pacientes sometidos a resección del tumor mueren por metástasis a los cinco años de tratamiento (85). En lo que respecta a la gemcitabina (un análogo de pirimidina), a pesar de su baja eficacia, fue la estrategia quimioterapéutica de primera elección para el combate contra el ACDP avanzado durante muchos años (86). Esta quimioterapia resultó ser efectiva en tan solo el 23.8% de los casos de ACDP (87) debido principalmente al denso estroma tumoral y a la escasa difusión del fármaco aunado a el posterior desarrollo de quimiorresistencia a esta droga (88). Recientemente, la comprensión de la carcinogénesis pancreática ha mejorado y se han sugerido algunas nuevas opciones terapéuticas. Por ejemplo, se ha demostrado que FOLFIRINOX, un tratamiento de quimioterapia compuesto por cuatro fármacos (ácido folínico, 5-fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino) o nab-paclitaxel más gemcitabina proporciona un beneficio de supervivencia en comparación con el empleo de solamente la gemcitabina (62). Sin embargo, todavía estamos lejos de tener una esperanza de vida sustancialmente mejor para los pacientes, ya que estas nuevas opciones terapéuticas aumentan la supervivencia media en tan solo unos pocos meses.

Recientemente se ha demostrado que células madre cancerosas juegan papeles críticos en la resistencia a tratamiento contra el cáncer y son responsables de la metástasis en varios tumores malignos humanos, incluyendo ACDP (54). Las CTC

son células tumorales inmortales que se encuentran en tal solo el 1% de las células que constituyen la masa tumoral que tienen la capacidad de autorrenovarse, producir progenie diferenciada, formar tumores en ratones y formar esferoides no adherentes llamados esferas tumorales *in vitro* (54). Por lo que entonces, está claro que, para tener un impacto sustancial en el cáncer de páncreas, es necesario erradicar las paCTC. Por esta razón, una caracterización molecular completa de las CTC pancreáticas es fundamental. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a la biología CTC en otros tipos de cáncer están comenzando a ser entendidos. En este contexto, se ha encontrado que para otros tipos de cánceres los microRNA (miRNA) ocupan un lugar destacado ya que participan activamente en el mantenimiento y diferenciación de las CTC regulando de esta forma la funcionalidad de esta población de células (61). Por lo que entonces el objetivo de este trabajo consistió en la identificación de los microRNAs presentes en las CTC pancreáticas con la finalidad de que en un futuro este conocimiento permita el desarrollo de terapias dirigidas hacia esta pequeña población de células

Obtención de páncreo-esferas

Una herramienta importante para el desarrollo de este trabajo consistió en obtener las paCTC a partir de la línea celular PANC-1, la cual ya ha sido reportado es capaz de formar esferas y tumores en ratones inmunodeficientes (89). Sin embargo, un obstáculo importante en la investigación de las CTCs es la obtención de un número suficiente de células por lo que decidimos implementar un método que nos permitiera enriquecerlas. El ensayo de formación de esferas es un método *in vitro* comúnmente utilizado para identificar CTC y estudiar sus propiedades(90), ya que ha sido demostrado que las CTCs, tienen la habilidad de proliferar y formar esferas (estructuras tri-dimensionales) cuando se crecen en condiciones no adherentes, mientras que las células no troncales mueren por *anoikis* (91). Por esta razón se cultivaron 5000 células/ pozo de la línea celular PANC-1 durante 7 días en una placa de ultra baja adherencia de 96 pozos (Figura 11A).

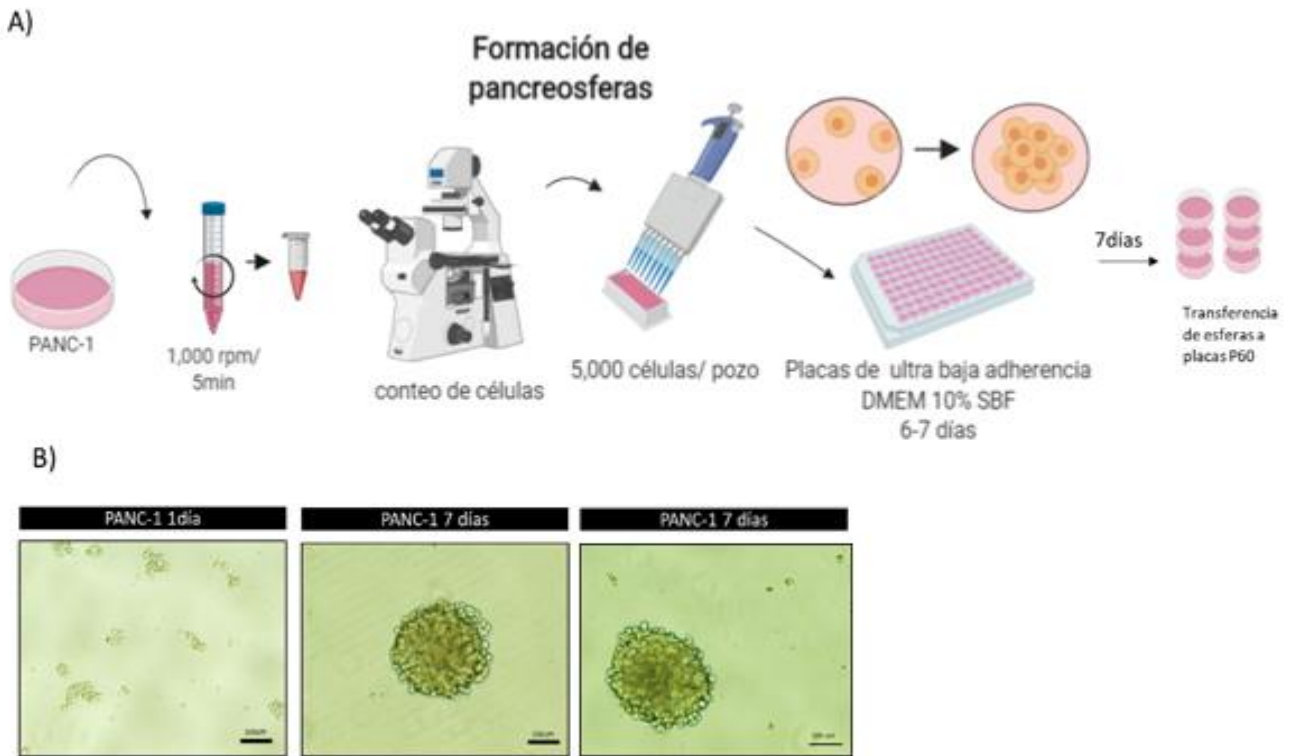


Figura 11. Obtención de páncreo-esferas. A) Esquema con los pasos para la obtención de páncreo-esferas **B)** Imágenes representativas del primer día de cultivo en comparación a 7 días de cultivo (10X).

Como se aprecia en la figura 11B, la mayoría de las células formaron esferas en cultivo en suspensión, y estas esferas empezaron hacer evidentes a los 3 días hasta convertirse en grupos más grandes alcanzando su máximo tamaño a los 7 días (Figura 11B)

Enriquecimiento de las CTCs obtenidas de las páncreo-esferas

Las CTCs de páncreas (paCTC), se pueden identificar y aislar gracias a la presencia de marcadores de superficie bien definidos tales como $CD24^+CD44^+CD133^+$ (92). Por lo que entonces para saber si las esferas obtenidas tenían células troncales pancreáticas enriquecidas con las proteínas de superficie CD44, CD24 y CD133 (de aquí en adelante denominadas triple positivas), se realizaron ensayos de IFA. Para los cual las esferas se incubaron con los anticuepos conjugados contra α -CD44-PE, α -CD133-APC, α -CD24-FITC y se visualizaron en el microscopio

confocal. Un ejemplo representativo de estas IFAs, se observa en la figura 2 en donde se aprecia la señal de CD44 (en amarillo), la de CD133 (en rojo), y la de CD24 (en verde), y al realizar el empalme de las tres señales (amarillo) se aprecia que estos receptores colocalizan principalmente en el centro de la esfera (indicado por la flecha), lo que sugiere que en las esferas existen células triple positivas que pudieran corresponder a células paCTC-like (Figura 12).

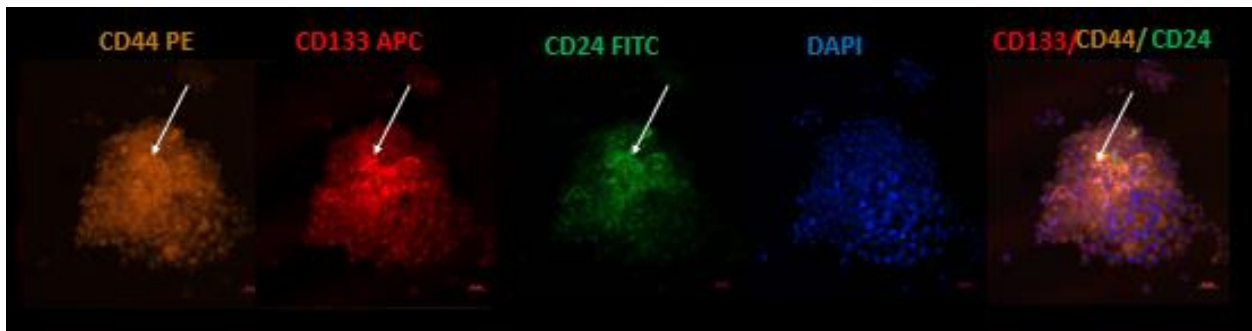


Figura 12. Inmunofluorescencia de esferas provenientes de la línea celular PANC-1. Marcados con anticuerpos conjugados (CD44-PE, CD133-APC, CD24-FITC). La flecha indica la región dentro de la esfera en donde esta enriquecida la subpoblación triple positiva.

Otra manera de averiguar si las esferas obtenidas a partir de la línea PANC-1 realmente tenían células triple positivas y además averiguar si hubo un enriquecimiento de estas células en la esfera en comparación con el cultivo 2D es a través de un análisis de citometría de flujo. Para ello nuevamente se realizó el marcaje de las células contenidas en las esferas con los anticuerpos (α -CD44-PE, α -CD133-APC y α -CD24-FITC), así como el de las células PANC-1 crecidas en monocapa (2D). Estas células se pasaron a través de un citómetro para identificar a las células que presentaban estos tres marcadores de superficie. En la figura 13A se observa los *plots* obtenidos en la línea celular PANC-1 crecida en monocapa. Inicialmente se seleccionaron a las células positivas a CD44 (17.2%) y a partir de esta población de células se seleccionaron a las células que presentaban en su superficie los marcadores CD133 y CD24. Para de esta forma obtener las células triple positivas la cuales se encontraron en un porcentaje de 0.27 %. Por parte, las

células provenientes de las esferas al igual que en la monocapa, se seleccionaron inicialmente a las células CD44⁺ (23.1%) y a partir de esta población se seleccionaron a las células CD133⁺ y CD24⁺, obteniendo así a las triples positivas. Las cuales en la esfera constituían el 13.3 % (Figura 13A). Por lo que este dato claramente indica que en las esferas hubo un enriquecimiento de las paCTCs (13.3%), con respecto a las células triple positivas obtenidas del cultivo 2D de PANC-1 (0.27%) de hasta de 49.5 veces como se muestra en el histograma (Figura 13B). Lo que indica que en las esferas obtenidas a partir de la línea celular PANC-1 tenemos células triple positivas que podrían corresponder a las paCTC-like

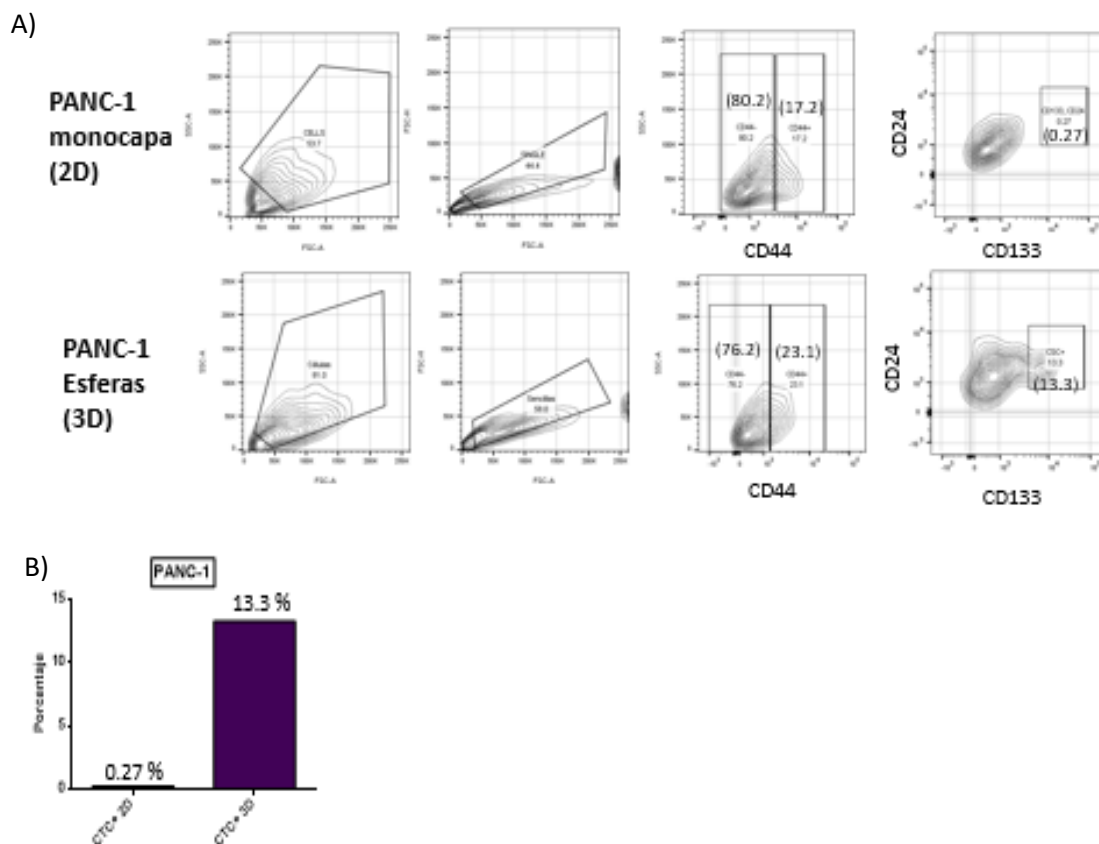


Figura 13. Citometría de flujo de células obtenidas de esferas y de monocapa a partir de la línea celular PANC-1. A) Se muestran los “gates” de las dos condiciones, PANC-1 en monocapa y PANC-1 de esferas, demostrando un enriquecimiento de las triples positivas (CD44, CD133, CD24) en las células derivadas de las esferas B) Gráfica de barras representando el porcentaje de células triple positiva obtenidas en las esferas con respecto a las células crecidas en 2D.

Aislamiento de paCTCs mediante FACS

Una vez que confirmamos el enriquecimiento de las paCTCs a partir de las esferas y con el objetivo de poder identificar a los miRNAs presentes en esta población de células procedimos a aislar y purificar a las paCTC mediante la técnica de FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*). Para lo cual las células obtenidas de las esferas se marcaron con los anticuerpos (α -CD44-PE, α -CD133-APC y α -CD24-FITC) conjugados con fluoróforos. Las células marcadas se llevaron a Centro Médico para realizar el *sorting* con la ayuda del citómetro FACS Aria IIu. Después de haber realizado el *sorting*, se recuperaron a las células triple positivas que representan a las paCTCs⁺-like y a las células triple negativas (no- paCTC-like), las cuales se usaron para obtener el RNA. En la Figura 14A se muestra una imagen representativa del *gate* FSC vs SSC que fue empleado para excluir células muertas y *debris*. Mientras que en la figura 14B se muestra como a partir de las células que conformaban las esferas inicialmente se seleccionó la población CD44⁺ (23.1%) y a partir de ella las células positivas para CD133 y CD24, obteniendo de esta forma a la población triple positiva (13.3%). Por otra parte, y a partir de la misma muestra también se obtuvo a la población negativa a CD44-(76.2%) y a partir de esta, se seleccionaron a las células negativas a CD133 y CD24, para recuperar a las células triples negativas (79%).

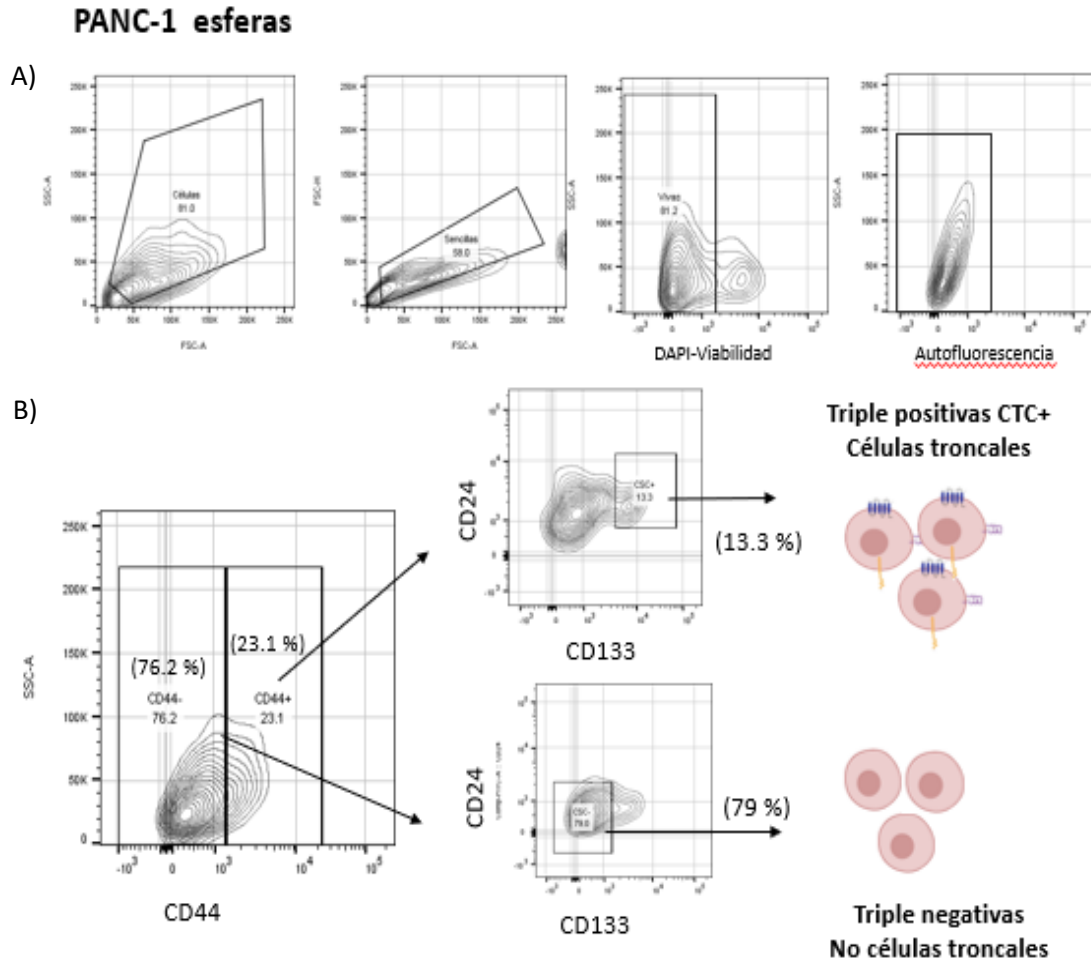


Figura 14. Aislamiento mediante FACS, para obtener las poblaciones triple positivas (CD44+, CD133+ y CD24+) y triple negativas (CD44-, CD133- y CD24-). A) Se muestran los gates para la selección de las células, y los *gates* para controles de viabilidad y autofluorescencia B) Selección y porcentaje de las células triple positivas y triple negativas.

Tumorigenicidad *in vivo*

Para evaluar la capacidad de iniciación tumoral de las células triple positivas y triple negativa obtenidas de las esferas se intentó inocularlas en diferentes cantidades en ratones desnudos NOD/SCID. Sin embargo, debido a que después del *sorting* las células no eran viables decidimos inocular diferentes cantidades de células provenientes de las esferas. Para lo cual 1,000, 5,000, 50,000 y 100,000 células

provenientes de las esferas se inyectaron subcutáneamente en el flanco derecho del ratón, mientras que las células adherentes de Panc1 se inocularon en el flanco izquierdo. Después de 12 semanas de su inoculación, las células provenientes de las esferas de Panc1 dieron lugar a tumores de 2000-3000 mm a partir de las 5,000, 10,000 y 50,000 células (Figura 15). Consistentemente, el tamaño del tumor fue proporcional al número de células inoculadas (Figura 15). En contraste, los ratones que fueron inoculados con las células de PANC-1 provenientes de un cultivo 2D, no se observó la formación de ningún tumor (Figura 15). Esto no fue tan inesperado ya que en el laboratorio se ha demostrado que la cantidad mínima de células de PANC-1 crecidas en 2D necesarias para generar un tumor es de al menos 1,000,000 de células. Por lo que entonces estos resultados sugieren que las células obtenidas a partir de las esferas tienen una mayor tumorigenicidad *in vivo* que las células adherentes de PANC-1 (Figura 15).

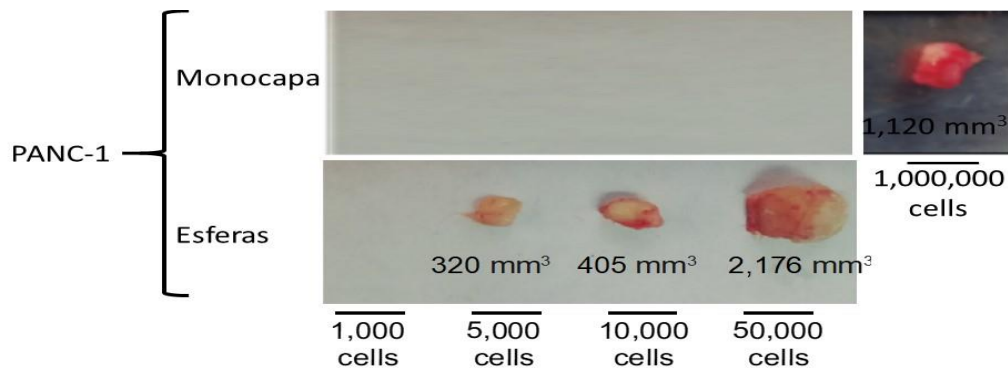


Figura 15. Ensayo de tumorigenicidad in vivo a partir de células provenientes de esferas. Las células obtenidas de las esferas presentaron una mayor capacidad de iniciación tumoral que las células crecidas en monocapa.

Aislamiento del RNA de las células Triple positivas y triple negativas

Con el objetivo de conocer la expresión diferencial de miRNAs entre las células triple positivas con respecto a las triple negativas, inicialmente se obtuvo el RNA total de ambas poblaciones, así como el RNA obtenido a partir de la línea celular PANC-1 crecida en monocapa y se migró en un gel desnaturizante de agarosa para

verificar su integridad. Como se observa en la Figura 16, se aprecian la presencia de dos bandas las cuales corresponden al RNA ribosomal 28S y 18S, lo que nos indicó que la muestra de RNA era de buena calidad, y que podía ser utilizada para los ensayos de RT-qPCR.

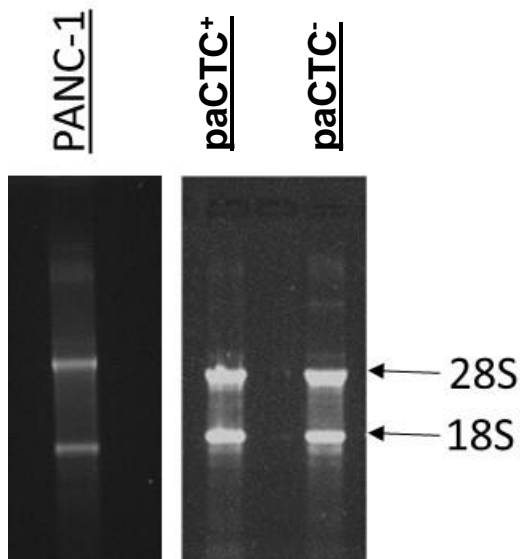


Figura 16. Imagen que muestra la integridad de las muestras del RNA usado. En flechas se indica las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S.

Las paCTC⁺ presentan una mayor expresión de factores de transcripción (SOX-2, KLF4 y OCT4) asociados a pluripotencia

Una vez obtenido nuestro RNA y antes de proceder a realizar los microarreglos para identificar los miRNAs presentes en las células *paCTC-like*, quisimos averiguar si tres factores de transcripción como Oct4, Sox2y Klf4, claves para la inducir la pluripotencia y cuya expresión se encuentra elevada en las CTs (93), estaban incrementados en las células paCTC⁺ pero no en las no-paCTC⁻ ni en las células obtenidas a partir de un cultivo 2D de PANC-1 mediante ensayos de RT-qPCR.

Para lo cual, estos RNAs fueron tratados con DNAasa I libre de RNAsas y posteriormente cada uno de ellos se utilizaron para obtener el cDNA de cada una

de las tres diferentes células para finalmente llevar a cabo los ensayos de RT- qPCR para estos tres factores de transcripción. Como esperábamos las células *paCTC-like* pero no en las *no-paCTC* ni en las células obtenidas de un cultivo 2D de PANC-1 presentaron una mayor expresión de estos factores de transcripción, Por lo que, considerando los resultados obtenidos con el *sorting*, los tumorigénicos y los de RT-PCR nos sugieren fuertemente que las células *paCTC-like* poseen fenotipo de células troncales (Figura 17).

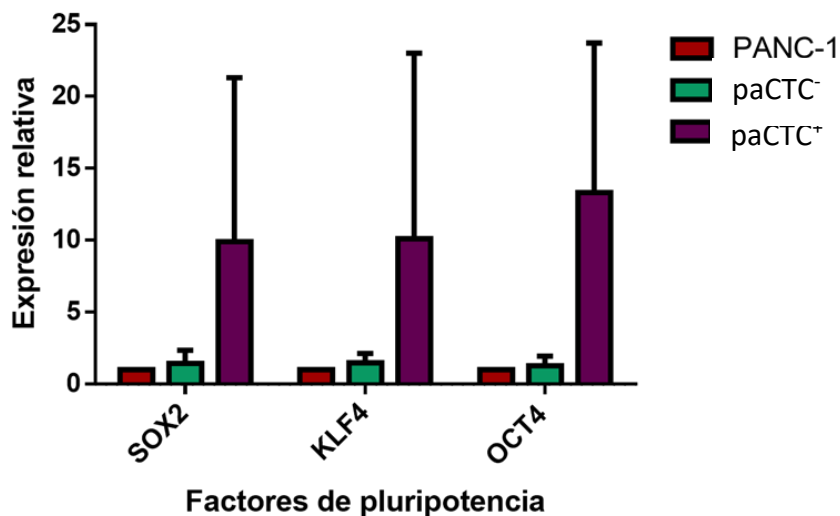


Figura 17. PCR de tiempo real para determinar la expresión de Sox2, Klf4 y Oct4. En la gráfica se muestran los niveles de expresión relativa de los factores de transcripción Sox-2, Klf4 y Oct4 (n=2)

Identificación del perfil de miRNAs de CTCs mediante microarreglos

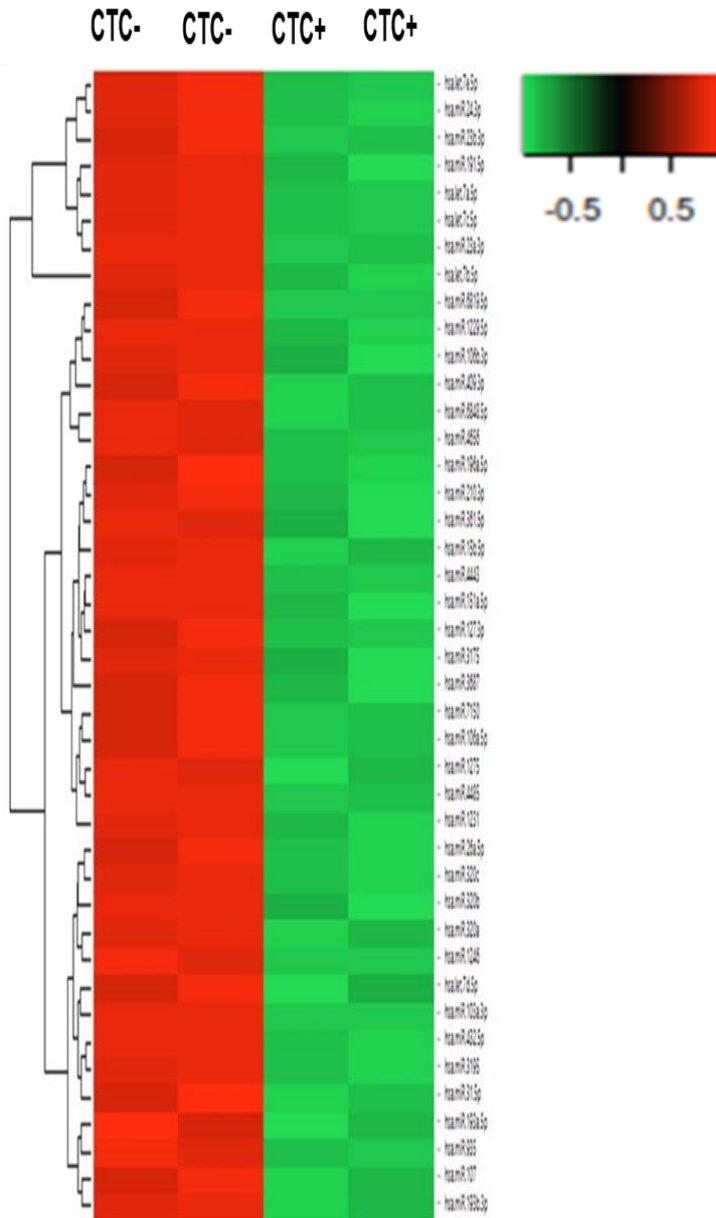
Una vez que confirmamos que las *paCTCs-like* poseían el fenotipo de células troncales procedimos a determinar cuáles miRNAs se encuentran diferencialmente expresados en las muestras *paCTC-like* en comparación con las células *no-paCTC* mediante un microarreglo de miRNAs. Para lo cual, se utilizó la versión miRNA 4.0 de Affymetrix, la cual contiene alrededor de 30,000 grupos de sondas que incluye tanto miRNAs maduros (2578 grupos de sondas) y pre-miRNAs de humano (2025 grupos de sondas) reportados en miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>). La

búsqueda de miRNAs se realizó por emplear duplicados del RNA obtenido de manera independiente de las poblaciones paCTC-like y nopaCTC-.

Con el objetivo de eliminar la señal obtenida de hibridaciones inespecíficas y para tener la certeza de que la intensidad que se midió es proporcional al nivel de expresión de los miRNAs, los datos de expresión crudos se procesaron y se normalizaron con el método de RMA (94). Con estos datos y utilizando *Transcriptome Analysis Console* (TAC) se analizó la expresión del miRNoma. Con el objetivo de contar con los miRNAs que se expresaran con mayor certeza y para eliminar miRNAs que fueron falsos positivos se tomó en cuenta el FDR. El (*False Discovery Rate*) que permite determinar la tasa de falsos positivos. También se consideraron parámetros como el *P. value* (<0.05) y un *fold change* >2 y <-2 . Tomando en cuenta todos estos parámetros se identificaron 42 miRNAs con expresión diferencial significativa entre la población paCTC⁺ en comparación con las no-paCTC. Inesperadamente estos 42 miRNAs muestran una expresión diferencial a la baja y no se identificó ningún miRNA sobreexpresado (Figura 18 y tabla XII).

Esta expresión diferencial entre estos dos tipos de células se aprecia mejor en el *heat map* donde claramente se observa una disminución en la expresión de los 42 miRNAs (verde) en las paCTC⁺-like con respecto a las nopaCTC⁻-like (rojo) (Figura 18A). Esta disminución en la expresión de estos miRNAs va desde -5.84 (hsa-miR-6848-5p) hasta -648 para hsa-let-7b-5p como se aprecia más fácilmente en la gráfica (Figura 18B) y Tabla XII.

A)



B)

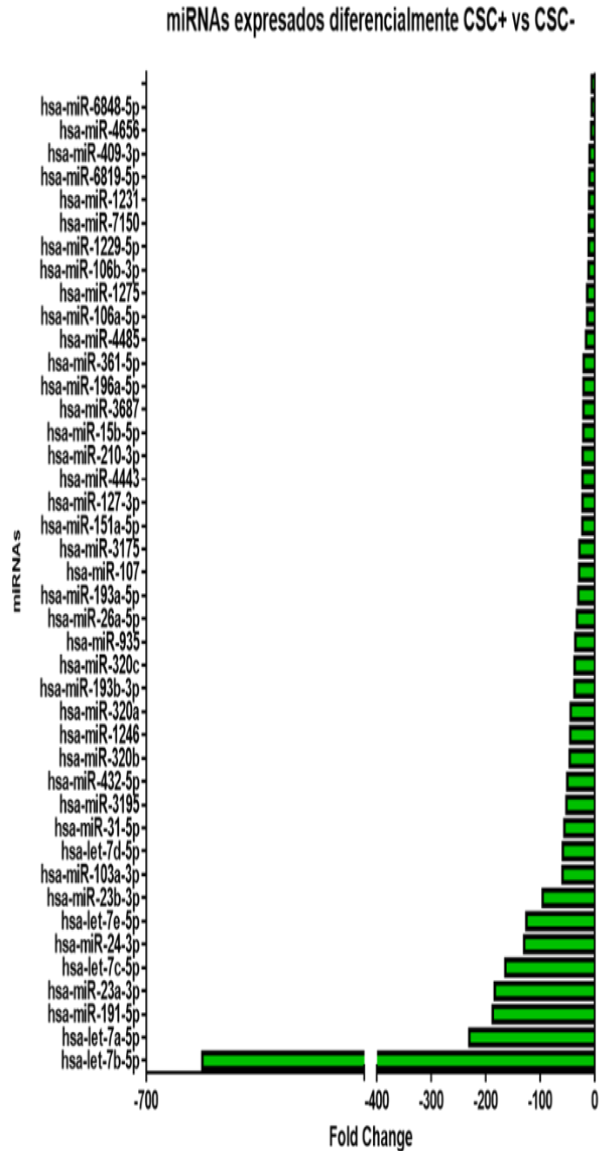


Figura 18. miRNAs expresados diferencialmente en la población paCTC⁺-like A)

Heatmap de 42 miRNA expresados diferencialmente entre paCTC⁺ y paCTC⁻; miRNAs sobreexpresados (rojo) y disminuidos (verde). Representación de agrupación jerárquica de los 42 miRNAs identificados entre células paCTC y no-paCTC **B)** Cambio de expresión de los 42 miRNAs expresados diferencialmente entre paCTC⁺ y paCTC⁻.

Tabla XII. miRNAs diferencialmente expresados en las paCTCs⁺-like

miRNA	Fold Change	P-value	FDR
hsa-let-7b-5p	-648.56	4.35E-06	0.0018
hsa-let-7a-5p	-230.54	3.83E-07	0.0014
hsa-miR-191-5p	-187.49	6.19E-06	0.0022
hsa-miR-23a-3p	-183.57	5.02E-07	0.0014
hsa-let-7c-5p	-164.27	8.28E-07	0.0014
hsa-miR-24-3p	-129.79	3.73E-06	0.0018
hsa-let-7e-5p	-125.74	1.61E-06	0.0018
hsa-miR-23b-3p	-95.84	3.33E-06	0.0018
hsa-miR-103a-3p	-59.29	7.97E-07	0.0014
hsa-let-7d-5p	-58.84	2.37E-05	0.0039
hsa-miR-31-5p	-56.11	1.21E-05	0.0029
hsa-miR-3195	-52.26	2.15E-06	0.0018
hsa-miR-432-5p	-50.7	1.99E-06	0.0018
hsa-miR-320b	-46.24	2.96E-05	0.0042
hsa-miR-1246	-45.07	2.23E-06	0.0018
hsa-miR-320a	-44.4	5.80E-06	0.0022
hsa-miR-193b-3p	-37.49	1.09E-05	0.0029
hsa-miR-320c	-37.21	2.86E-06	0.0018
hsa-miR-935	-35.76	3.48E-06	0.0018
hsa-miR-26a-5p	-32.98	5.91E-06	0.0022
hsa-miR-193a-5p	-30.39	2.94E-05	0.0042
hsa-miR-107	-28.91	1.47E-05	0.0031
hsa-miR-3175	-28.35	2.71E-05	0.0042
hsa-miR-151a-5p	-23	1.14E-05	0.0029
hsa-miR-127-3p	-22.61	6.57E-06	0.0022
hsa-miR-4443	-22.56	3.33E-06	0.0018
hsa-miR-210-3p	-22.35	1.68E-05	0.0033
hsa-miR-15b-5p	-21.38	9.67E-06	0.0028

hsa-miR-3687	-21.02	3.06E-05	0.0042
hsa-miR-196a-5p	-20.77	1.93E-05	0.0036
hsa-miR-361-5p	-20.47	3.33E-05	0.0045
hsa-miR-4485	-16.11	4.31E-06	0.0018
hsa-miR-106a-5p	-14.07	1.06E-05	0.0029
hsa-miR-1275	-14.04	2.04E-05	0.0036
hsa-miR-106b-3p	-11.57	3.75E-05	0.005
hsa-miR-1229-5p	-11.34	1.48E-05	0.0031
hsa-miR-7150	-10.96	1.49E-05	0.0031
hsa-miR-1231	-10.74	1.83E-05	0.0035
hsa-miR-6819-5p	-10.28	1.56E-05	0.0031
hsa-miR-409-3p	-9.64	2.55E-05	0.004
hsa-miR-4656	-6.94	2.18E-05	0.0037
hsa-miR-6848-5p	-5.84	2.96E-05	0.0042

Genes blancos de los miRNAs expresados diferencialmente

La represión a nivel postranscripcional del mRNA es el mecanismo que permite a los miRNAs llevar a cabo la desestabilización de su mRNA blanco. Por ello es importante la identificación de los mensajeros blanco de estos miRNAs para comprender su función y su papel biológico en las paCTCs. Para esto se realizó una búsqueda de los mRNA blancos de los 42 miRNAs identificados en dos bases de datos (*TarBase v.8* y *miRTarBase Release 7.0*), las cuales proveen información de las interacciones miRNA-mRNA que han sido validadas experimentalmente. Con esta herramienta tomamos en cuenta solo aquellos mRNAs blanco con una evidencia experimental fuerte En la tabla XIII se muestran los blancos de algunos de los 42 miRNAs.

Tabla XIII. mRNA blancos de miRNAs validados experimentalmente.

miRNAs	Mensajero blancos
hsa-let-7b-5p	AARSD1; AATF; ABCB10; ABCB8; ABCC1; ABCF1; ABHD17C; ABL1; ABT1; ACACA; ACER2; ACOT9; ACP; ACSL1; ACTA1; ACTB; ACTG1; ACTN4; ACVR1; ADCK2; ADCY1; ADH5; ADIPOR2; ADNP; ADRM1; AFF4; AGFG2; AGL; AGO1; AGO2; AHCTF1; AHCYL1; AHCYL2; AHR; AIDA; AK4; AKAP8; AKR1A1; AKT2; ALDH7A1; ALG3; AMD1; AMPH; ANAPC1; ANKRD17; ANKRD46; ANKRD52; ANKZF1; ANP32E; ANTXR1; ANXA8; ANXA8L1; ANXA8L2; AP1S1; AP3M1; APPL1; APRT; AR; ARCNI; AREL1; ARFIP2; ARHGAP17; ARHGAP26; ARHGFE5; ARID3A; ARID3B; ARIH1; ARL15; ARL6IP1; ARL8B; ARPP19; ASOC3; ASIC1; ASNA1; ASPA; ASPSCR1; ATAD3B; ATE1; ATG12; ATG4B; ATG9A; ATOX1; ATP1A1; ATP2A2; ATP6;; FAM126A; FAM131A; FAM136A; FAM178A; FAM203A; FAM213A; FAM222B; FAM43A;; GGCT; GGPS1; GLB1; GLO1; GLTPD1; GLTSCR2; GNAS; GNB1; GNG5; GOLGA4; GPATCH1; GPATCH4; GPHN; GPI;; NFKBIA; NFU1; NHLRC2; NHLRC3; NHSL1; NIPBL; NLE1; NME4; NME6; NOA1; NOL6; NOLC1; NOM1; NOMO3; NOP14; NPTN; NR2E1; NR6A1; NRAS; NRD1; NSA2; NSD1; NSMCE4A; NSUN2; NTSDC2; NUBP2; NUCB2; NUCKS1; NUDT19;; SC5D; SCAF4; SCAF8; SCAMP1; SCAMP3; SCD; SCML2; SCRNI1; SCYL1; SDAD1; SDR42E1; SEC11A; SEC16A; SEC23B; SEMA4C; SEMG2; SEPT4; SERBP1; SETD5; SF3B1; SFMBT1; SH3GLB1; SH3PXD2A; SIGMAR1; SIK1; SKI; SLC10A3; SLC10A7; SLC11A2; SLC12A7; SLC16A9; SLC19A3; SLC1A4; SLC20A1; SLC25A1; SLC25A12; SLC25A13; SLC25A19; SLC25A24; SLC25A32; SLC25A4; SLC27A2; SLC30A1; SLC30A7; SLC35F1; SLC38A1; SLC38A2; SLC38A5; SLC38A7; SLC5A6; SLC9A3R1; SMARCA1; SMARCA4; SMARCAD1; SMARCB1; SMARCC1; SMARCC2; SMARCD1; SMC1A; SMCR7L; SMCR8; SMG1; SMG7; SNAP23; SNRPA; SNRPE; SNX12; SNX17; SOCS1; SOD2; SON;
hsa-let-7a-5p	CDK6,MYC,BCL2,NKIRAS2,ITGB3,NF2,NRAS,KRAS,PRDM1,TRIM71,FOXA1,NR1I2,VDR,RAVER2,HMGA2,HMGA1,AGO4,APP,E2F1,UHRF2,DICER1,HRAS,IGF2,LIN28A,NFKB1,ZFP36L1,THBS1,TUSC2,SLC20A1,NEFM,MEIS1,EGR3,HNRNPDL,AMMECR1,CASP3,CASP8,CASP9,IL6,E2F2,CCND2,IGF2BP1,CDC34,EWSR1,MPL,CCR7,TMED7,CDKN1A,HAS2,EGRF,RIOK3,ZC3H18,OTULIN,TMEM39A,UPP2,SYNPR,ATP6V1B2,MEPCE,PSMA2,NDUFAF3,GP5,GNP1,UTP4,ZNF555,UBE3C,LHFPL2,MRPL15,HIST2H2BF,CEP170B,SMPDL3B,HIST2H2BE,COX2,SMARCAD1,COX2,BCAT1,RRM2,FNDC3A,ZOCCHC9,CD276,PHF6,FAM13C,NOLC1,ACVR1B,PTP4A1,BAZ2A,UBAP2,RPL9,TRIM5,DNAJC6,GLUL,HIST1H4D,FOXO3,PHTF2,ACTB,NID2,ANOG,CS,BTBD1,NCBP1,LMNA,RBMXL1,JAZF1,RPS3A,ZNF629,SIK1,HIST1H1D,LIN28A,SESN2,EIF3C,GPM6B,RPL30,ARL6IP6,FBXW2,POU3F2,TTC22,LRR37A2,GCN1,IVD,CNOT9,KIAA2026,COX1,NAAS3,SHMT2,ATP6,GT2I,KRTAP19-1,RPL4,TMEM165,GTFC35,KIAA1147
hsa-miR-191-5p	AACS; ACSL1; ACSS1; AGL; ATF6; BCOR; BICD2; BRAF; BZW2; CASCS; CCDC88C; CCND2; CDK6; CEBPB; CTDSP2; CYTH2; Cdk6; DCAF15; DCUN1D2; DHCR24; EGR1; EIF3I; EMX2; ENAH; FN3KRP; GATSL2; GBA; GOLGA7; HNRNPA2B1; HNRNPM; HNRNPUL1; HSD17B12; IL1A; IRS4; LRRC8A; MCFD2; MDM4; MFAP3; MPST; MTSS1L; NDST1; PDHA1; PI4KB; PPIAL4G; PPP1R14C; PSAP; PSMA2; PURB; RABL6; RAD21; RCC2; RPIA; RPL37; RRN3; SATB1; SLC16A2; SLC7A1; SOX4; SPATA2; SRGAP2; TARS; TLE1; TMC7; TMEM33; TNPO2; UHRF1; USP37; YBX3
hsa-let-7c-5p	CDC25A,TGFB1,TRIM71,HMGA2,MYC,DICER1,BCL2L1,NRAS,MPL,COPS8,GPS1,COPS6,R3HDM2,IP6K1,RFWD3,CEP170B,ACTB,ZNF614,Safb,FOXO3,ND2,METAP2,KIAA0141,CCNF,C5orf24,CSTF2T,TAZ,ND4L,PRRC2A,COX3,RYR2,ACTN4,SMARCD1,INTS14,RAB10,PRPF8,SRCAP,PPP2R5E,BCOR,CACNG8,CDC42BPA,CBL,ATP6,PEX6,RPS4Y1,NME4,DCAF7,RPL18A,NUDT21,KRTAP191,PAK4,LECT2,TMEM165,ND5,ITGA10,DNAJC16,METTL25,GATAD2B,SLK,EIF3C,EIF3A,SLC25A1,EWSR1,DUSP7,DDX18,CACHD1,MBTPS1,CNOT3,IPO7,EYA3,SBD5,RPL3,WDR61,ND4,SIRT1,RAB5B,CCNC,SNW1,COPS3,FKBP10,GSK3A,PTP4A2,PSMG2,COX1,BSDC1,ACVR1B,RPS13,FAM103A1,TAFL5,SLC10A3,SH3D19,BRD2,ATP2A2,C9orf40,SLC35A4,ZNF581,ANKRD17,JARID2,CBX6,GORASP2,TMEM184B,CHST6,CHD1,SUPT16H,NUP58,LTA4H,TUT1,PCGF3,BPTF,ARMC8,ARL6IP1,LDHA,RAB34,PTGES2,LAMTOR1,KIF1B,HUWE1,DNAJC6,SNUPN,SF3B4,PCF11,WDR3,MKRN1
hsa-miR-24-3p	FEN1,CDK4,CCNA2,AURKB,MYC,E2F2,NOTCH1,DHFR,MAPK14,TRIB3,HNF4A,ACVR1B,MLEC,CDKN2A,BRCA1,POLD1,CDKN1B,KHSRP,NFAT5,DND1,TGFB1,FURIN,FAF1,ZNF217,ST7L,VRK1,NOP56,TBPL1,TNPO3,SNRPB2,DDHD2,THOP1,UBE2C,GNPAT,METAP2,PUM3,UGDH,URM1,GT2E1,MED22,USP10,FKBP1B,SCML1,CNDP2,MCM10,TOP1,H2AFX,TOMM22,HBQ1,PRIM1,PSMD1,AUNIP,NARF,MALSU1,TCEA3,ADRM1,AGFG1,ACD,RCE1,SUMO3,CYP20A1,TYMSOS,MIS18A,GLYR1,NAE1,ACTL6A,NCBP2,SLC29A4,JADE3,GYG2,SLC7A2,EXOSC8,TDRP,R3HDM4,DCAF4,TAFL5,VPS25,NROB2,NASP,STRADB,MTF2,PHOSPHO2,ATAD3A,CCDC59,VPS35,PAF1,CIRBP,S100P,ARHGFE7,PROSER1,PDLIM7,KIAA0100,TOMM34,CTCF,EIF4G3,SLC52A2,KHNYN,ADD1,ZBED1,KLHL23,SULT2A1,LSM12,PDPK1,CARD10,PPM1F,NRIP1,ARHGFE18,FNTB,PAK4,KPNA6,BCL2L2,PSTPIP2,ACACA,MATR3,HACD3

hsa-miR-23a-3p	AARS2; ABCC1; ABCC4; ABCF1; ACAT1; ACSS3; ACTN4; ADAM17; ADAM28; ADD3; AKAP11; ALDOA; AMOTL1; ANKRD17; AP4B1; ARFIP1; ARL6IP1; ATF7IP; ATG12; ATP1A1; ATP5A1; ATXN10; ATXN7L3B; BBS12; BCL2L1; BCL7B; BCS1L; BLOC1S2; BRWD1;; CCN2; CCT7; CD302; CDC20; CDC73; CDCA8; CDK2; CELF1; CENPM; CEP104; CEP57L1;; CPEF3L; CPEF7; CRKL; CRLS1; CSDE1; CUL4A; CYB561D1; DCP2; DDV27; DDX47; DGC2; DHX33; DHX57; DIAPH1; DMNT; DNAJC21E2F1; E2F4; ECH1; EEF1A1; EIF4A1; EMC1; EN2; EP300; ERBB2IP; ETNK1; FLNA; FNIP1; FOXR2; FUT4; G3BP1; GANAB; GAPDH; GHITM; GJA1; GNA12; GNB2L1; GNS; GTF2I; HAPLN1; HERC3; HIF1AN; HIST2H4B; HK1; HMGA2; HMGB2; HMGC1S1; HNRNPK; HNRNPL; HNRNPUL1; HS2ST1; ILF2; ILVBL; IMPDH2; INPP4A; ITFG1; ITPR3; JAK1; JMUD1C; KANSL1; KDM1A; KIAA1210; KIAA1279; KLF10; KLHL2; LASP1; LBR; LMAN2;; PCMTD2; PDCD6IP; PDIA6; PHF10; PI4KB; PIGM; PLAG1; PLAU; PLOD1; PNN; PNRC2; POM121C; PPARGC1B; PPI; PPM1A; PPP1CB; PRAP1; PRDX1; PRKACB; PRPF6; PRR14L; PSAP; PSMD14; PTEN; PTGFRN; PTK2B; PTPDC1; PTPN14; QSER1; SERINC3; SESN2; SLC16A1; S; TMEM170A; TNFAIP3; TNFAIP8; TNPO1; TNRC6A; TNRC6B; TOPBP1; TOR1AIP1; TPCN1; TPM3; TRIM59; TSNA; TSR1; TUSC7; UBR3; UNC45A; UQCRC2; UQCRCF1; USP31; USF5; VAV3; VCAM1; VHL; WDR54; WEE1; WWP2; XPO1; ZCCHC2; ZEB1; ZIC5; ZIK1; ZMYM2; ZNF117; ZNF138; ZNF208; ZNF253; ZNF257; ZNF267; ZNF268; ZNF273; ZNF275; ZNF281; ZNF319; ZNF426; ZNF485; ZNF550; ZNF578; ZNF669; ZNF682; ZNF701; ZNF704; ZNFX1
hsa-let-7e-5p	HMGA2, EIF3, SMC1A, WNT1, CCND1, MPL, MYCN, TBC1D31, FAM219B, C11orf91, CENPF, TMEM107, SREBF1, DAAM1, DGCR8, RAP1A, RPA1, SKIV2L, AGO1, RPS27, ARNT2, GPM6B, TTL12, HIST2H2BF, CELF2, AGO2, VPS13D, RPL10, SPCS2, DCAF8, CTC1, NAA60, PHF3, TUBA1B, SHANK1, SKA2, SPTBN1, ND2, MED13L, RCOR3, MACF1, RDX, PCBP2, UBAP2, CDC3, CABLES1, BTRC, C12orf49, TIMP3, RCC1L, SLC2A11, NF1, LRRC8A, RUNX1T1, DTNB, SCMH1, YWHAG, RHBD2, ND5, NDST1, IGF2BP3, EIF4A1, BAHCC1, CARM1, DYRK2, ND3, PIGS, ALG13, RPN2, RPL12, NME4, IVD, JAZF1, ND4, VARS, RNFB2, LHFPL2, ARCN1, COX1, SLC12A4, AEBP2, GATB, UROC1, IGF1R, BSDC1, PTK2, CDC5L, EN2, SSB, SLC30A1, RRAGC, ZNF236, SEMA4B, SERBP1, XIAP, GTF2I, JMUD1C, OTUD5, NOLC1, PPIG, PSMD2, UGGT1, VAMP2, LSR, KIAA0355, RPSA, DCAF6, UHRF1BP1, OTUB1, PIGP, LMLN, PPP2R1A, HIPK1, SERF2, RBM4, RBM14, HMGB1, GMPS, DIAPH1, STAM, YWHAG, APPL1, MARCH5, SQLE, TIMM50, NDUFA3, NDUFS5, NRNSN2, SALL1, COX3, RABL6, SUPT4H1, PACS2, TMTR14, LUZP1, PFAS, SUZ12, PAPO4, QSOX1, SPATA13, DHX57, KATNB1, COL6A1, DDX15, MTC2, KIAA0100, SUGP2, NCLN
hsa-miR-103a-3p	ZGPD1, CCNE1, CDK2, CREB1, DICER1, CAV1, KLF4, DAPK1, PTEN, CYP2C8, TIMP3, ID2, SCAF1, NSF, ARF6, MEX3C, MTF1, ING1, ZBTB8A, SPATS2, EDC3, SYS1, ZNF606, ADGRL1, FLCN, SLC52A2, IVNS1ABP, OIP5, CEP55, KATNAL1, TMEM100, SLC39A10, RPS6KB1, BFAF, NIN, STK40, ZRANB1, ENPP4, KLHL18, C20orf27, KCNG3, MAP3K7, CAAP1, ATG9A, KIF5B, SMAD7, FAM171A1, ZNRF3, CDC25A, SDCBP, LATS1, GATAD2A, IGSF3, ABL2, PRDM4, GOPC, LUZP1, HNRNPA2B1, RIMS3, UBN2, AVL9, SIPA1L2, NDEL1, SUN2, SALL1, ZNRF2, DNAJB4, YTHDC1, NABP1, ATP13A3, ZHX1, ZBTB34, INSIG1, SRSF1, IFT74, MIS18BP1, RIF1, LARP4B, STAMBP1, PHC3, BCKDK, C11orf58, CITED2, YAF2, LAMP2, FAM98A, FMC1, NUFIP2, USP42, ARL4C, FURIN, FAM122B, SLC25A39, TLE4, CDV3, AEBP2, YIF1B, FAM122A, FAM89A, HOXA3, ITM2C, SVIP, DMTF1, HIST2H2BE, HOXC10, VEZF, GLRX, SIR7A, RECK, ATP5G3, SON, SLC6A9, PRKAR2A, MYO5A, AADAT, PPP1R12C, RPR1B, PDE4D, ABCF2, ANKFY1, GABARAPL1, AP2A1, PPP6R3, G3BP2, SAV1, PPP1R11, RAB1B, KPNA1, SLC35B2, SMARCE1, CYB561A3, CARD10, PLPBP, ACVR2B, TMCC1, CLIP1, SNX16, CUL4A, ARL3, ATG14, DYRK2, ZNF622, PIP4P1
hsa-let-7d-5p	HMGA2, APP, DICER1, SLC11A2, PDGFA, IL13, MPL, EIF4G2, CALCOCC2, GPR63, FAM135A, CPNE1, NR4A1, BUB3, TBC1D9B, LARP4B, NAA20, FBXO3, ZNF763, PCNP, HOMER1, RBM12, KMT2A, CBR4, THBS1, TLE4, TOMM20, TMED4, AKAP8, TST, GPR137B, RALGAPB, IGF2BP3, RPU5D2, ZBTB24, SPATA2, GOLT1B, ERC1, SREK1IP1, RFX5, BIN3, CEP120, ZNF526, ISL1, PQLR2D, MIEF1, NEMIP1, KATNAL1, C12orf4, TMEM2, DLC1, TMTC3, SREK1, ZNF354B, ZNF200, ADCY9, TNRC6A, STK40, PCGF3, ZBTB39, LIN52, RAD9A, ARDC4, SLC30A6, LBR, CARNMT1, ESPL1, ABT1, NHLRC3, GLMN, IGDC4, ZNF644, C11orf57, FAM104A, SPRYD4, ARID3A, SLC10A7, ONECUT2, USP24, SMARCAD1, TGFBFR1, HAND1, KPNA5, IGF1R, TMEM135, SLC20A1, ZNF280B, LIN28B, IGF2BP1, CACNG8, PRR13, ZNF746, SLC35A4, RPL31, TPDS2L2, MRPL51, CTD1P1, RPS6, SENP5, PAXBP1, DHX57, H2AFX, DSC3, CIZ1, NCOA1, LRRC42, UTP6, A DIPOR2, TXLNA, FNDC3A, ARID3B, SMCR8, ZCCHC3, BACH1, GRPEL2
hsa-miR-320a	POLR3D, TAC1, TFRC, MCL1, HSPB6, AQP1, AQP4, NPR1, MAPK1, SYF2, DIRC2, ZFP37, PRDX6, MED23, PPP4C, NPEPP5, IGF2BP1, CDS2, ARF3, TMEM101, RPL30, C20orf27, HIST1H2BL, ATPAF2, CTNNA1, PANK3, PPIA, IGF2BP3, NUDT21, EPHA4, YKORC1, GTF3C4, TSC22D2, ZNF600, TMEM64, NANOG, ZNF155, ANKHD1, TOP3A, DTX3, CSDE1, HIST1H2BH, HIST1H1A, ECH1, HIST1H2BK, AGO1, GGA1, DVL3, KMT2D, CDKN2A, PTTG1, ZEB2, CBX5, PRR12, TNRC6B, ORC1, HES6, RPS4X, RANBP6, FMO1, TEAD1, TCP1, CDK4, ARHGEF2, PIGP, RPL7A, UBAP2, MARCH4, YRDC, RPL13A, MYO5C, LONP2, GPN1, SMC1A, DCLRE1B, ND4, DUSP8, PRDX3, IMP4, ARL9, CCN1, RNFI03, GHSR, HSPA9, ANKRD52, CYLD, SAMD4B, DCP2, H2AFX, EIF3F, SEC14L1, ERC1, DHRSX, PAPA1, BRD4, TCF3, ZNF282, ZNF496, UBE2G1, SIN3CAF, HNRNPUL1, GNAS, NTS5C3A, ANP32A, MEOX2, TFAP2A, WARS, SF1, SEPT1, HAUS6, TMEM98, CD44, MCM4, SLC6A8, RPL9, USP16, EWSR1, NT5C, PPIF, KDM5C, PRR14L
hsa-miR-26a-5p	HMGA2, HMGA1, CCNE2, CCND2, CDK8, CDC6, IJF, PTEN, E2H2, PLAG1, SERBP1, SMAD1, MAP3K2, RB1, SMAD4, MYC, CTGF, STRADB, IFNB1, GSK3B, CPEB2, CPEB3, CPEB4, GDAP1, MTDH, CDK6, CCNE1, ESR1, ABCA1, ARL4C, E2F7, NOS2, IL6, HIST1H4E, ZNF814, ZNF233, ABCB7, SCRN1, NABP1, FAM20B, ARCN1, ANO3, TFAM, FER, MFS14A, PPP1CC, SLC35B4, RASA1, COX1, MSL3, GGA2, GIT2, DNMT1, MFHAS1, UBA2, DCAF7, MTRF1, RCC1L, NUAK1, TUT1, PNMA2, ACTL8, HSPA8, DHX15, TCP1, SLC25A5, LSM14A, CAMKV, ALG10B, TYW1, RPL13A, AGO1, TXLNG, RAB18, RPS27A, RPS26, PIKFYVE, TP53INP1, ZNF703, MTRF1L, ZNF506, KCTD5, CTC1, TKT, LYST, RETREG2, NKX25, AURKAIP1, ATP1A1, COASY, CTR9, COX3, ELOVL6, PI3GT, TMCC3, ARHGEF1, SHC2, PSMA3, PTTG1, RPS24, SPTBN1, UBTF, BTBD3, AHR, EEF1B2, MRPL51, SETD2, LRP6, RHOBTB1, HIST1H4I, MYO10, ATP7B, KAT14, RBM39, C14orf37, SFMBT1, GALPP1, ABCB9, ADM
hsa-miR-107	PLAG1, BACE1, CDK6, MYB, VEGFA, HIF1A, ARNT, CDCA4, CCNE1, RAB1B, CRKL, FBXW7, GRN, NFIA, DICER1, DAPK1, KLF4, PTEN, AXIN2, CYP2C8, CHR11, NOTCH2, SAT1, GUCCD1, AGO2, RPL27, NINJ1, METRNL, AGO3, INSIG1, JER3IP1, ZDHHC4, AGO1, CSNK1G2, MRPL2, ADD2, MRPL12, C21orf58, GANAB, TUBA1B, SNX8, DHX16, ATXN1L, TUBB, BABAM1, PCSK5, RPA1N, PHGDH, RPSA, ZADH2, TCF19, FAM207A, TM9SF1, COPS7A, PSMB6, WDR6, GNS, GPR89B, TMEM87A, PRKCE, FOXO1, CDK8, CAV1, LATS2, SNGC, OPRM1, JAK1, IL6, CNM2M, PLEKH A1, ZDHHC16, TARBP2, MTRF1L, DYRK2, FCF1, ARIH1, SNTB2, VPS4A, C16orf72, RPS6KB1, SOWAHC, UBR3, YWHAH, NUP50
hsa-miR-15b-5p	CCNE1, RECK, BCL2, CCND1, VEGFA, EIF4A1, AXIN2, IFNG, PURA, MAP2K4, C5orf15, MTR6, AP5S1, MRPS11, NPM1, EIF2AK2, CD44, TM9SF3, HNRNPK, SERBP1, AIG1, POU2F1, RAB1B, RPS3A, NAA30, SYNJ1, FAXC, PLSR4, NUP210, URB2, EEF1A1, PXMP2, RUM, TMC7, FAM214A, TMEM63B, UACA, TAB2, RPL27A, WAC, CHMP7, CDK4, VDACC2, PGD, PIK3C2B, MPHOSPH9, MPP1, MARCKS, NAB1, MESD, ATP6V0E1, RPS6, TPD52, TTC1, LIN28B, TARDBP, PHLD83, TNPO3, PPTC7, VPS13A, QRICH1, SCCPDH, NDFIP1, TCP1, DHFR, DSG2, EDC4, ECHS1, HNRNPM, PPI1, TANGO6, FOXK1, KMT2C, LSM14A, MAPK1, CYBA, BEX1, CYP51A1, DNAJC5, CLCN6, SEPT2, BRAT1, HSPA8, TSPAN3, CHEK1, FADD, ZCCHC14, ITGA6, DDX5, MYCBP2, LRRCC41, IFIH1, TERF2, RPLP0, NUP214, STT3B, TXLNA, B4GALT1, SFT2D1, FBXO30, JAK1, TMEM43, CKAP5, CRK, DHX30, TGOIN2, HNRNPH3, GSK3B, PRPS1, PTAR1, UVSSA, AGPAT5, PATJ, ZNF217, GNL3, VPS35, COIL, RAE1, UBE3B, PPI2, AP2M1, ZNRF1, SF3B3, SLC39A14, CHPF, ATP2A2, NUP160, MDH1, PPP1CC, SMAD7, RANBP10, THRA, APRT, QARS, AFDN, STXBP1, VOPP1, MCPH1, HSP90A1, PSMD7, SUPT3H, DHX37, DENR, TCAF2, SLC1A5, BAMB1, PPP1CB, LZTR1, TRAPP1, CPOX, RBM27, ARID2, ZFAND5, EIF5B
hsa-miR-196a-5p	PRR2C, S100A9, KRT5, ANXA1, HOXB8, HOXA7, HOXD8, HOXC8, HOXB7, BACH1, HMOX1, CDKN1B, HMGA1, HMGA2, HOXA5, PDCD4, SRRT, DIEF, ZBTB24, NR4A1, ABT1, SPATA2, NHLRC3, RPU5D2, CEP120, PHC3, ZBTB6, CARNMT1, PNP, COPS3, NUP50, ZNF763, FOXJ3, BIN3, C12orf4, RAD9A, PCGF3, KATNAL1, SLC10A7, LBR, BCL11A, GLMN, STK40, TMEM135, GGA3, POLR2D, LGR4, IGF2BP3, ESPL1, RFX5, SYT9, PEX13, IGF1R, MIEF1, SLC30A6, RAB31, KPNA5, SLC20A1, TIMM23, IGDC4, SMARCAD1, CCNT2, CCND2, USP24, TRPC3, SMC3, TMEM2, RDH10, C11orf57, RTL8C, PRUNE2, SPRYD4, TMEM161B, CPEB3, FAM104A, RAB29, ITGAV, CPD, ZNF354B, NEMP1, EPHA7, MAP3K21, DFFA, TSPAN12, LIN28B, ARHGAP28, IGF2BP1, CDC47, HAND1, LLLGL1, PGAM1, PSMC3, TMX2, KLHL7, RFC2, GLUL, NRXN1, GSTK1, HIST2H4B, SPEN, TAF15, SAP18, SNRPD1, MSL3, TSKU, KMT2C, LYRM2, UBE2Z, PROSER3, LRP2, ND4L, NKX61, BRMS1L, RPS2, RBMX, ZFP64, REEP2, MED13, MYCBP2, TRAPP9, DNTTIP2, VDACC3, ZNF529, EWSR1, ATP6V1B2, RDH11, APP, PROSER1, HIST1H2BB, TAB2, TUBA1B, USP19, COX3, PSMD8, TRA2B, MRPL35

Una vez que se conocían los probables mRNA blancos de estos 42 miRNAs, se averiguó su probable función biológica. Para lo cual se introdujeron los mRNAs blanco de estos 11 miRNAs en la base de datos de DAVID para realizar un enriquecimiento de vías biológicas. Esta base de datos mediante algoritmos permite agrupar a los genes de acuerdo a las vías y procesos biológicos en común. En la figura 19 se muestran algunas vías con importancia en la biología de las células troncales que se vieron enriquecidas, tales como vías de cáncer, del ciclo celular ya que la mayoría de las CTCs se encuentran en un estado quiescente el cual es regulado por el eje pRb-E2F-p21, y se caracteriza por un arresto en la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular (95), vías de transducción de señal que ya han sido reportadas que se encuentran involucradas en el desarrollo y mantenimiento de las CTCs como Wnt, HIF-1, PI3k-Akt, mTOR (96), y la vía de señalización reguladoras de pluripotencia de células troncales, vía que engloba a todas las vías que participan en mantener la pluripotencia, lo cual sería de gran importancia para estudiar y caracterizar a las células troncales cancerosas. Es por esta razón que decidimos enfocarnos en los miRNAs que participaban en esta vía.

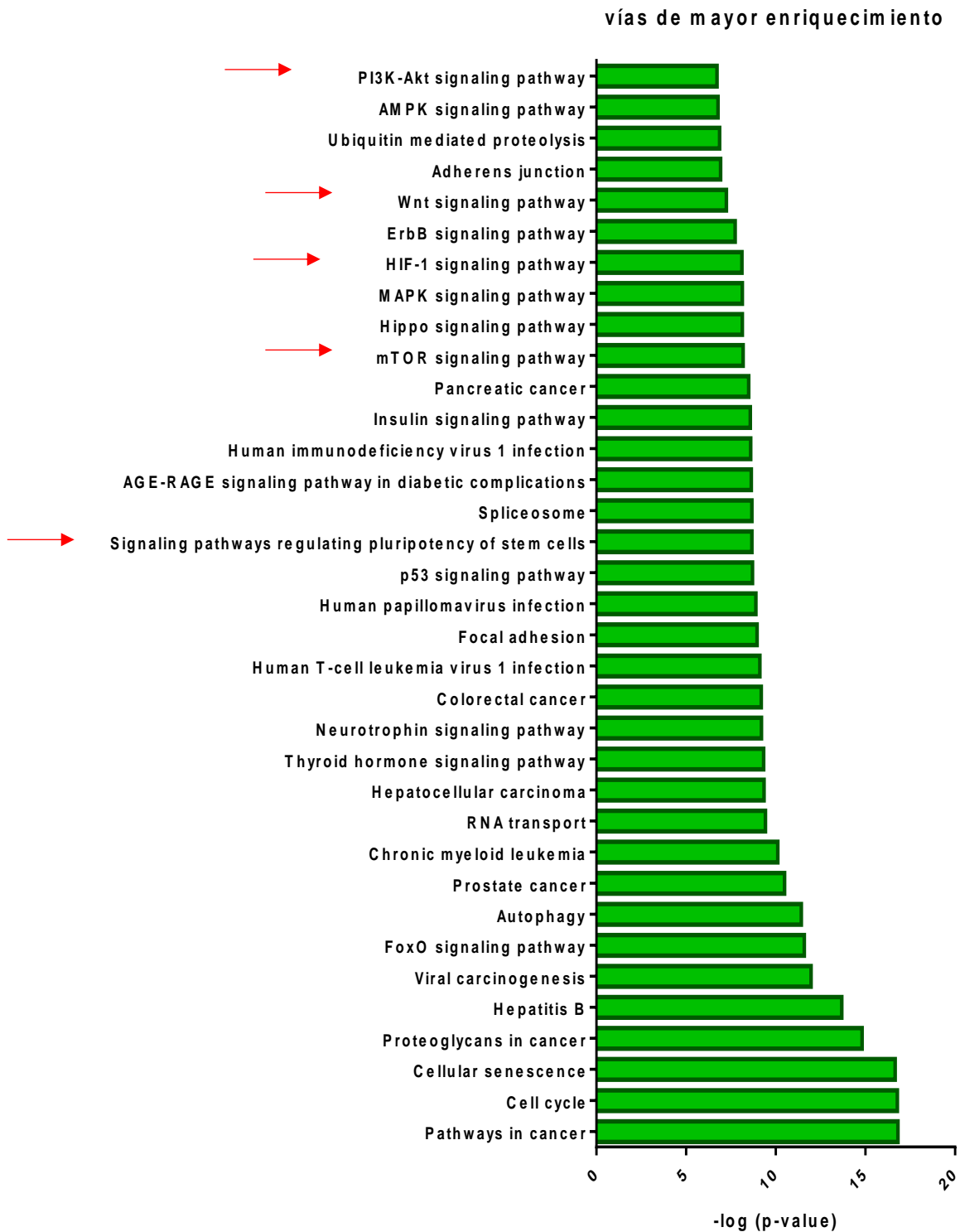


Figura 19. Vías de mayor de enriquecimiento para los mRNA blancos de los miRNAs expresados diferencialmente en paCTC-like.

11 miRNAs participan en las vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células paCTC⁺-like y que regulan la expresión de factores de transcripción involucrados en la pluripotencia

Dentro de esta vía de regulación encontramos que participaban 11 de los 42 miRNAs previamente identificados, los cuales fueron: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-196a-5p. Nuevamente, al introducir los mRNAs blanco de los 11 miRNAs en la vía de señalización que regula la pluripotencia en el programa KEGG. obtuvimos el resultado que se muestra en la figura 20 en donde de manera esquemática nos muestra las vías implicadas y los genes alterados que encontramos en este trabajo marcados en rojo (Figura 20).

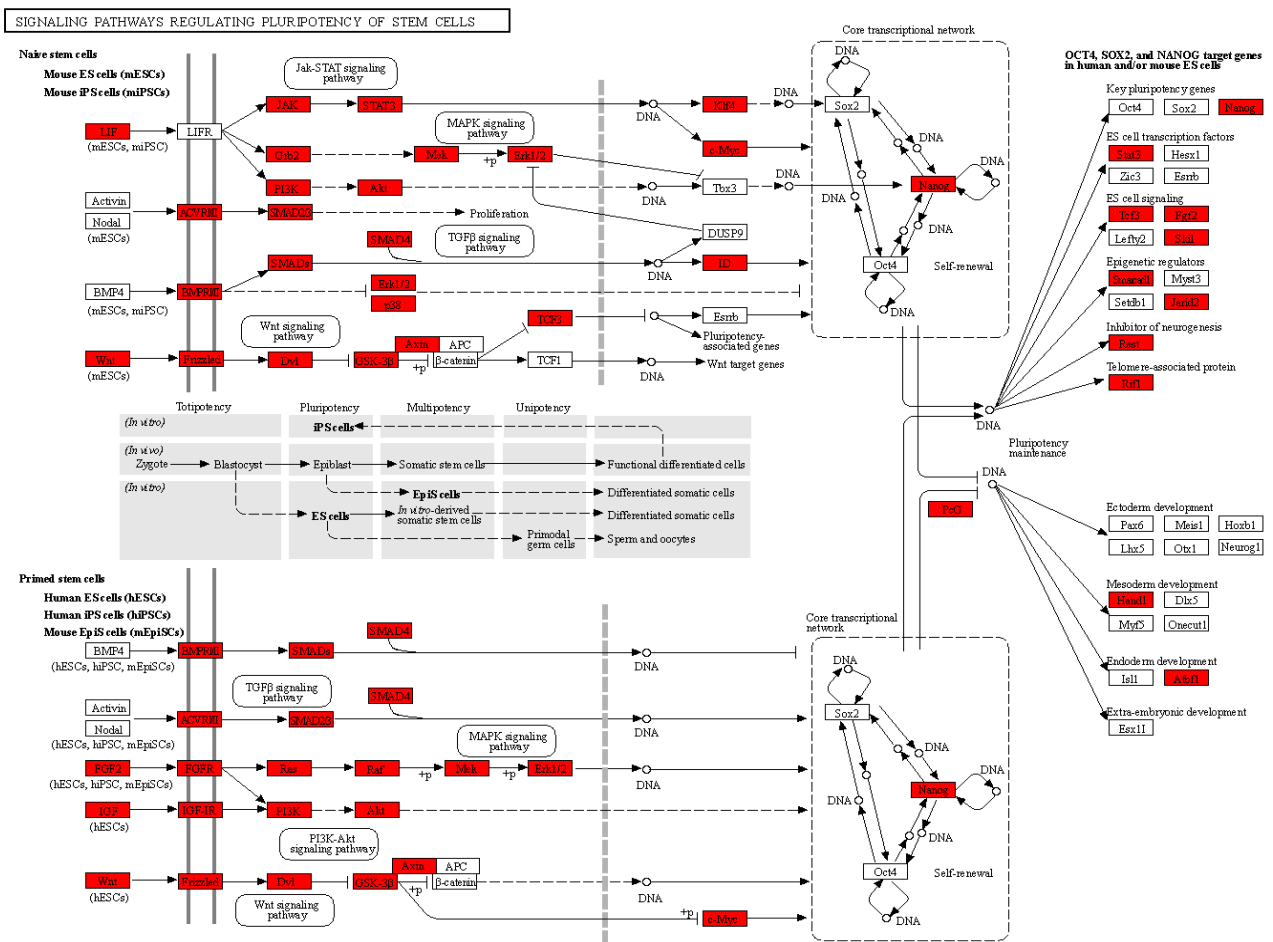


Figura 20. Esquema de vías involucradas en la regulación de pluripotencia en células troncales. En rojo se destacan los mensajeros blancos de los 11 miRNAs seleccionados.

Por lo que este resultado sugiere que los miRNAs podrían tener como posibles mRNA blanco, varios genes cuyas proteínas participan en distintas vías de señalización como Wnt, Hedgehog, Notch, Fgf, los cuales ya se sabe participan de manera importante en regular la autorenovación de las CTC (Figura 20) (97).

De todas estas vías de señalización 10 de los 11 miRNAs podrían participar en regular la vía de Wnt a nivel de su ligando (Wnt) (let-7a-5p,let-7c-5p,let-7e-5p, miR-103a y miR-26a); del receptor Frizled (FZd) (let-7a-5p,let-7c-5p,let-7e-5p, miR-24, miR-103a, let-7d-5p, miR-107 y miR-15b); de la proteína dishevelled (Dsv) que recibe la señal del receptor FZD (let-7a-5p,let-7c-5p,let-7e-5p, miR-24, miR-103a, let-7d-5p, miR-320a), de la proteína β -catenina (miR-320a) y el factor de transcripción Tcf3 (let-7e-5p, miR-24,miR-107 y miR-15b). Diferentes evidencias han demostrado que la inactivación de esta vía lleva a la pérdida de la habilidad de las CTCs por lo que estos miRNAs al estar disminuidos permitirían que las proteínas se expresen activando a esta vía la cual es importante para promover la autorenovación de estas células (97) (Figura 21). Con respecto a la vía Hedgehog (Hh) se encontró que el miR-302a podría estar regulando el RNAm de la proteína Bmi1. Sin embargo, al estar disminuida la expresión de este miRNA permite que Bmi1 participe en regular la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la troncalidad y la auto-renovación de las CTCs (98) (Figura 21). Por lo que respecta a la vía de Notch,, nuestro análisis sugiere que 7 de los 11 miRNAs previamente identificados (Figura 21) participan en regular esta vía a diferentes niveles, 2 de ellos a nivel del ligando TACE (miR-24,miR-26a), 5 a nivel de receptor (let-7c-5p , miR-24,miR-107, miR-15b, miR-196a) .y tres regulando factores de transcripción implicados en esta vía como HAT,CSL(miR-26a, miR-320a y miR-15b) Figura 21. Sin embargo al estar disminuida la expresión de estos miRNAs permite que esta vía se encuentre activa y que no bloquee la función del receptor Notch y de dos factores de transcripción ayudando de esta forma a la mantenimiento de las células CTC (99).También se encontraron disminuidos miRNAs que regulan la expresión de RNAm blancos que participan en la regulación de la diferenciación, ya que se ha visto que la vía BMP coordina la unión del factor de transcripción SMAD, lo cual es importante para el compromiso en la diferenciación a un linaje específico (100).

Además de un miRNA que actúa a nivel de ligando y otros dos a nivel del receptor (89). Finalmente también se identificaron 9 miRNAs (let-7a-5p, let-7c-5p, let-7e-5p, let-7d-5p, miR-26a, miR-107, miR-15b, miR-196a) que podrían actuar sobre la vía FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) que junto con la vía de Wnt y Hh se consideran las vías más importante en el mantenimiento y autorenovación de las CTC (96). Por lo que al estar la expresión de estos 11 miRNAs disminuida permite la activación de estas vías que es fundamental para el mantenimiento de las CTCs.

Al mismo tiempo que encontramos que estos miRNAs podrían estar regulando vías de señalización también nuestro análisis bioinformático sugería que estos 11 miRNAs podrían regular factores de pluripotencia como Nanog, Klf4 c-Myc, Smad4, GATA. Todos ellos factores de transcripción de pluripotencia, que son reguladores críticos de auto-renovación, pluripotencialidad en células troncales y mediadores de la proliferación en tumores (100) como se muestra en la Figura 20 y figura 21.

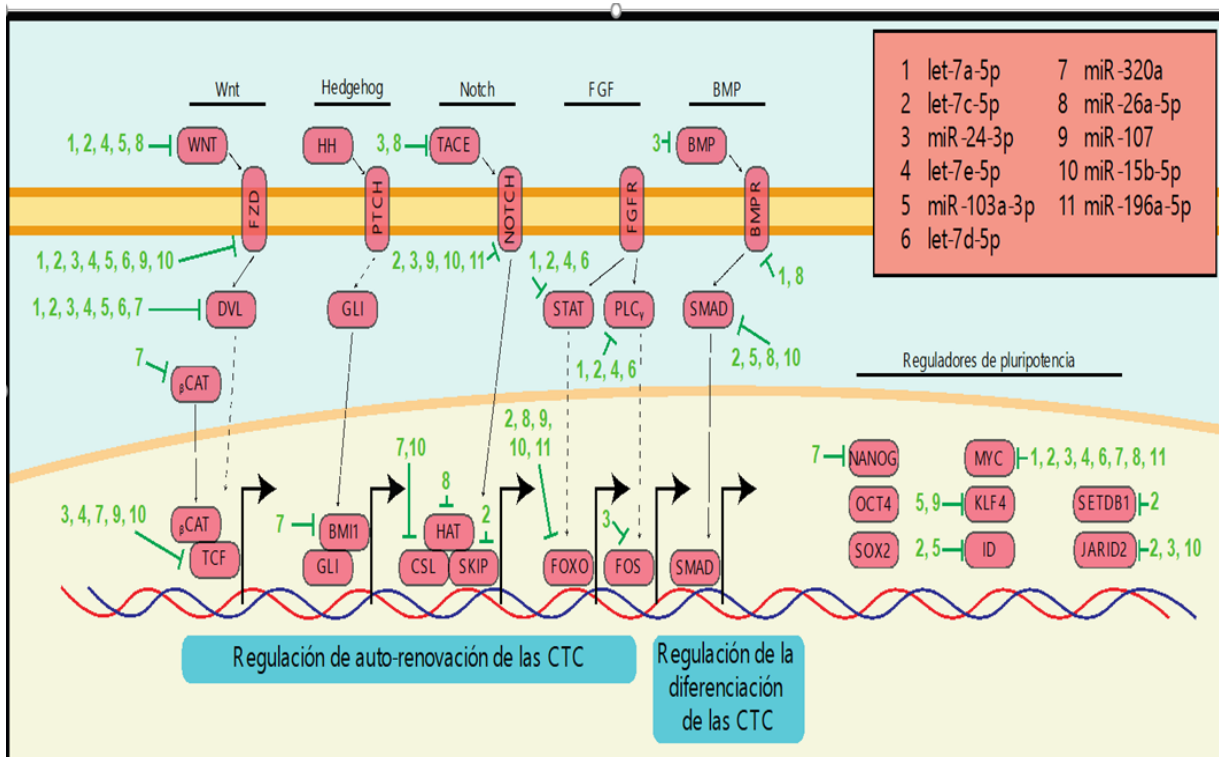


Figura 21. Esquema que muestra de cómo podrían estar interactuando los miRNAs con sus mensajeros blancos, en vías de señalización importantes para el mantenimiento y diferenciación de las CTCs.

Para averiguar si realmente estos miRNAs podrían regular estos factores de transcripción utilizamos una matriz obtenida por Yannin en el 2015 (Tabla XIV) que nos indica el miRNA y el tipo de factor de pluripotencia con el que puede interactuar (mRNA blanco). Con la ayuda de esta matriz, encontramos que los 11 miRNAs identificados podrían tener como mRNA blanco varios factores de pluripotencia tales como: c-Myc, Lin28A/B, Sall4, Oct4, Smad4, GATA3/6 y Nanog (Tabla XV).

Tabla XIV. Matriz de miRNAs que interactúan con factores de transcripción (50)

miRNAs with binding sites to the mRNA of pluripotency-associated factors											
Gene	miRNA	conserved sites				poorly conserved sites				Total Context score	Aggregate PCT
		Total 8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total 8mer	7mer-m8	7mer-1A				
oct4	miR-1955-5p	1	1	0	0	0	0	0	0	-0.47	N/A
oct4	miR-674/3473d	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.35	N/A
oct4	miR-881	1	1	0	0	0	0	0	0	-0.32	N/A
oct4	miR-212-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.19	N/A
oct4	miR-484	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.15	N/A
oct4	miR-673-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.14	N/A
oct4	miR-3971	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.13	N/A
oct4	miR-5104	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.13	N/A
oct4	miR-3106	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.12	N/A
oct4	miR-4661-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.12	N/A
oct4	miR-343	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.11	N/A
oct4	miR-669pl/669af-5p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.11	N/A
oct4	miR-466k/466di-5p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.1	N/A
oct4	miR-511-5p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.08	N/A
oct4	miR-802	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.07	N/A
oct4	miR-692	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.04	N/A
oct4	miR-762	0	0	0	0	1	0	1	0	N/A	N/A
oct4	miR-3085-5p	0	0	0	0	1	0	0	1	N/A	N/A
oct4	miR-1943	0	0	0	0	1	0	1	0	N/A	N/A
oct4	miR-218	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.32	< 0.1
oct4	miR-24	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.12	< 0.1
oct4	miR-138	0	0	0	0	1	0	1	0	N/A	< 0.1
oct4	miR-324-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.22	N/A
oct4	miR-542-3p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.18	N/A
oct4	miR-421	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.08	N/A
oct4	miR-186	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.06	N/A
sox2	miR-150/5127	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.24	0.2
sox2	miR-182	1	0	1	0	0	0	0	0	-0.18	0.3
sox2	miR-129-5p	0	0	0	0	3	1	2	0	-0.15	< 0.1
sox2	miR-21/590-5p	1	0	1	0	0	0	0	0	-0.14	0.27
sox2	miR-204/211	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.14	0.15
sox2	miR-200bc/429	1	0	1	0	0	0	0	0	-0.13	0.57
sox2	miR-132/212-3p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.09	0.11
sox2	miR-216b	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.07	< 0.1
sox2	miR-145	0	0	0	0	1	0	1	0	N/A	< 0.1
sox2	miR-450a	0	0	0	0	3	1	0	2	-0.8	N/A
sox2	miR-361-5p	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.34	N/A
sox2	miR-290-5p/292-5p	1	1	0	0	0	0	0	0	-0.33	N/A
sox2	miR-488	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.16	N/A
sox2	miR-382	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.11	N/A
sox2	miR-431	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.11	N/A
sox2	miR-384-3p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.1	N/A
sox2	miR-590-3p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.02	N/A
sox2	miR-340-5p	0	0	0	0	2	0	0	2	-0.02	N/A
sox2	miR-3093-5p	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.58	N/A
sox2	miR-719	1	1	0	0	0	0	0	0	-0.53	N/A
sox2	miR-511-5p	0	0	0	0	2	1	0	1	-0.4	N/A
sox2	miR-1900	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.32	N/A
sox2	miR-1894-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.28	N/A
sox2	miR-466n-3p	1	1	0	0	1	1	0	0	-0.27	N/A
sox2	miR-666-3p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.26	N/A
sox2	miR-678	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.23	N/A
sox2	miR-718	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.23	N/A
sox2	miR-669h-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.23	N/A
sox2	miR-490-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.22	N/A
sox2	miR-684	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.22	N/A
sox2	miR-3082-3p	0	0	0	0	2	0	0	2	-0.21	N/A
sox2	miR-3080-5p	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.21	N/A
sox2	miR-1968	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.21	N/A
sox2	miR-1954	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.2	N/A
sox2	miR-323-5p	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.19	N/A
sox2	miR-694	1	1	0	0	1	1	0	0	-0.18	N/A
sox2	miR-1930	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.17	N/A
sox2	miR-703	0	0	0	0	1	0	1	0	-0.16	N/A
sox2	miR-546	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.16	N/A
sox2	miR-669f-3p	1	1	0	0	0	0	0	0	-0.16	N/A
sox2	miR-3059	0	0	0	0	2	0	0	2	-0.16	N/A
sox2	miR-3473c	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.15	N/A

Tabla XV. Los 11 miRNAS identificados en este trabajo con sus probables mRNAs blanco

miRNAs disminuidos en paCTC	mRNA Blanco
hsa-let-7a-5p	Myc, Lin28A/B, ciclina D2, cdc34, Sall4
hsa-let-7c-5p	Myc, Lin28A/B, ciclina D, Sall4
hsa-let-7e-5p	Myc, Lin28A/B, NOCT, Sall4
hsa-miR-24-3p	Myc, Lin28A, OCT, Nanog, Smad4, GATA3/6, Oct4
hsa-miR-103a-3p	Klf4, Myc, Lin28A
hsa-miR-320^a	Myc, Nanog
hsa-miR-26a-5p	Myc, Lin28B, Smad4, Klf4
hsa-miR-107	Myc, Lin28B, Klf4
hsa-miR-15b-5p	Myc, Lin28B, Sall4, RexO1
hsa-miR-196a-5p	Myc, Lin28B, GATA6
hsa-let-7d-5p	Myc, Lin28A/B, ciclina D2, Sall4

Estos resultados fueron corroborados al comparar nuestros miRNA con los miRNA identificados en dos estudios realizados en mCTE por Wang en el 2007 y por Yanni en el 2015 en donde se identificaron miRNAs implicados en diferenciación de células troncales (82,101), los cuales están disminuidos en las células troncales y se incrementan durante la diferenciación de las mismas, ya que regulan negativamente la expresión de factores de pluripotencia. Nosotros, identificamos al menos a 4 de nuestros 11 miRNA (let-7c, let-7d, miR-24-3p y miR-26a) (Figura 22). Lo que nos permite sugerir que al menos estos 4 miRNAs podrían regular

negativamente la expresión de genes de pluripotencia (c-Myc Lin28A/B, Sall4, Oct, Nanog Smad4, GATA3/6 y Klf4). Por lo que entonces su disminuida expresión no les permite ejercer su efecto supresor sobre el mRNA de estos FT y por lo tanto las células mantiene su estado *stemness* y no se diferencian.

A)

Top 15 miRNAs promoting differentiation in mESC (Yanni et al., 2015)	Top 32 miRNAs promoting differentiation in mESC (Wang et al., 2007)	Top 11 miRNAs that probably promoting differentiation in paCSC
let-7c	miR-122a	let-7a-5p
miR-129-5p	miR-345	let-7c
miR-9-5p	miR-450	let-7e-5p
miR-124-3p	miR-149	miR-24-3p
miR-24-3p	miR-199a	miR-103a-3p
miR-200c-3p	miR-218	miR-320a
miR-27a-3p	miR-127	miR-26a
miR-218-5p	miR-145	miR-107
miR-382-5p	miR-199b	miR-15b-5p
miR-32-5p	miR-216	miR-196a-5p
miR-300-3p	miR-362	let-7d
miR-27b-3p	miR-452	
miR-29b-3p	miR-26a	
miR-135b-5p	miR-134	
miR-31-5p	miR-193	
	let-7d	
	miR-128a	
	miR-34c	
	miR-409	
	miR-422b	
	miR-468	
	miR-129-5p	
	let-7b	
	let-7c	
	miR-100	
	miR-140	
	miR-18	
	miR-31	
	miR-384	
	miR-464	
	miR-465	
	miR-99b	

B)

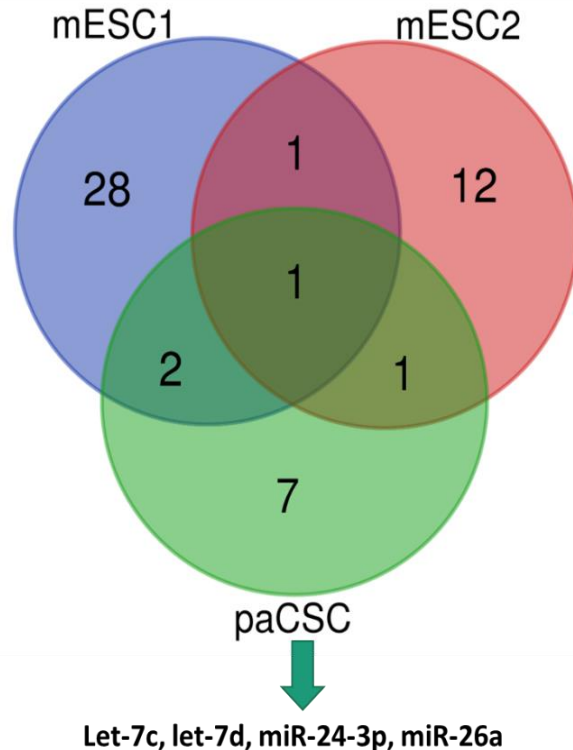


Figura 22. Cuatro de los 11 miRNAs identificados se comparten con miRNAs que participan en la diferenciación de las células troncales embrionarias de ratón. A) miRNAs que se encuentran involucrados en el proceso de diferenciación B) Diagrama de Venn mostrando que muestra como 4 miRNAs de nuestro análisis se comparten con miRNAs que participan en la diferenciación de las células troncales embrionarias de ratón con dos trabajos previos (115,116)

Para conocer si realmente estos miRNAs podrían interactuar con factores de transcripción implicados en pluripotencia se usó el programa *TargetScan*. Como esperábamos todos estos miRNAs tienen una secuencia complementaria con

varios factores de transcripción implicados en pluripotencia en su región 3UTR. Ejemplos representativos se muestran en la figura 23 en donde podemos apreciar que varios factores de transcripción como c-Myc, Nanog y Oct4 podían ser blanco de un mismo miRNA, ya que todos estos FT tienen la secuencia UGAGCC en su región 3'UTR que es complementaria a la secuencia semilla ACUCGG del miR-24. También encontramos que varios miembros de la familia Let-7a/c/e y el miRNA24-3p pueden tener como mRNA blanco al factor de transcripción c-Myc. Así como varios mRNA blancos implicados en vías de señalización todos ellos controlados probablemente por un solo miRNA (Let-7e-5p). Por lo que entonces todos estos datos nos indican que los 11 miRNAs identificados parecen estar involucrados en regula vías de transducción de señal y factores de pluripotencia de las paCTC.



Figura 23. Interacciones miRNA-mRNA blanco, predichas a través de Target Scan.

Por lo que estos datos sugieren que efectivamente estos miRNAs podrían estar presentes en las paCTC-like y participar en el proceso de diferenciación de estas, al igual que regulando la pluripotencialidad de las CTC, mediante la regulación en la expresión de factores de transcripción o a mensajeros que codifican a las proteínas que participan en vías de señalización.

DISCUSIÓN

El ACDP, es el más importante cáncer pancreático y sigue siendo uno de los cánceres más letales con una alta tasa de mortalidad debido a su crecimiento agresivo, alta tasa metastásica y recurrencia. Estudios recientes sobre células troncales cancerosas (CTC) han sugerido que el crecimiento agresivo, la alta tasa metastásica y la recurrencia pueden ser causados por la capacidad de las CTC de autorrenovarse, diferenciarse e impulsar la tumorigénesis. Por lo tanto, se espera que las CTC sean un objetivo terapéutico para el ACDP. Por lo que entonces entender los mecanismos moleculares que participan en la autorenovación, pluripotencia y diferenciación de las células troncales es muy importante. Dentro de los mecanismos moleculares que regulan las propiedades *stemness* de las CTCs se encuentran los miRNAs, una clase de RNAs pequeños no codificantes, que modulan varias actividades biológicas de las CTC que van desde la invasión, metástasis, así como la resistencia a los fármacos. Por lo que la identificación de los miRNAs presentes en las paCTCs es importante ya que estos en un futuro podrían ser empleados como blancos terapéuticos contra este cáncer tan fatal.

Sin embargo, una enorme limitante en el estudio de estas células es el número tan reducido de células troncales que constituyen al tumor el cual es menor al 1% (102). Por lo que en un principio y para empezar el estudio de las CTCs en otros tipos de cáncer se comenzaron a utilizar medios sintéticos bien definidos suplementados con factores de crecimiento o citoquinas. Hoy en día, la mayoría de los cultivos de células troncales usan medios sin suero que contienen varios factores de crecimiento. Por ejemplo, uno de los principales factores solubles agregados al medio de cultivo para regular la autorrenovación de las células madre en humano es el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Otro factor empleado en el cultivo de células madre incluye miembros de la familia BMP, el cual junto con LIF soportan la autorrenovación de las células troncales en ratón. Más importante aún, actualmente también se emplea un cóctel de tres inhibidores de moléculas pequeñas CHIR99021, SU5402, y PD184352 dirigido hacia la glucógeno sintasa

quinasa-3, al receptor de FGF, a las tirosinas quinasa y a la cascada ERK respectivamente, las cuales participan en la autorrenovación de las mCTEs (103). Por lo que esto último sugiere que las CT pueden replicarse constitutivamente *in vitro* en ausencia de factores de crecimiento o citocinas.

En el caso del ACDP, el aislamiento de paCTC ha sido difícil debido a que el número de paCTCs presentes en cultivos 2D de líneas de células de cáncer pancreático es muy pequeño (0.1 al 1%) (63). Por esta razón en este trabajo se optó por utilizar un ensayo de formación de esferas que permitiera la proliferación celular en condiciones no adherentes (anoikis) (104). Esto porque ya ha sido publicado en otros tipos de cáncer que la formación de esferas es particularmente útil para enriquecer a esta pequeña subpoblación celular (91). Inicialmente las páncreo-esferas se cultivaron usando medio sin suero suplementado con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 un protocolo que fue descrito originalmente para las neuroesferas (105). Sin embargo, recientemente, fue publicado por el grupo de Toshiyuki en el 2019 que la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1, es capaz de formar grandes esferas en medio que contiene solamente suero fetal bovino (SFB) al 10% y que además las esferas obtenidas muestran los mismos marcadores de superficie, capacidad tumorigénica, presencia de factores de transcripción pluripotentes (Oct4, Nanog, Sox2), que las esferas cultivadas en medio suplementado con EGF y bFGF2 (90).

En este trabajo decidimos utilizar solo medio suplementado con suero fetal bovino al 10% para obtener esferas a partir de la línea PANC-1. También crecimos a las células PANC-1 en presencia de EGF y bFGF2. De manera similar a lo reportado por el grupo de Toshiyuki, encontramos que las esferas obtenidas con el medio suplementado sólo con el suero fueron más grandes que las que se obtuvieron con el medio suplementado con factores de crecimiento (datos no mostrados). Además de que estas células también mostraron una alta capacidad tumorigénica en ratones desnudos, enriquecimiento de marcadores de superficie típico de células troncales pancreáticas (CD24+, CD44+ y CD133*) y niveles elevados de los factores de transcripción Oct, Sox2 y Klf4. Por lo tanto, todos estos datos nos sugieren que el

suero presente en el medio es suficiente para obtener las esferas y enriquecer las paCTC. Esto es posible porque ya sea reportado que en algunos tipos celulares por ejemplo las CT neurales se pueden obtener neuroesferas usando solo dos factores Oct4 y Nanog debido al elevado nivel de expresión endógena de Sox2 y c-Myc (106,107). Por lo que entonces nosotros sugerimos que probablemente las células de PANC-1 al igual que en las CT neurales podrían tener niveles elevados de estos factores de pluripotencia y que junto con algunos de los factores de crecimiento presentes en el suero son suficiente para obtener esferas enriquecidas en células paCTC-like. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que el ensayo de formación de esferas usando medio que contiene solamente suero puede ser útil para para enriquecer las paCTCs que ayudaran a descifrar las características de las paCTC, que permitirán desarrollar terapias anti-CTC contra el ACDP.

microRNAS implicados en la diferenciación de las células paCTC

El mal pronóstico del ACDP se debe principalmente a que en el 80% de los casos esta enfermedad es diagnosticada en etapas tardías cuando el tumor ya no es resecable y solo la quimio o radioterapia son empleadas para combatir esta enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos los pacientes generan resistencia a ambos tratamientos. Esto se debe a que una pequeña población de células que constituyen al tumor denominadas paCTC, son resistentes a estos tratamientos y eventualmente dan lugar a nuevos tumores en los sitios primarios o metastásicos (84,92). Por lo que creemos que una terapia dirigida a las paCTC serviría como tratamiento para prevenir la aparición de tumores nuevos. Es por esta razón que en este trabajo nos dimos a la tarea de identificar a los microRNAs presentes en las células paCTC. Para lo cual empleamos un microarreglo de Affymetrix V4 que nos permitió identificar 42 miRNAs presentes en las células *paCTC-like* obtenidas en este trabajo. De estos 42 miRNA solo 11 de ellos están relacionadas con las vías que regulan la pluripotencia por lo que decidimos trabajar con estos 11 miRNAs. Un análisis de las posibles vías en las que estos 11 miRNAs

podrían estar involucrados arrojo que estos podrían regular vías de transducción de señales como Wnt, Hedgehog (Hh), Notch, FGF y BMP (Figura 21). Este resultado no fue tan inesperado ya que sea demostrado que varias vías de transducción de señal como Wnt / β -catenina, Notch, Hedgehog y BMP juegan un papel clave en la biología de las CTCs al regular diferentes propiedades como la autorenovación, diferenciación, decisión de linaje, y supervivencia (108).

Una de las vías en donde 10 de los 11 miRNAs identificados parecen estar involucrados es la vía canónica de Wnt/ β -catenina. Esta vía promueve la iniciación del tumor, progresión y quimioresistencia y se encuentra activada de manera aberrante en diferentes tipos de cáncer y además se ha encontrado que es una vía importante en la biología de las CTC (109). De manera normal cuando el ligando de Wnt se une al receptor Frizzled (Fz) y/o a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 5/6 (LRP-5/6), el dominio citoplásmico de LRP es fosforilado y secuestra a GSK3B y Axin para posteriormente reclutar a la proteína Disheveled (Dvl) a la cual fosforila, en consecuencia, se libera la β -catenina del complejo de destrucción [formado por Axin, poliposis coli adenomatosa (APC), caseína quinasa 1 α (CK1 α) y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β)], y ahora está se acumula en el citoplasma para translocarse hacia el núcleo, donde, junto con los factores de transcripción TCF / LEF, activará la expresión de sus genes blanco (WNT3A, TCF4, OCT4 y c-MYC), los cuales participan en regular la expresión de genes de pluripotencia (110). Por lo que entonces la sobreexpresión de β -catenina permite enriquecer la población de células troncales cancerosas. En este trabajo encontramos que en caso de las paCTCs 10 de los 11 miRNAs identificados regulan a diferentes niveles la vía de Wnt (Figura 21). Ocho de estos miRNAs (Let7a/c/d/e-5p; mir24-3p, miR-103a-3p, miR-107 miR15b-5p), de acuerdo con nuestro análisis informático podrían regular negativamente al receptor FZD. Mientras que los miRNAs (Let7a/c/e-5p; miR103-3p y miR26a-5p), actúan negativamente sobre el ligando Wnt. También se encontraron siete miRNAs (Let7a/c/d/e-5p; mir24-3p, miR-103a-3p y miR-320a) que podrían regular negativamente a DVL, un miRNA que regula negativamente a β -catenina (miR-320a) y cinco miRNAs (mir24-3p, let-7e-5p, miR-320a, mir-107 y miR.15b-5p) que disminuirían la expresión del mRNA

que codifica para el factor de transcripción TCF (Figura 21). Esto último es importante si consideramos que se ha encontrado que TCF3 en ausencia de β -catenina funciona como un represor de Oct3/4, Sox2 y Nanog, mientras que una vez que β -catenina se une a TFC3 inhibe esta represión al convertir a Tcf3 en un activador. Además de que β -catenina activa interacciona con Oct4 y mejora su actividad de manera independiente de Tcf3. Sin embargo, al estar estos 10 miRNAs disminuidos no ejercen su expresión sobre los mRNA blanco permitiendo entonces que esta vía se encuentre activa y desregulada para que así la vía de Wnt este constitutivamente activa y permita la expresión de genes implicados en la sobrevivencia y mantenimiento de células paCTC tales como los factores maestros de pluripotencia Oct4 y c-Myc.

La segunda vía más regulada por los 11 miRNAs identificados en este trabajo corresponde a la vía de Notch. La vía canónica de Notch tiene cuatro receptores Notch (Notch1-4) y cinco ligandos (DLL1, 3-4, Jagged 1-2), es una vía de señalización celular evolutivamente conservada que desempeña papeles importantes en la determinación del destino celular, la diferenciación, desarrollo, proliferación celular y muerte. Porque el papel de Notch depende del tejido y contexto celular, las alteraciones dentro de esta vía pueden conducir a fenotipos supresores de tumores u oncogénicos. La vía de Notch es activada cuando un ligando expresado en una célula se une al receptor presente en la célula adyacente. Esta interacción inicia la ruptura proteolítica del dominio citoplásmico del receptor, primero por una desintegrina y metaloproteasa (TACE/ADAMs) y después por la γ -secretasa. Esta doble ruptura, libera al dominio intracelular de Notch en el citoplasma para posteriormente translocarse al núcleo y unirse a una proteína reguladora de genes que pasa de ser un represor transcripcional a un activador transcripcional activando entonces una serie de genes de respuesta a Notch como por ejemplo c-Myc, ciclina D1, p21, NFkB2, Ifi201, Ifi204 y ADAM19 (111). Los cuales participan de manera importante en regular genes de pluripotencia a través de Myc y regular el ciclo celular de las CTC, así como activar otras vías de transducción de señal que permiten mantener el estado de pluripotencia de las CTCs. Además de que la activación de Notch es necesaria para mantener el estado

no diferenciado de las células CTC y la autorenovación, crecimiento y metástasis de las CTCs (96). En el caso del cáncer de páncreas, ya se ha reportado que la vía de Notch es la que se encuentra más activada en las paCTC y que esto incrementa la autorenovación de las paCTC en el ACDP (112). Por lo que nuestros datos refuerzan nuevamente el papel que la vía de Notch puede tener en la biología de las paCTC. Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que Wnt es la vía más regulada por estos 11 miRNAs, mientras que en el caso de la vía de Notch sólo 7 (let-7c-5p, mi-24-3p, miR-320a, miR-26a-5p, miR107, miR15b-5p y miR-196a-5p) de los 11 miRNAs identificados parecen estar participando en esta vía a diferentes niveles. 5 miRNAs (let-7c-5p, mi-24-3p, miR107, miR15b-5p y miR-196a-5p) parecen que ejercen su función sobre el receptor (Notch) , 2 miRNAs (mi-24-3p y miR-26a-5p), sobre la metaloproteasa TACE y cuatro sobre factores de transcripción (miR-320a, miR-26a-5p, miR15b-5p y let-7c-5p). Nuevamente todos estos miRNAs los encontramos disminuidos en nuestras células paCTC (Figura 21). Nosotros proponemos que entonces al estar disminuidos estos miRNAs no pueden actuar sobre su mRNA blanco y por lo tanto dejan que las proteínas se expresen lo que conduce a que la vía quede activada sosteniendo de esta forma el fenotipo de las paCTCs y evitando llevarlas a células diferenciada. Esto se ve apoyado porque se ha demostrado que al menos 4 de los miRNAs identificados pertenecientes en a la familia let-7 en el intestino miRNAs Let7c, también se encuentran disminuidos en las células troncales presentes en las criptas del intestino y que el incremento de estos miRNAs conduce a la inhibición de la vía de Notch y conlleva a su diferenciación en células caliciformes (113).

Otra vía implicada en la autorenovación y mantenimiento de las células CTC es la vía de Hedgehog (Hh). Durante el desarrollo de tumor, la vía de Hh tiene tres principales funciones: 1) conducir el desarrollo del tumor 2) promover el crecimiento del tumor y 3) regular las células de cáncer residuales después de la terapia. Basado en estas funciones la vía Hh aberrante juega un papel causal en las CTC y realiza funciones clave en el mantenimiento del *stemness*, la autorrenovación y regeneración de las CTC. La proteína Hh secretada actúa de manera dependiente de la concentración y el tiempo para iniciar una serie de respuestas celulares, como

supervivencia celular, proliferación y diferenciación. Después de recibir la señal Shh, el receptor de proteína transmembrana PTCH bloquea la inhibición de la proteína transmembranal SMO, que induce que Gli1/2 se separe de SUFU y entre en el núcleo para regular la transcripción de genes como BM1, Wnt2, ALDH1, Twist 1, c-Myc, Snail, Nanog, Oct4 y Jagged-1. De esta forma al activar la expresión de varios genes implicados en la transición epitelio mesénquima (EMT) (por ejemplo., Snail Twist), promueve el proceso de transición epitelio mesénquima EMT para adquirir *fenotipos stem cell-like*. También esta vía regula la expresión de dos factores de pluripotencia (Nanog y Oct4), los cuales como se explicó en la introducción promueven la expresión de genes implicados en pluripotencialidad. Hasta la fecha, se conocen varios miRNAs que regulan esta vía de señalización en Glaucoma. Por ejemplo, un incremento del miR-214 reprime la inhibición de SUFU sobre las proteínas Gli; mientras que la disminución en los niveles del miR-324-5p, miR-326 y miR-125b conducen a una sobreexpresión de los factores de transcripción Smo y Gli (114). En el caso del cáncer de páncreas, recientemente se reportó que la vía de Hh se encuentra activa en células de cáncer pancreático derivados de tumor que exhiben propiedades de CTC y que la inhibición de la vía de Hh a través del *knockdown* de SMO bloquea la autorenovación, EMT, invasión, quimioresistencia y tumorigénesis de las paCTC. Por lo que todos estos antecedentes sustentan que la vía de Notch es indispensable para las paCTC. Sin embargo, en este trabajo y en contraste con los miRNAs que podrían regular a las vías de Wnt y Notch, solamente 1 de los 11 miRNAs estudiados en este trabajo (miR-320a), se encontró que podría regular negativamente al factor de transcripción BMI1. BMI1 es un componente clave del complejo Polycomb (PC). Esta proteína se encuentra sobre-expresada en adenomas colorectal y en carcinomas y su pérdida en CT intestinales decrece su proliferación y promueve su diferenciación (115). Además, BMI1 promueve la proliferación por suprimir la expresión de p16 y p14 disminuyendo de esta forma el *check-point* del ciclo celular en las células CTC. Además de que BMI induce la EMT por actuar sobre el gen supresor PTEN e induciendo la EMT. Por lo que entonces en las CTC BMI-1 juega un papel importante en el EMT y el proceso de *stemness* (116) Por lo que el miR-320a al estar disminuido no ejerce su función negativa sobre

las paCTC y permite que BMI-1 mantenga la autorenovación y metástasis en paCTC.

Finalmente, también encontramos que las vías BMP y FGF, podrían ser reguladas por estos 11 miRNAs. Las BMP pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento de transformación beta ($TGF\beta$). Hasta la fecha se ha encontrado que la vía BMP bloquea la diferenciación neuronal de las células ES y mantiene la pluripotencia de las células hES al establecer un equilibrio con la señalización del factor de crecimiento básico (bFGF). Esta vía además regula la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (117). Además de que FGF coopera con BMP en regular la auto-renovación de las células hES a través de la vía Erk / P38 MAPK o la señalización bFGF / Stat3.

BMP funciona a través de la señalización intracelular mediada por el receptor y posteriormente influye en la transcripción del gen objetivo. Se requieren dos tipos de receptores en este proceso, tipo I y tipo II. Si bien solo hay un receptor BMP tipo II (BmprII), hay tres receptores tipo I: Alk2, Alk3 (Bmpr1a) y Alk6 (Bmpr1b). Las diferentes combinaciones de tipo II con cualquiera de los receptores de tipo I pueden determinar la especificidad y dar lugar a diferentes consecuencias. Hay dos vías de señalización bien definidas involucradas en la transducción de señales BMP. La vía canónica de BMP la cual ocurre a través de la fosforilación mediada por el receptor I de Smad1, Smad5 o Smad8 (R-Smad). Dos R-Smads fosforilados forman un complejo heterotrimérico con un Smad4. El complejo heterotrimérico se transloca al núcleo y coopera con otros factores de transcripción para modular la expresión de genes (118-122). Una vía paralela a la señal de BMP es la mediada por la tirosina quinasa 1 activada por $TGF\beta$ 1 (TAK1, una MAPKKK) y a través de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (118,119,123), que también implica conversaciones cruzadas entre las vías BMP y Wnt (124–127) indispensable para mantener el estado *stemness* de las CTCs.

En este trabajo también encontramos que 9 de los 11 miRNAs identificados (let-7a/c/e-d-5p, miR24-3p, miR-26a-5p, miR-107, miR15b-5p y miR-196a-5p) regulan factores de transcripción tales como STAT, FOXO y FOS, los cuales junto con la vía

FGF participan en regular la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Por lo que una vez más al estar disminuida la expresión de estos 9 miRNAs, no actúan sobre sus mRNA blanco y permiten mantener el estado no diferenciado de las paCTC.

De esta forma estos miRNAs contribuyen a mantener una expresión alta de cada una de las vías las cuales entre si actúan de manera concertada para incrementar la expresión aberrante de estas vías (Figura 24). Por lo que nuestros datos apoyan que los miRNAs desempeñan un papel vital en diversos mecanismos de desarrollo y regulación de las células madre, por regular de manera coordinada la acción de varias vías de señalización

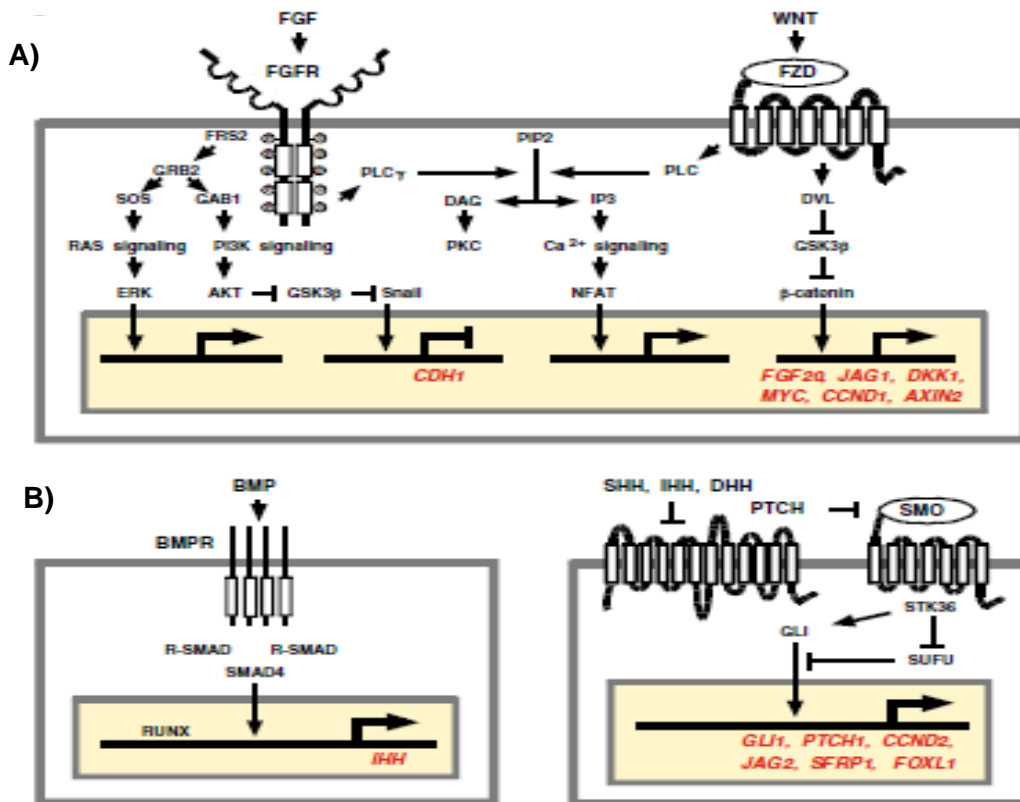


Figura 24. Diagrama que esquematiza las vías de señalización de células troncales. en A) Comunicación entre vías de señalización Wnt y FGF. B) Comunicación entre las vías de señalización BMP y Hedgehog (127).

CD133 como un marcador de selección de células paCTC no diferenciadas

Uno de los resultados más inesperados de este trabajo fue el haber identificado 42 miRNAs que se encuentran expresados diferencialmente a la baja con respecto a las células no *paCTC-like* triple negativas. La pregunta que surgió en ese momento fue ¿cómo habíamos logrado seleccionar esta población de células? Al revisar la literatura encontramos que CD133 es una proteína transmembranal que es frecuentemente expresada en las células CTC y que mantiene las propiedades de las CT por suprimir la diferenciación de estas en el cáncer colorectal y pancreático (128,129). La manera en que CD133 logra esto es porque la expresión del marcador de superficie CD133+ en las células CTCs es modulada por la activación o represión de las vías de transducción de señal como Wnt, Notch, Hh, BMP y FGF. La disfunción de estas vías contribuye a que de manera anormal en las células CTC CD133+, se promueva su autorenovación, proliferación, resistencia a apoptosis, quimioterapia, incrementa su invasividad, metástasis y recurrencia del cáncer, pero no su diferenciación (130,131). ¿Pero cómo cada una de estas vías contribuye para lograr esto? Se ha demostrado que CD133 puede promover proliferación clonal por controlar la vía de Wnt al regular los niveles de β -catenina(132). Por otro lado, la vía de Notch induce la expresión de CD133 en melanoma lo cual promueve la migración celular y angiogénesis (133). Además de que la sobre activación de la vía de Notch, aumenta los niveles de CD133 lo cual a su vez activa a la vía MAPK y esto conduce a la expresión de las metaloproteasas 2/9 y del factor de crecimiento endotelial (133). Para la vía de señalización Hh, esta se encuentra anormalmente activada en células CTC CD133+ de cáncer de hígado y esto les permite a las CTC mantener el estado *stemness* (134). Finalmente, la vía de señalización BMP tiene un papel clave en regular a las células CTC CD133+ ya que una menor expresión de BMP4 incrementa la expresión de CD133 y disminuye la diferenciación de las CTC (135). Por lo que en base a todo lo anterior nosotros creemos que al haber seleccionado células CD133+ pudimos recuperar una población de células paCTC que pueden autorenovarse pero no diferenciarse y que esta es la razón por la cual tenemos muchos miRNAs implicados en la diferenciación que en las paCTCs obtenidas en

este trabajo su expresión está disminuida permitiendo de esta forma mantener el fenotipo de troncalidad.

11 microRNA están presentes en las paCTC que promueven su diferenciación

Las células troncales sufren divisiones simétricas y asimétricas para generar células diferenciadas y más células troncales. El balance entre autorenovación y diferenciación de las células troncales es controlado por factores de transcripción, mecanismos epigenéticos entre los que se encuentran los microRNAs. Los miRNAs están involucrados en regular la autorenovación y diferenciación de las células troncales por actuar sobre mRNAs que deciden el destino de las células troncales (136).

Sin embargo, durante mucho tiempo solo fueron estudiados y caracterizados los miRNAs que promueven la pluripotencia y la autorenovación de las CTC y cuya expresión es regulada por factores de transcripción como OCT4, Sox2, Nanog y Klf4, los cuales participan de manera importante en regular la expresión de genes importantes para el mantenimiento de la *stemness* (38,100). Pero además y de manera inesperada se encontró que estos miRNAs a su vez regulan la expresión de estos factores *stemness* para promover su autorenovación (137). Por ejemplo, la expresión de *cluster* miR302-367 es incrementada en las células troncales y decrece después de la diferenciación. La re-expresión del *cluster* miR-302-367 reprograma a células somáticas de ratón y humano a un estado de pluripotencia (138) con alta expresión de los factores de transcripción OCT3/4, Sox2 y Nanog. Adicionalmente, se encontró que la expresión de este *cluster* puede ser regulada por dos factores de transcripción requeridos para el mantenimiento de las células troncales Oct4 y Sox2. Es decir, hay un *loop* de retroalimentación que permite promover la expresión de estos miRNAs los cuales a su vez mantienen la expresión de estos factores de pluripotencia. Por lo que entonces Oct4/Sox2-miR302 pueden jugar un papel importante en mantener la pluripotencia y autorenovación de las

células troncales. Otros miRNAs bien estudiados que participan en la autorenovación de las células troncales son los miRNAs que regulan el ciclo celular de las células troncales denominados miRNAs ESC, un ejemplo de estos es el *cluster* miR-520, miR-92(139).

Sin embargo, el estudio de los miRNAs que puedan suprimir la autorenovación y promover la diferenciación en las CTC ha sido poco estudiado y no fue hasta el 2008 que se identificaron y estudiaron los primeros miRNA implicados en la diferenciación de las células troncales en ratón (140-142). Un ejemplo de un miRNA implicado en la diferenciación es el miR-21(140), cuyos niveles de transcripción aumentan después de la inducción de la diferenciación de células ES de ratón. Esto se debe a que la secuencia semilla de este miRNA tiene sitios de unión potenciales para la región 3'UTR de los RNA mensajeros que codifican para Nanog, SOX2 y posiblemente OCT4. Tres proteínas clave que participan en regular la expresión de genes implicados en la autorrenovación y pluripotencialidad de las células ES. Al mismo tiempo se identificaron otros tres miRNAs relacionados con la diferenciación de las células CT, miR-134, miR-296 y miR-470, los cuales también tienen como mRNA blanco las regiones codificadoras del RNA mensajero de Nanog, SOX2 y OCT4 (141). Siendo la primera vez que se demostraba que los miRNAs pueden regular la expresión de genes no solo por reconocer la región 3'UTR de sus mensajeros blanco sino también por reconocer secuencias presentes en las regiones codificadoras. Por lo tanto, los miRNA específicos de células ES relacionados con la diferenciación parecen promover la diferenciación al actuar dentro de estas células troncales por reducir las concentraciones de proteínas clave involucradas en la autorrenovación y pluripotencia (142). En el 2015 Yannin, por comparar los patrones de expresión de miRNAs presentes en CTE de ratón en un estado indiferenciado con los miRNAs que se encontraban expresados en las CTE diferenciadas los llevo a identificar 40 miRNAs y mediante ensayos funciones encontraron 15 nuevos miRNAs que favorecían la formación de colonias diferenciadas, inhibían la expresión de factores de pluripotencia y disminuían la proliferación celular y su capacidad de autorenovación. Ellos demostraron experimentalmente que estos miRNAs ejercen un efecto negativo sobre los mRNAs

que codifican para genes como OCT, Sox2, c-Myc , Klf4 , Sal4 al unirse a la región 3'UTR de los RNAm de estos genes. En este trabajo nosotros identificamos que 4 de los 11 miRNAs identificados en las paCTC-like. (miRNAs let-7c, let-7d, miR-24-3p y miR-26a) podrían estar involucrados en promover la diferenciación de las paCTC nuevamente tomando en base los datos reportados previamente por Yannin y Wang (82,101).

En el caso de miR-24 identificado en este trabajo, se le considera un miRNA anti-pluripotente ya que tiene como blanco las regiones 3'UTR de factores esenciales en la red de pluripotencia como Oct4, Nanog, Klf4 y c-Myc (143). Además de que se ha demostrado experimentalmente que la introducción de este miRNA en las células troncales de ratón conduce a la diferenciación de estas células y disminuye la expresión de factores de pluripotencia. Por lo que tomando en base lo reportado en la literatura proponemos que en el caso de las paCTC los niveles disminuidos de este miRNA promueven la expresión de los factores de pluripotencia promoviendo el mantenimiento de las paCTC.

Otro miRNA identificado en este trabajo fue el miR-26a, este tiene como blanco al mRNA del gen HOXC9 el cual promueve la metástasis y un fenotipo *stem cell-like* en cáncer gástrico, y estos fenómenos son revertidos al restauran la expresión de miR-26a (144). Además de que Wang en el 2007 encontró que miR-26a promueven la diferenciación de mESC, y que se encuentra disminuido en las mESC (101). Por lo que en nuevamente en base estos datos creemos que la disminución del miR-26a promueve el fenotipo *stemness* de las paCTC y bloquea la diferenciación de células troncales cancerosas pancreáticas.

Otra manera en que la función de los miRNAs puede ser regulada es a nivel de la biogénesis del miRNA. El ejemplo más estudiado es lo que ocurre en el miRNA-Let 7. let 7 es una familia de miRNAs constituida por 12 miembros (let-7-a1, a2, a3, b, c, d, e, f1, f2, g, i y miR-98) localizados en 8 cromosomas diferentes. Los miembros de esta familia participan en la diferenciación de las células troncales, por lo que se encuentran disminuidos en las células troncales. El bloqueo en el procesamiento de pri y pre-miRNAs de la familia let-7 a su forma madura ocurre a través de la

proteína Lin28. La cual se une específicamente a nucleótidos conservados en la región del bucle del pri-miR-let-7 e inhibe la actividad de Drosha y Dicer. La ausencia de let-7maduro no permite que identifique a su RNAm blanco y entonces ya no promueve la diferenciación de las células CTC. Por lo que entonces niveles elevados de miembros de la familia Let-7 conduce a la diferenciación de las células stem cells. Lin28 se encuentra frecuentemente sobre expresado en cáncer y promueve la transformación neoplásica mediante la represión de let-7, el cual actúa como tumor supresor inhibiendo la expresión de oncogenes clave como RAS, MYC y HMGA2 (145,146).

Otro proto-oncogen que es blanco de let-7 es MYC, dicho gen puede regular la proliferación celular, apoptosis y su desregulación frecuentemente aparece en diversos tumores y es asociado con un estado avanzado del cáncer y a un mal prognosis (147). c-Myc ha sido reconocido como un importante regulador en la biología de las células troncales, la introducción de este factor con otros factores (Oct3/4, Sox2 y Klf4) genera células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células diferenciadas. Mientras que la exclusión de c-Myc de esta combinación, drásticamente se reduce la eficiencia de la producción de iPSC (38), lo que confirma su papel importante en el mantenimiento de las células troncales. Se ha observado que existe una sobreexpresión de c-Myc en células cancerosas de colon (148), al igual que en células troncales cancerosas de glioma, en donde se reportó que regulaba la autorenovación y la supervivencia de estas células (149). Por lo que nuevamente al estar los micro RNAs de la familia let7 disminuidos permiten la expresión de Myc y de esta manera se promueve y mantienen las células CTC.

Por lo que en nuestro trabajo la disminución de miembros de la familia let-7 podría evitar la diferenciación y mantener las células en un estado troncal y promover características como la autorenovación.

Hasta ahora ya han sido reportados algunos miRNAs involucrados en regular a las paCTC tales como miR-21, miR-34, miR-1246, miR-221, el *cluster* miR17-92, y las familias de Let-7 y miR-200 (38). De manera importante cinco de los 11 miRNA identificados en este trabajo (miR-103a-3p, miR-320a, miR-107, miR-15b-5p y miR-

196a-5p), no había sido identificados en las paCTC. Por lo que el estudio de estos miRNAs en la biología de las paCTC es una pregunta que queda abierta. Pero para tener una idea de los posibles blancos de estos 5 miRNAs se realizó un análisis *in silico* utilizando el programa *Target Scan*. Los resultados obtenidos revelaron que posiblemente todos ellos se pueden unir a la región 3'UTR del RNA, de Nanog, Myc y Lin28 principalmente así como Klf4 (Tabla XVI). Todos ellos factores que juegan un papel importante en el mantenimiento, autorenovación y pluripotencialidad de las células troncales pancreáticas.

Tabla XVI. Los miRNAs miR-103a-3p, miR-320a, miR-107, miR-15b-5p y miR-196a-5p 5 podrían reconocer la región 3' UTR de genes implicados en pluripotencia

miR-103a-3p	miRNA 3' agUAUCGGGACAUGUUACGACGa 5' : : : KLF4 5' ccAAAGTTTT-CAAAC TGCTGCa 3'
miR-320a-3p	miRNA 3' agcgGGAGAGUUGG GUCGAaaa 5' : NANOG 5' tcagCCTCCCGA-GCAGCTggg 3'
miR-107	miRNA 3' acUAUCGGGACAUGUUACGACGa 5' : : : KLF4 5' ccAAAGTTTT-CAAAC TGCTGCa 3'
mir-15b-5p	miRNA 3' acaUUUGGUAC-UAC--ACGACGAu 5' : LIN28B 5' agcACACC-TGTATGTATGCTGTTc 3'
mir-196a-5p	miRNA 3' ggGUUGUUGUACUUUGAUGGAu 5' : : : : MYC 5' agCCATAATGT-AAACTGCCTc 3'

Por lo que en conjunto todos estos datos y en analogía con lo reportado en otros tipo de células troncales. Proponemos que todos estos 11 miRNAs podrían participar en promover la diferenciación de las células troncales al regular de manera negativa a los factores de pluripotencia. Por lo que en las células troncales los niveles de estos miRNAs están disminuidos para que los factores de pluripotencia puedan permitir la expresión de los genes que permiten mantener el estado de pluripotencia y autorenovación de las CTC. Sin embargo, cuando las

paCTC reciben el estímulo para diferenciarse estos miRNAs incrementan su expresión y ahora pueden ejercer su efecto inhibitorio sobre los factores de pluripotencia reduciendo su expresión y permitiendo que las paCTC se diferencien (Figura 25).

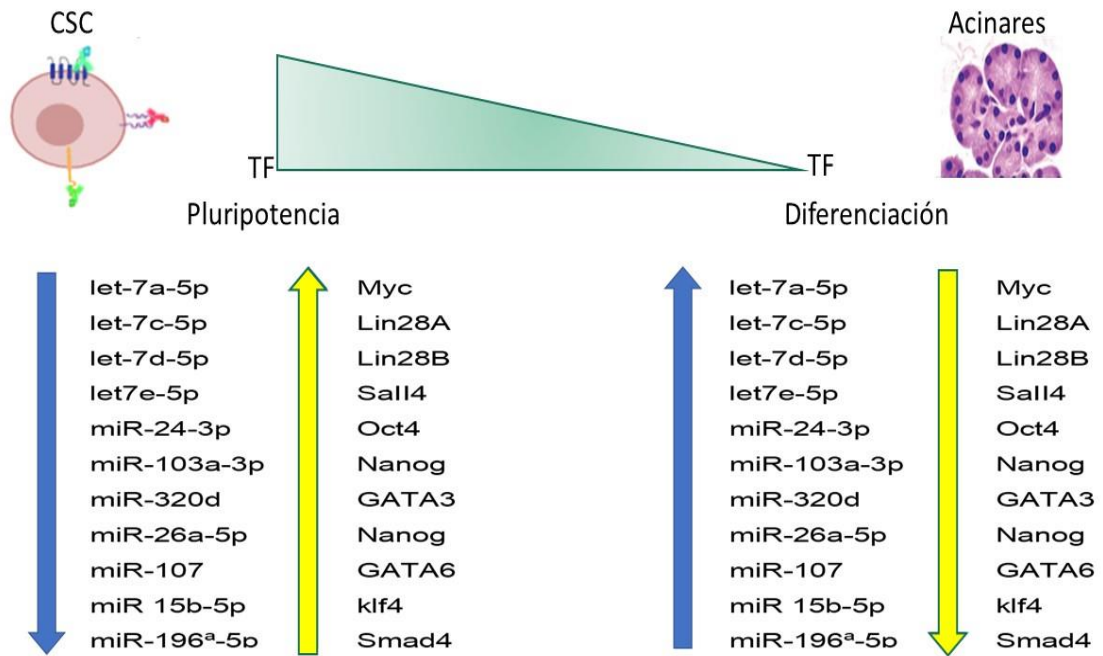
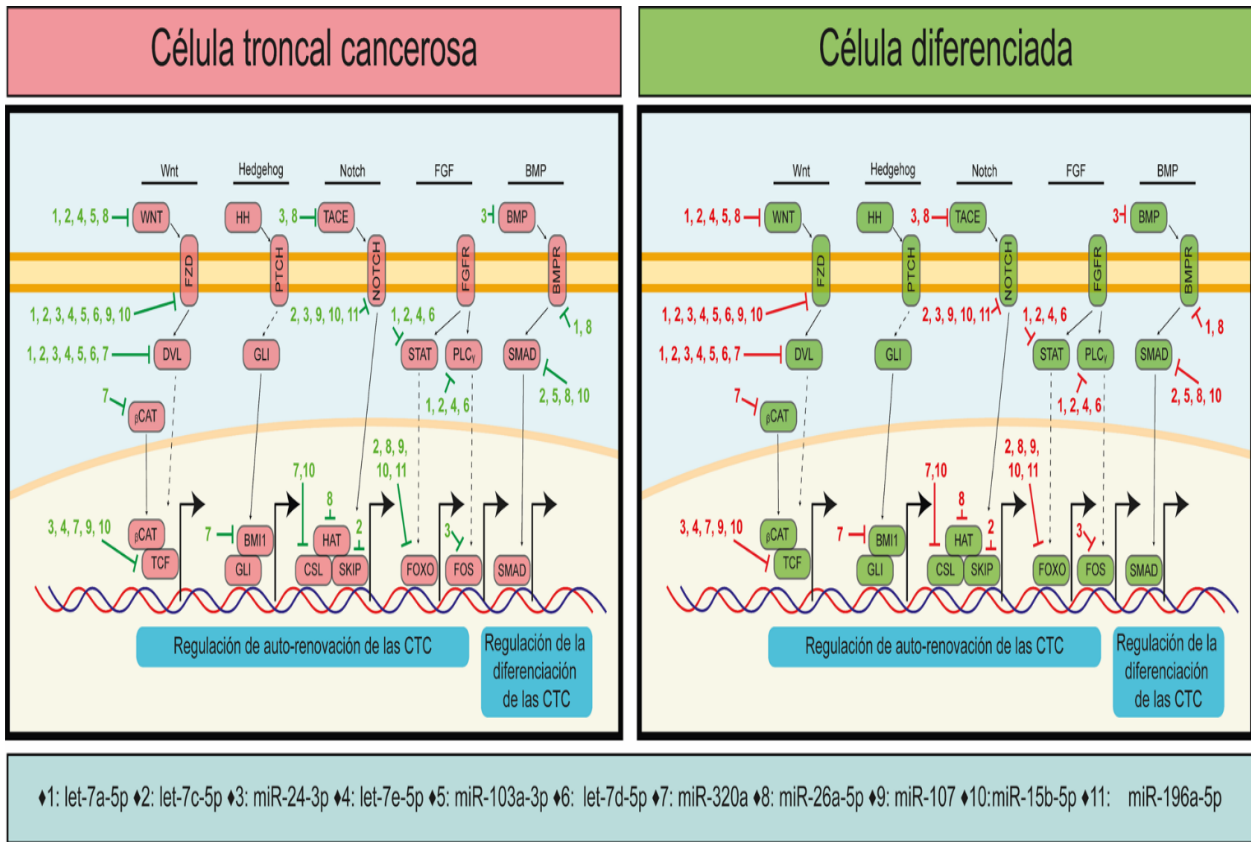


Figura 25. Los 11 miRNAs identificados en este trabajo miRNAs regulan negativamente a los factores de pluripotencia promoviendo de esta forma la diferenciación de las paCTC.

Un escenario similar podría estar ocurriendo cuando estos miRNAs se unen a receptores, ligandos, intermediarios y FT que son promovidos por las vías de transducción de Wnt, Hh, Notch, FGF y BMP. En donde cuando estos miRNAs están disminuidos permiten que estas vías de señalización se sobre-expresen y mantengan el estado *stemness*. Mientras que cuando los niveles de estos miRNAs se incrementan la homeostasis y regulación de estas vías ocurre y las paCTC se diferencian (Figura 26).



■ Sobreexpresado ■ Disminuido

Figura 26. Los 11 miRNAs identificados en este trabajo podrían estar regulando negativamente vías de señalización que permiten regular la autorenovación y diferenciación de las paCTC.

Por lo que entonces, de corroborarse estos resultados estos miRNAs podrían ser utilizados para disminuir la población de células paCTC por incrementar los niveles de expresión de estos miRNAs y de esta manera inducir que las paCTCs se diferenciaron previniendo de esta forma la aparición de nuevos tumores.

CONCLUSIONES

- Los miRNAs identificados en las paCTC, tienen un papel en el mantenimiento del fenotipo de pluripotencia en las células troncales cancerosas pancreáticas.
- Estos miRNAs tienen como mensajeros blancos genes que codifican para proteínas que son componentes de las vías de señalización de Wnt, Hh, Notch, BMP, los cuales están implicados en el mantenimiento de las células troncales cancerosas así como factores de transcripción pluripotentes como: Myc, Nanog, Klf4 y Sox2
- Estos 11 miRNAs, podrían actuar como represores de los factores de transcripción pluripotentes por lo que al encontrarse disminuidos no regulan negativamente dichos mensajeros, promoviendo su expresión y favoreciendo de esta manera un estado de pluripotencia en las paCTCs.
- Nuestros resultados sugieren que al estar disminuidos estos 11 miRNAs en nuestro modelo de paCTCs los componentes de las vías de señalización sobre los cuales actúan estos miRNAs se sobreexpresan y mantienen activas las vías de Wnt, Hh, Notch, BMP. Promoviendo así la pluripotencialidad y autorenovación de las paCTCS
- De corroborarse lo anterior, estos miRNAs podrían ser empleados como blancos terapéuticos para disminuir la población de CTC en el adenocarcinoma ductal pancreático.

PERSPECTIVAS

- Validación del microarreglo por RT-qPCRs.
- Identificación de 11 miRNAs en cultivos primarios de adenocarcinoma ductal pancreático.
- Realización de ensayos de sobreexpresión de miRNAs a través de mimics para evaluar su función.

REFERENCIAS

1. Longnecker DS, Gorelick F, Thompson ED. Anatomy, Histology, and Fine Structure of the Pancreas. In: Beger HG, Warshaw AL, Hruban RH, editors. The Pancreas An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery. 3rd ed. 2018.
2. Susan Standring, editor. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 2016.
3. The Pancreas and Its Functions, Columbia University Department of Surgery. <https://columbiasurgery.org/pancreas/pancreas-and-its-functions>
4. Sastre J, Sabater L, Aparisi L. INSUFICIENCIA PANCREÁTICA EXOCRINA. ¿CÓMO SE PRODUCE? ¿CUÁNDO Y CÓMO DIAGNOSTICARLA? ¿CÓMO TRATARLA? Fisiología de la secreción pancreática ESTRUCTURA DEL PÁNCREAS EXOCRINO. Vol. 28, Gastroenterol Hepatol. 2005 p. 3–9.
5. Tresguerres J. A. F. Fisiología humana. 3rd ed. 2005.
6. Lewis Brian, Mao Junhao. Development of the Pancreas and Related Structures. In: Beger HG, Warshaw AL, Büchler MW, Lerch MM, Neoptolemos JP, editors. The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery. 3rd ed. 2018.
7. Ho J, Li X, Zhang L, Liang Y, Hu W, Yau JCW, et al. Translational genomics in pancreatic ductal adenocarcinoma: A review with re-analysis of TCGA dataset. *Seminars in Cancer Biology*. 2019 Apr 1;55.
8. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*. 2014 Jun 1;74(11).
9. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*. 2019;10(1).
10. Mocchi Evelina, Klein Alison P. Epidemiology of Pancreatic Cancer. In: Warshaw A Gerald Austen F Hruban R Büchler M Lerch M Neoptolemos MA

- J Shimosegawa T Whitcomb, editor. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery*. 2018.
11. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. Vol. 22, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2016.
 12. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnqvist HJ, Larsson J. Pancreatic cancer is associated with impaired glucose metabolism. *The European journal of surgery = Acta chirurgica*. 1993 Feb;159(2).
 13. Arslan AA, Helzlsouer KJ, Kooperberg C, Shu X-O, Steplowski E, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Anthropometric Measures, Body Mass Index, and Pancreatic Cancer. *Archives of Internal Medicine*. 2010 May 10;170(9).
 14. Bracci PM. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Molecular carcinogenesis*. 2012 Jan;51(1).
 15. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, et al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *International Journal of Cancer*. 2010 Mar 15;126(6).
 16. Talamini G, Falconi M, Bassi C, Mastromauro M, Salvia R, Pederzoli P. Chronic pancreatitis: relationship to acute pancreatitis and pancreatic cancer. *JOP : Journal of the pancreas*. 2000 Sep;1(3 Suppl).
 17. American Cancer Society. *What Causes Pancreatic Cancer?* Published 2019. <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/causes-risks-prevention/what-causes>
 18. Matsubayashi H, Takaori K, Morizane C, Maguchi H, Mizuma M, Takahashi H, et al. Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues. *World journal of gastroenterology*. 2017 Feb 14;23(6).
 19. Stanger BZ, Dor Y. Dissecting the Cellular Origins of Pancreatic Cancer. *Cell Cycle*. 2006;5(1).
 20. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicines*. 2017 Nov 18;5(4).
 21. Meredith E. Pittman, Ralph H. Hruban. Pathology of Exocrine Pancreatic Tumors. In: Hans G. Beger ALW, Ralph H. Hruban, Markus W. Büchler,

- Markus M. Lerch, John P. Neoptolemos, Tooru Shimosegawa and DCW, editors. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery*. 3rd ed. 2018.
22. Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese JL, Büchler MW. *Pancreatic Cancer*. Pancreatic Cancer. Springer New York; 2018.
 23. Iguchi E, Safgren SL, Marks DL, Olson RL, Fernandez-Zapico ME. Pancreatic Cancer, A Mis-interpreter of the Epigenetic Language. *The Yale journal of biology and medicine*. 2016;89(4).
 24. Lomberk GA, Iovanna J, Urrutia R. The promise of epigenomic therapeutics in pancreatic cancer. *Epigenomics*. 2016 Jun;8(6).
 25. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000 Aug 1;6(8).
 26. Macgregor-Das AM, Iacobuzio-Donahue CA. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *Journal of surgical oncology*. 2013 Jan;107(1).
 27. Michaël Noë, Lodewijk A.A. Brosens, Johan Offerhaus. Pancreatic Cancer: Precancerous Lesions. In: Warshaw A, Gerald Austen F, Hruban R, Büchler M, Lerch M, Neoptolemos MA J Shimosegawa T, editors. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery*. 2018.
 28. Brosens LAA, Hackeng WM, Offerhaus GJ, Hruban RH, Wood LD. Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing “landscape.” *Journal of gastrointestinal oncology*. 2015 Aug;6(4).
 29. Madrigal Ureña A, Chaves DG. Cáncer De Páncreas: Alteraciones Genéticas, Cambios Morfológicos y Sus Implicaciones Terapéuticas. *Medicina Legal de Costa Rica Edición Virtual*. 2018;35(1).
 30. Hezel AF et al. *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma* *Genes Dev*. 2006 20(10)
 31. Vincent A. *Pancreatic cancer*. *Lancet*. 2011; 378(9791)
 32. María J, Planas M, Bueno G, Castillejo CR. Avances en cáncer de páncreas, del laboratorio a la clínica. 2010.

33. Chin V, Nagrial A, Sjoquist K, et al. Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;2018(3).
34. MensMMJ, Ghanbari M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem cell reviews*. 2018;14(3).
35. Mathieu J, Ruohola-Baker H. Regulation of Stem Cell Populations by microRNAs. In Springer, Dordrecht; 2013.
36. Muñoz L, Concha ML. Células troncales en el desarrollo y las perspectivas de reprogramación celular para la regeneración. *International Journal of Morphology*. 2012;30(4):1343-1347.
37. Boyer LA, Tong IL, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947-956.
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
39. H. Wu and Y. E. Sun. "Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation" *Pediatric Research*, vol. 59, no. 4, 2006
40. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1).
41. R. Eckert, Y. Kizilyer and C. Kerr, "Chapter 10: Epigenetic Reprogramming in Stem Cells" *Pluripotent Stem Cells* (2013).
42. Y. Atlasi and H. Stunnenberg, *The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development* 2017;18 (11)
43. Voigt, P., Tee, W. W., & Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. In *Genes and Development* (Vol. 27, Issue 12, pp. 1318–1338). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Ji, X. et al. *3D chromosome regulatory landscape of human pluripotent cells*. *Cell Stem Cell* 18, 262–275 (2016).
45. Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010 Oct;14(4).

46. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research*. 2019 Apr 23;47(7).
47. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(5).
48. McCleary-Wheeler AL, Lomberk GA, Weiss FU, Schneider G, Fabbri M, Poshusta TL, et al. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer letters*. 2013 Jan 28;328(2).
49. J. O'Brien, H. Hayder, Y.Zayed , C. Peng. *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9 (402)
50. Yuan K, Ai WB, Wan LY, Tan X, Wu JF. *The miR-290-295 cluster as multifaceted players in mouse embryonic stem cells*. *Cell and Bioscience*. 2017;7(1):
51. Lakshmi pathy U, Davila J, Hart RP. MiRNA in pluripotent stem cells. *Regenerative Medicine*. 2010;5(4):545-555
52. Jian-Fu Chen , et al. *microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7*. *J Cell Biol*. 2010 Sep 6; 190(5)
53. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*. 2009 Sep 4;138(5).
54. Valle S, Martin-Hijano L, Alcalá S, Alonso-Nocelo M, Sainz B, Jr. The Ever-Evolving Concept of the Cancer Stem Cell in Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2018 Jan 26;10(2).
55. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. *Cancer stem cells: implications for cancer therapy*. *Oncology (Williston Park)* 2014; 28
56. Plaks V, Kong N, Werb Z. *The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?* *Cell Stem Cell*. 2015; 16: 225-238

57. Santamaria S, Delgado M, Kremer L, Garcia-Sanz JA. *Will a mAb-Based Immunotherapy Directed against Cancer Stem Cells Be Feasible?* Front Immunol 2017; 8: 1509
58. Liu P, et al. *Liposome encapsulated Disulfiram inhibits NFκB pathway and targets breast cancer stem cells in vitro and in vivo.* Oncotarget 2014; 5
59. Lei Y, Zhang D, Yu J, Dong H, Zhang J, Yang S. *Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy.* Cáncer Lett 2017; 393
60. Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovská A. *A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms.* Semin Cancer Biol 2015; 31
61. Khan A, Ahmed E, Elareer N, Junejo K, Steinhoff M, Uddin S. *Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies.* Cells. 2019;8(8):840.
62. Al Haddad AH, Adrian TE. *Challenges and future directions in therapeutics for pancreatic ductal adenocarcinoma.* Expert Opin Investig Drugs 2014; 23
63. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. *Identification of pancreatic cancer stem cells.* Cancer Res 2007; 67
64. Dalla Pozza E, et al. *Pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines display a plastic ability to bi-directionally convert into cancer stem cells.* Int J Oncol 2015; 46
65. Rao CV, Mohammed A. *New insights into pancreatic cancer stem cells.* World J Stem Cells 2015; 7
66. Subramaniam D, Kaushik G, Dandawate P, Anant S. *Targeting Cancer Stem Cells for Chemoprevention of Pancreatic Cancer.* Curr Med Chem 2018; 25
67. C.D. Carlo, J. Brandi, D. Cecconi, *Pancreatic cancer stem cells: Perspectives on potential therapeutic approaches of pancreatic ductal adenocarcinoma.* World J Stem Cells. 2018; 10(11)
68. Jung DE, Wen J, Oh T, Song SY. *Differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells.* In: *Pancreas*. Vol 40. Pancreas; 2011:1180-1187

69. Yang Z, Zhang Y, Tang T, Zhu Q, Shi W, et al. Transcriptome Profiling of Panc-1 Spheroid Cells with Pancreatic Cancer Stem Cells Properties Cultured by a Novel 3D Semi-Solid System. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018 Jul: 47 (5).
70. Deer E, González-Hernández J, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Páncreas*. 2010 May: 39 (4).
71. S. Gou *et al.*, "Establishment of Clonal Colony-Forming Assay for Propagation of Pancreatic Cancer Cells With Stem Cell Properties," *Pancreas*, vol. 34, no. 4, May 2007.
72. M. Gaviraghi *et al.*, "Pancreatic cancer spheres are more than just aggregates of stem marker-positive cells.," *Bioscience reports*, vol. 31, no. 1, Feb. 2011
73. T. Ishiwata, Y. Matsuda, T. Yamamoto, E. Uchida, M. Korc, and Z. Naito, "Enhanced Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Il1c Promotes Human Pancreatic Cancer Cell Proliferation," *The American Journal of Pathology*, vol. 180, no. 5, May 2012.
74. S. Basu, H. M. Campbell, B. N. Dittel, and A. Ray, "Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)," *Journal of Visualized Experiments*, no. 41, Jul. 2010.
75. T. Fisher Scientific -, "TRIzol Reagent User Guide - Pub. no. MAN0001271 - Rev. A.0."
76. S. Kyes, R. Pinches, and C. Newbold, "A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in Plasmodium falciparum," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 105, no. 2, Feb. 2000.
77. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*. 2013;3(3):71-85.
78. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(7).

79. I. Balcells, S. Cirera, and P. K. Busk, "Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers," *BMC Biotechnology*, vol. 11, no. 1, Jun. 2011.
80. S. Cirera and P. K. Busk, "Quantification of miRNAs by a Simple and Specific qPCR Method," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1182, 2014.
81. Álvarez Hilario Lissuly Guadalupe. Identificación de miRNAs expresados diferencialmente en pacientes con Adenocarcinoma Ductal Pancreático. 2018.
82. Ma Y, Yao N, Liu G, et al. Functional screen reveals essential roles of miR-27a/24 in differentiation of embryonic stem cells. *The EMBO Journal*. 2015;34(3):361-378.
83. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12).
84. di Carlo C, Brandi J, Cecconi D. Pancreatic cancer stem cells: Perspectives on potential therapeutic approaches of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Stem Cells*. 2018;10(11):172-182
85. Brandi J, Dando I, Pozza ED, et al. Proteomic analysis of pancreatic cancer stem cells: Functional role of fatty acid synthesis and mevalonate pathways. *Journal of Proteomics*. 2017;150:310-322
86. Ellenrieder V, König A, Seufferlein T. Current Standard and Future Perspectives in First- and Second-Line Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Digestion*. 2016;94(1):44-49.
87. Liang C, Shi S, Meng Q, et al. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: Where we are and where we are going. *Experimental and Molecular Medicine*. 2017;49(12).
88. Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. *Cancers*. 2017;9(11).

89. Xu Z, Jia Y, Huang X, Feng N, Li Y. Rapid induction of pancreatic cancer cells to cancer stem cells via heterochromatin modulation. *Cell Cycle*. 2018;17(12):1487-1495.
90. N. Sasaki, M. Toyoda, F. Hasegawa, M. Fujiwara, F. Gomi, and T. Ishiwata, "Fetal bovine serum enlarges the size of human pancreatic cancer spheres accompanied by an increase in the expression of cancer stem cell markers," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 514, no. 1
91. Bahmad HF, Cheaito K, Chalhoub RM, et al. Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in vitro Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(AUG):347.
92. Lonardo E, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells - update and future perspectives. *Molecular Oncology*. 2010;4(5):431-442
93. Müller M, Hermann PC, Liebau S, et al. The role of pluripotency factors to drive stemness in gastrointestinal cancer. *Stem Cell Research*. 2016;16(2):349-357.
94. Fisher Scientific T. Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.2 USER GUIDE Publication Number 703150 Revision 8 Legal Entity.
95. Caglar HO, Biray Avci C. Alterations of cell cycle genes in cancer: unmasking the role of cancer stem cells. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(4):3065-3076.
96. Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (United States)*. 2016;95(1):S8-S19
97. Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013;25(2):254-264.
98. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(10):4048-4053
99. Abel E v., Kim EJ, Wu J, et al. The notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PLoS ONE*. 2014;9(3).

100. Jaenisch R, Young R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567-582
101. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics*. 2007;39(3):380-385
102. Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH. Overview of Cancer Stem Cells (CTCs) and Mechanisms of Their Regulation: Implications for Cancer Therapy. *Current Protocols in Pharmacology* . 2013 Jun 1 61(1):14.25.1-14.25.14
103. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* . 2008 May 22;453(7194):519–23
104. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia (New York, NY)*. 2015 Jan 17(1):1.
105. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*,. 2003 Sep 15 63(18):5821–8.
106. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental Neuroscience* . 2004;26(2–4):148–65
107. Wang J, Wang H, Li Z, Wu Q, Lathia JD, McLendon RE, et al. c-Myc Is Required for Maintenance of Glioma Cancer Stem Cells. Klefstrom J, editor. *PLoS ONE* . 2008 Nov 20 3(11):e3769
108. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. Vol. 25, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd.; 2018 p. 1–18.
109. de Sousa e Melo F, Vermeulen L. Wnt signaling in cancer stem cell biology. Vol. 8, *Cancers*. MDPI AG; 2016

110. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban SM, Houchen CW, et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell death & disease* . 2014 ;5(5):e1246
111. Borggrefe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. Vol. 66, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer; 2009; p. 1631–46.
112. Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World journal of stem cells*. 2015; 7(9):1150–11584
113. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, et al. Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*. 2005 Jun 16 ;435(7044):959–63.
114. Ferretti E, de Smaele E, Miele E, Laneve P, Po A, Pelloni M, et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO Journal* . 2008 Oct 8 ;27(19):2616–27
115. Jiang L, Li J, Song L. Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2009 Jul 1 ;41(7):527–34
116. Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a Stem Cell Factor, in Cancer Recurrence and Chemoresistance: Preclinical and Clinical Evidences. *STEM CELLS*. 2012 Mar 1 ;30(3):372–8.
117. Zhang J, Li L. BMP signaling and stem cell regulation. Vol. 284, *Developmental Biology*. Academic Press Inc.; 2005. p. 1–11
118. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. Vol. 425, *Nature*. Nature; 2003 ; p. 577–84
119. Massague J. NEW EMBO MEMBERS REVIEW: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO Journal*. 2000 Apr 17;19(8):1745–54
120. Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF- β signaling by Smad proteins. Vol. 75, *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2000 ;p. 115–57
121. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H. Smad regulation in TGF- β signal transduction. Vol. 114, *Journal of Cell Science*. 2001

122. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. Vol. 113, Cell. Cell Press; 2003 ; p. 685–700
123. Yamaguchi K, Nagai S-I, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, et al. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. Vol. 18, The EMBO Journal. 1999
124. Behrens J. Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: A role of MAP kinases . Vol. 113, Journal of Cell Science. J Cell Sci; 2000 ; p. 911–9.
125. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, et al. The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/Ca²⁺ Pathway To Antagonize Wnt/ β -Catenin Signaling. Molecular and Cellular Biology. 2003 Jan 1 ;23(1):131–9.
126. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai SI, Nishita M, Meneghini M, Barker N, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between β -catenin and transcription factor TCF. Nature. 1999 Jun 24;399(6738):798–802
127. Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H. Wnt Activates the Tak1/Nemo-like Kinase Pathway. Journal of Biological Chemistry. 2004 Apr 23 ;279(17):17232–40
128. Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. Stem Cell Reviews . 2007 Mar 6;3(1):30–8.
129. Chen Y, Sun W, He R, Zhang F, Wang H, Li P, et al. Lidamycin decreases CD133 expression in hepatocellular carcinoma via the notch signaling pathway. Oncology Letters. 2017 Dec 1 ;14(6):7889–95.
130. Aghajani M, Mansoori B, Mohammadi A, Asadzadeh Z, Baradaran B. New emerging roles of CD133 in cancer stem cell: Signaling pathway and miRNA regulation. Journal of Cellular Physiology. 2019 Dec 17 ;234(12):21642–61.
131. Chen C-J, Yang C-J, Huang M-S, Liu Y-P. Abstract 2902: Epithelial-type CD133+ stem-like lung cancer cells emerge higher drug resistance through MDFIC-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway. In: Cancer Research. American Association for Cancer Research (AACR); 2017 ; p. 2902–2902

132. Brossa A, Papadimitriou E, Collino F, Incarnato D, Oliviero S, Camussi G, et al. Role of CD133 Molecule in Wnt Response and Renal Repair. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2018 Mar 1 ;7(3):283–94
133. Kumar D, Kumar S, Gorain M, Tomar D, Patil HS, Radharani NNV, et al. Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133+ Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016 Dec 1 ;136(12):2462–74.
134. Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ, Yu MC, Hsiau HI, Chang FY, et al. Activation of the sonic hedgehog signaling pathway occurs in the CD133 positive cells of mouse liver cancer hepa 1-6 cells. *OncoTargets and Therapy*. 2013 Aug 2 ;6:1047–55.
135. Zhang L, Sun H, Zhao F, Lu P, Ge C, Li H, et al. BMP4 administration induces differentiation of CD133+ hepatic cancer stem cells blocking their contributions to hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*. 2012 Aug;72(16):4276–85.
136. Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: Key regulators of stem cells. Vol. 10, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. NIH Public Access; 2009 ; p. 116–25.
137. Anokye-Danso F, Snitow M, Morrisey EE. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency. Vol. 125, *Journal of Cell Science*. Company of Biologists; 2012 ; p. 4179–787.
138. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2011 Apr 8 ;8(4):376–88.
139. Wang Y, Hussein AM, Somasundaram L, Sankar R, Detraux D, Mathieu J, et al. MicroRNAs regulating human and mouse naïve pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Dec 1 ;20(23).
140. Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2008 May 8 ;453(7192):223–7.
141. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008 Oct 23 ;455(7216):1124–8.

142. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2008 Aug 8 ;134(3):521–33.
143. Lee S-H, Chen T-Y, Dhar SS, Gu B, Chen K, Kim YZ, et al. A feedback loop comprising PRMT7 and miR-24-2 interplays with Oct4, Nanog, Klf4 and c-Myc to regulate stemness. *Nucleic Acids Research*. 2016;44:10603–18
144. Peng X, Kang Q, Wan R, Wang Z. MiR-26a/HOXC9 Dysregulation Promotes Metastasis and Stem Cell-Like Phenotype of Gastric Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018 Oct 1 ;49(4):1659–76.
145. Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: An emerging next-generation cancer therapeutic. Vol. 17, *Current Oncology*. Multimed Inc.; 2010 ; p. 70–80.
146. Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle* . 2007 Nov 1 ;6(21):2585–90.
147. Sun X, Liu J, Xu C, Tang SC, Ren H. The insights of Let-7 miRNAs in oncogenesis and stem cell potency . Vol. 20, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Blackwell Publishing Inc.; 2016 ; p. 1779–88
148. Zhang H le, Wang P, Lu MZ, Zhang SD, Zheng L. c-Myc maintains the self-renewal and chemoresistance properties of colon cancer stem cells. *Oncology Letters*. 2019 May 1 ;17(5):4487–93.
149. Wang J, Wang H, Li Z, Wu Q, Lathia JD, McLendon RE, et al. c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS ONE*. 2008 Nov 20 ;3(11).