



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Construcción de vectores plasmídicos para la generación
de un modelo transgénico de cáncer de páncreas en pez
cebra (*Danio rerio*)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Elsa Miryam Sarmiento Casas



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Cecilia Zampedri

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México,
2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se realizó en el laboratorio “Genómica Funcional del Cáncer” a cargo del Dr. Jorge Meléndez Zajgla en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), bajo la dirección de la Dra. Cecilia Zampedri.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades brindadas.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica por brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones.

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mi tutora, la Dra. Cecilia Zampedri por todas sus enseñanzas.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	7
II.	INTRODUCCIÓN	8
III.	ANTECEDENTES	23
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	25
V.	HIPÓTESIS	26
VI.	OBJETIVO GENERAL.....	26
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
1)	Mantenimiento de peces y obtención de embriones	27
2)	Elección de la región blanco para la guía sgRNA	28
3)	Diseño y clonación del sgRNA	28
4)	Construcción del vector donador.....	29
4.1)	Extracción de DNA genómico de embriones de peces cebra.....	29
4.2)	Diseño de oligonucleótidos.....	30
4.3)	Amplificación de HA5', <i>ptf1a</i> y HA3' mediante PCR.....	31
4.4)	Diseño y síntesis de eGFP-Kras ^{G12D}	35
4.5)	Purificación de los vectores y productos de PCR.....	36
4.6)	Inserción de <i>ptf1a</i> mediante clonación TA en el backbone del vector ptz57R/T para obtener el vector <i>ptf1a</i>	37
4.7)	Inserción de HA5' mediante clonación <i>In-fusion</i> en el sitio de múltiple clonado del vector <i>ptf1a</i> para construir el vector <i>HA5'-ptf1a</i>	38
4.8)	Inserción de HA3' mediante clonación con enzimas de restricción en vector <i>HA5'-ptf1a</i> para construir el vector <i>HA5'-ptf1a-HA3'</i>	39
4.9)	Inserción de eGFP-Kras ^{G12D} mediante clonación con enzimas de restricción en vector <i>HA5'-ptf1a-HA3'</i> para construir el vector Donador (<i>HA5'-ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}-HA3'</i>)	40
5)	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	42

6) Transformación de bacterias.....	43
7) Extracción de plásmido	44
8) Confirmación de la identidad de los insertos y el vector donador mediante mapas de restricción	45
9) Confirmación de la identidad del vector mediante secuenciación	46
10) Obtención del vector portador de Cas9.....	46
IX. RESULTADOS.....	47
1) Elección de la región blanco para la sgRNA guía	47
2) Diseño y clonación del sgRNA.....	47
3) Construcción del vector donador.....	49
3.1) Elección de un promotor con dominio exclusivo en páncreas	49
3.2) Obtención de las secuencias HA5', <i>ptf1a</i> , <i>eGFP-Kras^{G12D}</i> y HA3'	49
3.4) Clonación de HA5', <i>ptf1a</i> , <i>eGFP-Kras^{G12D}</i> y HA3' en el vector pTZ57R/T	53
X. DISCUSIÓN	61
XI. CONCLUSIONES	70
XII. PERSPECTIVAS A CORTO PLAZO.....	71
XIII. PERSPECTIVAS A MEDIANO PLAZO	71
XIV. REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de muerte, por sexo, en México. Modificado de INEGI, 2018.	9
Figura 2. Organización anatómica del páncreas. Las células exocrinas se encuentran en forma de acinos y secretan enzimas digestivas al intestino delgado vía ductos pancreáticos. Los diferentes tipos celulares endocrinos se encuentran en los islotes de Langerhans y secretan varias hormonas al torrente sanguíneo. Modificado de Betts y colaboradores, 2013, citado por Röder <i>et al.</i> , 2016.	11
Figura 3. Vía de KRAS modificada de Eser <i>et al.</i> , 2014.	15
Figura 4. Región elegida para la inserción de la construcción <i>ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}</i> en el cromosoma 18 del pez cebra, entre los genes <i>large2</i> y <i>cngb1a</i>	47
Figura 5. A. Mapa del vector DR274. B. Vector DR274 linealizado con Bsal en agarosa al 1%.	48
Figura 6. Alineación de la región del cromosoma 18 y el fragmento obtenido de la reacción de secuenciación del vector DR274-Guía1.	48
Figura 7. DNA genómico de <i>Danio rerio</i> en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: gDNA 100ng; Carril 2: gDNA 200ng. Marcador de peso molecular, 1KBplus.	49
Figura 8. Promotor mínimo de <i>ptf1a</i> . Carril 1: gDNA de pez cebra. Carril 2: Promotor de <i>ptf1a</i> . Gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.	50
Figura 9. Fragmento HA5' en un gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.	51
Figura 10. A. Producto de PCR de 1169 pb. B. Productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos 4. Agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.	52
Figura 11. Producto de PCR <i>eGFP-Kras^{G12D}</i> con los sitios para enzimas de restricción en un gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus... ..	53
Figura 12. Mapa del vector de clonación <i>pTZ57R/T</i>	54
Figura 13. A. Mapa del vector <i>ptf1a</i> . B. Vector <i>ptf1a</i> linealizado en un gel de agarosa al 1%.	55
Figura 14. A. Mapa del vector HA5'- <i>ptf1a</i> con los sitios de restricción para las enzimas Sall y PstI. B. Bandas del vector HA5'- <i>ptf1a</i> digerido en un gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: Vector sin digerir; Carril 2: Vector digerido con Sall; Carril 3: Vector digerido con PstI.	56

Figura 15. Transformación de la ligación de HA5'-ptf1a con HA3' en bacterias XL1Blue. A) Control positivo. B) Control negativo con el vector abierto. C) control negativo sin vector. D) Ligación con el inserto HA3'. 57

Figura 16. Mapa de restricción del vector HA5'-ptf1a-HA3'. Carril 1: Vector cerrado; Carriles 2-6: Vector de las colonias (1 a la 5) digeridas con PvuII y NdeI en una doble digestión; Carril 7: Vector de la colonia 5 digerido con NdeI; Carril 8: Vector de la colonia 5 digerido con NdeI; Carril 9: Vector HA5'-ptf1a digerido con PvuII. Gel de agarosa al 0.8% 58

Figura 17. Vector donador (HA5'-ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}-HA3'). A. Mapa del vector EMSC_Kras^{G12D}. B. Carril 1: Vector cerrado; Carril 2: Vector anterior (sin eGFP-Kras^{G12D}) linealizado con Sall; Carril 3: Vector donador linealizado con Sall. Gel de agarosa al 0.8% 59

Figura 18. Mapa de restricción del vector final EMSC_Kras^{G12D}. Carril 1: Vector HA5'-ptf1a-HA3' digerido con HindIII; Carril 2 y 3: Vector EMSC_Kras^{G12D} digerido con HindIII; Carril 4: Vector HA5'-ptf1a-HA3' digerido con PvuII; Carril 5 y 6: Vector EMSC_Kras^{G12D} digerido con PvuII; Carril 7: Vector HA5'-ptf1a-HA3' digerido con NdeI; Carril 8 y 9: Vector EMSC_Kras^{G12D} digerido con NdeI; Carril 10: Vector EMSC_Kras^{G12D} sin digerir..... 60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para obtener los insertos del vector donador.	31
Tabla 2. Reactivos y programa para la amplificación del promotor <i>ptf1a</i>	32
Tabla 3. Reactivos y programa para la amplificación del brazo de homología HA5'.	33
Tabla 4. Reactivos y programa para la amplificación del segmento que contiene al brazo de homología HA3'	34
Tabla 5. Reactivos y programa para la amplificación del brazo de homología HA3'.	34
Tabla 6. Reactivos y programa para la amplificación del segmento <i>eGFP-Kras^{G12D}</i>	35
Tabla 7. Especificaciones para la ligación de <i>ptf1a</i> con el vector <i>pTZ57R/T</i>	37
Tabla 8. Especificaciones para la unión del vector <i>pTZ57R/T-ptf1a</i> con HA5'.	38
Tabla 9. Especificaciones de la digestión doble para el vector <i>pT57R/T-HA5'-ptf1a</i> y el inserto HA3'	39
Tabla 10. Especificaciones de la ligación del inserto HA3' y el vector <i>HA5'-ptf1a</i> . 40	
Tabla 11. Especificaciones de la digestión doble para el vector HA5'-ptf1a-HA3' y el inserto <i>eGFP-Kras^{G12D}</i>	41
Tabla 12. Especificaciones de la ligación del inserto <i>eGFP-Kras^{G12D}</i> y el vector <i>pTZ57R/T-HA5'-ptf1a</i>	41
Tabla 13. Preparación de buffer TBE 10x para 1L.	42

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

PanIN	Lesión neoplásica intraepitelial pancreática
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
sgRNA	RNA guía de una cadena
gDNA	DNA genómico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
°C	Grados centígrados
mM	Milimolar
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
Kb	Kilobases
pb	Pares de bases
min	Minutos
Hpf	Horas Post Fertilización
rpm	Revoluciones por minuto
c.s.p.	Cantidad suficiente para

I. RESUMEN

El cáncer de páncreas representa un gran reto dentro de los problemas de salud actuales, considerando que es la séptima causa de muerte a nivel mundial, así mismo, la tasa de mortalidad es casi igual a la tasa de morbilidad y su pronóstico de supervivencia después del diagnóstico es muy bajo.

El principal tipo de cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal pancreático, el cual alberga entre muchas otras, una mutación en el oncogén *KRAS* en al menos el 70% de los pacientes. La mutación de este oncogén más representativa está presente en el codón número 12 y se le conoce como G12D.

Para abordar el estudio del adenocarcinoma pancreático se han usado diferentes modelos animales. El pez cebra (*Danio rerio*) representa un buen modelo por sus diversas cualidades, una de ellas es la alta homología genética con los humanos lo cual hace a este pez un modelo comparable.

Este trabajo está enfocado en la generación de los vectores necesarios para la creación futura de un modelo transgénico de cáncer de páncreas en peces cebra con la técnica *knock in* de CRISPR/Cas9. Los vectores requeridos son tres: un vector donador el cual contenga un par de brazos de homología flanqueando el casete (*eGFP-Kras^{G12D}*) que se requiere insertar en el genoma del pez. Otro vector con el RNA guía para la proteína Cas9 y el tercer vector con la secuencia que codifica para la proteína Cas9.

Los resultados muestran la obtención de los elementos necesarios para la creación de estos vectores mediante PCR's a partir de DNA genómico del pez cebra, y su exitosa inserción dentro del vector *pTZ57R/T* por medio de diferentes métodos de clonación generando así el llamado vector donador. De igual manera, los resultados exponen el diseño y la clonación de la secuencia de un RNA de forma exitosa en el vector *DR274*.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial donde se conoce que están involucrados aspectos genéticos, así como ambientales y de estilo de vida. El cáncer transcurre con la acumulación de mutaciones en las células, las cuales pasan progresivamente de un estado normal a un estado neoplásico, adquiriendo capacidades de supervivencia, proliferación y diseminación (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011; Langenau, 2016; OMS, 2019). Esas mutaciones producen oncogenes con funciones dominantes, o pérdida de la función en genes supresores de tumores, recesivos, alterando así algunas vías o rutas celulares (Hanahan y Weinberg, 2000). Para que este proceso de carcinogénesis ocurra, al igual que el proceso de metástasis, la célula tiene que atravesar por diferentes pasos, si falla en completarlos, entonces, será eliminada (Fidler y Hart, 1982). Algunas de las barreras que enfrentan las células son el sistema inmune, la apoptosis, los supresores de crecimiento, la falta de oxígeno y nutrientes, entre otros (Hanahan y Weinberg, 2011).

Epidemiología del cáncer y el cáncer de páncreas

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y representa la segunda causa de muerte, produciendo bajas de 9.6 millones de personas tan solo en el 2018 (GLOBOCAN, 2019). En México, durante el 2017, se consideró al cáncer como la tercera causa de muerte, precedida sólo por enfermedades del corazón y diabetes *mellitus* (INEGI, 2018, **Figura 1**); causando la muerte en 83,476 personas de 190,667 casos nuevos reportados (GLOBOCAN, 2019) u 84,142 según el INEGI, 2018.

El cáncer de páncreas se ha considerado como una de las neoplasias más letales del mundo y uno de los mayores problemas de salud sin resolver, desde el inicio del siglo XXI (Ferlay *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2004). Globalmente este tipo de cáncer representa la séptima causa de muerte, aunque en países desarrollados esta tasa es mayor y se prevé que pase a ser la segunda causa de muerte para 2030 (GLOBOCAN, 2019; Lucas *et al.*, 2016).

Principales causas de muerte por sexo

Rango	Total	Hombres	Mujeres
1	Enfermedades del corazón 141 619	Enfermedades del corazón 75 256	Enfermedades del corazón 66 337
2	Diabetes mellitus 106 525	Diabetes mellitus 52 309	Diabetes mellitus 54 216
3	Tumores malignos 84 142	Tumores malignos 41 088	Tumores malignos 43 053
4	Enfermedades del hígado 38 833	Agresiones (homicidios) 28 522	Enfermedades cerebrovasculares 17 881
5	Accidentes 36 215	Enfermedades del hígado 28 400	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 11 140
6	Enfermedades cerebrovasculares 35 248	Accidentes 27 362	Enfermedades del hígado 10 418
7	Agresiones (homicidios) 32 079	Enfermedades cerebrovasculares 17 366	Influenza y neumonía 9 828
8	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 22 954	Influenza y neumonía 12 063	Accidentes 8 823
9	Influenza y neumonía 21 892	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 11 814	Insuficiencia renal 5 757
10	Insuficiencia renal 13 167	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal 7 452	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal 5 567

 Enfermedades del corazón	 Diabetes Mellitus	 Tumor maligno	 Otras enfermedades no transmisibles	 Accidentes	 Agresiones (homicidios)	 Enfermedades transmisibles
---	--	--	--	---	--	---

Figura 1. Principales causas de muerte, por sexo, en México. Modificado de INEGI, 2018.

En México, el cáncer de páncreas se encuentra en el número 12 del rango de incidencia del GLOBOCAN con 4,849 casos nuevos de los cuales 4,475 mueren. Este tipo de

cáncer no se encuentra dentro de los tipos de cáncer más abundantes en el país, pero sí se considera uno de los tipos de cáncer con mayor mortalidad, causando el deceso del 92% de las personas que lo padecen (GLOBOCAN, 2019).

El cáncer pancreático, como su nombre lo indica, se origina en los tejidos del páncreas; hay dos tipos principales de cáncer en este órgano: el adenocarcinoma (más del 90% de los casos lo presentan) y los tumores pancreáticos endocrinos (representan menos del 5% de los casos) (Hidalgo *et al.*, 2013). El adenocarcinoma pancreático es casi uniformemente fatal y tiene tasas de supervivencia pobres, alrededor de 8-11% de los pacientes sobreviven más de 5 años posteriores al diagnóstico, la media de supervivencia se estima de 4 a 6 meses (Hingorani *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2018). El 70% de los adenocarcinomas de páncreas se localizan a nivel de cabeza de páncreas y el 30% restantes, a nivel de cuerpo y cola (Khosravi y Díaz, 2005).

El páncreas

El páncreas es un órgano de aproximadamente 70-150 gramos y mide 15-25 cm de longitud, está conectado al duodeno por el ámpula de Vater. En los humanos se usan términos como cabeza, cuello, cuerpo y cola para referirse a las regiones del órgano desde la región proximal hasta la distal (Slack, 1995). Este órgano posee dos tipos de células: las exocrinas que secretan enzimas al intestino y las endocrinas que secretan hormonas hacia el torrente sanguíneo. El páncreas exocrino es una glándula acinar lobulada y ramificada, donde las células están agrupadas en acinos (**Figura 2**). Por otro lado, las células endocrinas se agrupan en los islotes de Langerhans de manera compacta e incrustada en el tejido exocrino.

Existen cuatro células endocrinas principales: β , α , σ y PP, las cuales secretan insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente (Slack, 1995).

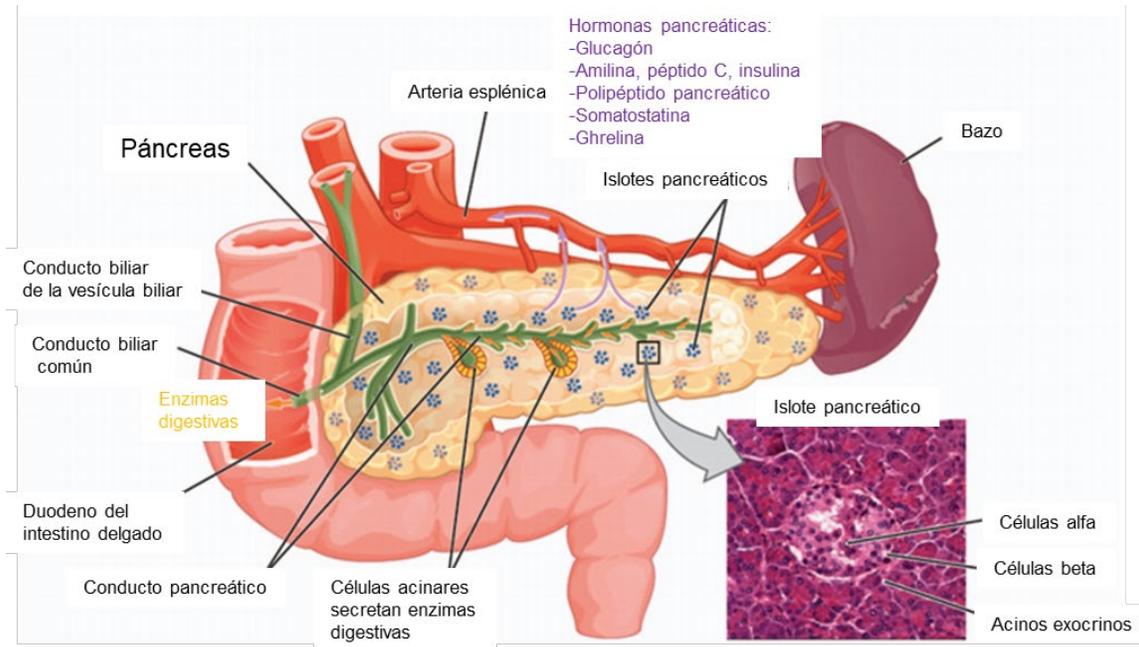


Figura 2. Organización anatómica del páncreas. Las células exocrinas se encuentran en forma de acinos y secretan enzimas digestivas al intestino delgado vía ductos pancreáticos. Los diferentes tipos celulares endocrinos se encuentran en los islotes de Langerhans y secretan varias hormonas al torrente sanguíneo. Modificado de Betts y colaboradores, 2013, citado por Röder *et al.*, 2016.

Factores de riesgo para padecer cáncer de páncreas

Los factores de riesgo para padecer cáncer de páncreas se desconocen parcialmente, sin embargo, identificados están los antecedentes familiares, el tabaquismo, diabetes *mellitus* tipo 2, obesidad, inactividad física, pancreatitis crónica, entre otros (Ezzati *et al.*, 2005; Khosravi y Díaz, 2005; Parkin *et al.*, 2011). Los riesgos se pueden clasificar en aquellos que pueden ser modificados y los que no. Los factores no controlados son la edad, el sexo, la microbiota del intestino, la diabetes, entre otros.

Esta enfermedad es extremadamente rara en personas antes de los 30 años, de hecho, el 90% de los pacientes son diagnosticados después de los 55 años (Midha *et al.*, 2016). Por otro lado, el sexo biológico también se puede considerar como factor, puesto que se observa mayor incidencia en hombres que en mujeres esta relación parece incrementar en países con un mayor índice de desarrollo (GLOBOCAN, 2019).

Se han realizado diversos estudios examinando la microbiota del intestino. Estos concluyen en que niveles bajos de *Neisseria elongate*, *Streptococcus mitis* y altos niveles de *Porphyromonas gingivalis* y *Granulicatella adiacens*, se asocian al incremento en el riesgo de padecer cáncer de páncreas (Memba *et al.*, 2017). Por otro lado, la diabetes se ha reconocido como un factor de riesgo bien establecido para el cáncer de páncreas. Los científicos han demostrado que pacientes con diabetes tienen doble posibilidad de desarrollar cáncer de páncreas que aquellos sin diabetes (Stevens *et al.*, 2007).

Los factores de riesgo modificables son el fumar, la pancreatitis crónica, la obesidad, la calidad de la dieta y el consumo de alcohol; con este último se menciona que consumir alcohol en cantidades moderadas no está asociado al riesgo de padecer cáncer de páncreas (Machicado *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Aunado a lo descrito anteriormente, se identifican lesiones precursoras de adenocarcinoma pancreático como lo es la Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN del inglés) (Hruban *et al.* 2000), lesión microscópica — menos de 0.5 cm— no invasiva que ocurre generalmente en los ductos pancreáticos y puede jugar un rol activo en el desarrollo de la pancreatitis. Así mismo, la lesión epitelial resultante y su reparación, pueden desencadenar el proceso neoplásico (Brune *et al.*, 2006). Estas lesiones han sido clasificadas en cuatro categorías (PanIN-1A; PanIN-1B; PanIN-2; PanIN-3), diferenciadas por las atipias que hay en

las células epiteliales de los ductos del páncreas, tanto en su arquitectura como en su núcleo. Muchas de las alteraciones genéticas presentes en PanIN se encuentran en los adenocarcinomas pancreáticos (Hruban *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2001). Un estudio realizado por Hingorani *et al.* (2003) menciona que la expresión endógena dirigida del oncogén *KRAS* en el páncreas de ratón, inicia la aparición de PanINs en los tres estados que se han encontrado en las condiciones humanas, lo que lleva al desarrollo de carcinoma pancreático.

Alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo de cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas alberga múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas; se observa que algunos genes implicados son *p53*, *APC*, *DCC*, *p16INK4a*, *DPC4*, *BRCA2*, *STK11/LKB1* y *PRSS1*, los cuales codifican para proteínas supresoras de tumores e incluso, hay alteraciones cromosómicas en 9p, 17p y 18q que contienen muchos genes supresores de tumores. En más del 90% de los casos se hallan mutaciones del oncogén *KRAS* (Biankin *et al.*, 2012). Esta enfermedad también posee predisposición hereditaria, lo cual involucra parientes con mutaciones en la línea germinal de genes como *p16INK4a*, *BRCA2*, *LKB1* y *MLH1*; sin embargo, estas mutaciones se dan también en casos esporádicos, por lo que la base genética necesita aún ser investigada (Jaffee *et al.*, 2002; Hingorani *et al.*, 2003)

El oncogén *KRAS*

Los genes de la familia RAS tienen funciones como la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (Wennerberg *et al.*, 2005). *KRAS* es una GTPasa que media la señalización en la progresión del ciclo celular, pero también puede inducir arresto celular, apoptosis y senescencia (Jancik *et al.*, 2010).

De los primeros eventos genéticos implicados en la patogénesis de adenocarcinoma pancreático es una mutación en el punto de activación del gen *KRAS*, convirtiéndolo en una

forma oncogénica mediante la mutación localizada en el codón 12 (G12D), dando como resultado a *KRAS*^{G12D} (Pasca y Logsdon, 2013). La mutación *KRAS*^{G12D} consiste en una sustitución del aminoácido glicina por aspartato y es la mutación más común de *KRAS* en los adenocarcinomas pancreáticos, representando más del 30% (Feldmann *et al.*, 2007; Sinn *et al.*, 2014).

Las proteínas RAS actúan sobre dos vías esencialmente: de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K); estas vías tienen papeles importantes en funciones esenciales para las células como son el crecimiento y la supervivencia (Nandan y Yang, 2011). La proteína codificada por *KRAS*^{G12D} queda atrapada en un estado permanente de activación y la célula perpetúa en estado latente la etapa G1 del ciclo celular, donde *KRAS* activa a la cinasa MAP (*Mitogen Activated Protein*) — también conocida como ERK— y a la cinasa PI3 (*Phosphoinositide 3*) en las vías antes mencionadas, finalizando en la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. Sin embargo, se postula la presencia de otros genes para transformar la célula hacia la malignidad del cáncer de páncreas (Moskaluk *et al.*, 1997; Zenonos y Kyprianou, 2013). Algunos de los posibles genes pueden ser *p53*, *p16INK4A* o *p21CIP1* (Serrano *et al.*, 1997) (**Figura 3**).

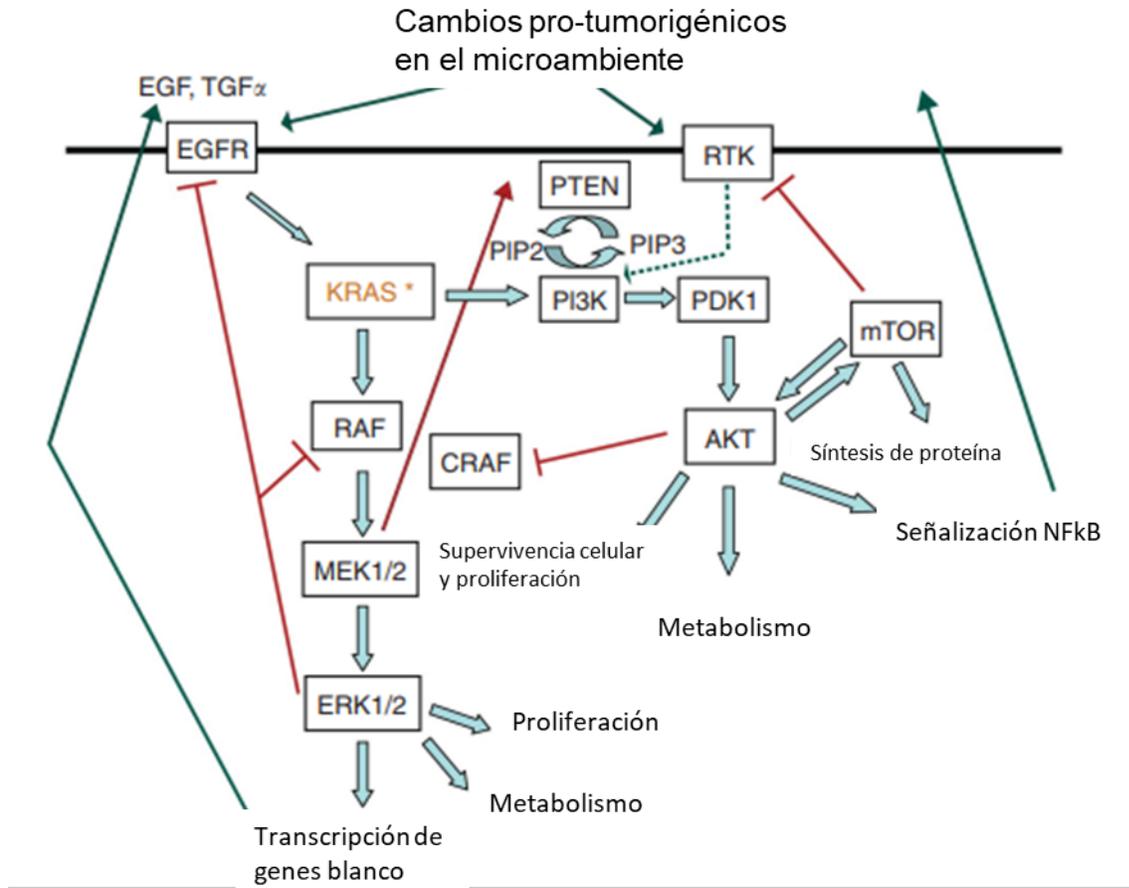


Figura 3. Vía de KRAS modificada de Eser *et al.*, 2014.

Estado del arte del cáncer de páncreas

La problemática del cáncer de páncreas está asociada a un mal pronóstico, por varias razones: los pacientes acuden a una evaluación médica cuando el cáncer está en etapa avanzada porque a menudo no hay síntomas o éstos se pueden confundir con otra enfermedad; los pacientes experimentan ictericia obstructiva, dolor abdominal y pérdida de peso (Klapman y Malafa, 2008). Otros factores que interfieren en la diagnosis temprana de este cáncer es la localización retroperitoneal del páncreas y el tamaño pequeño de las lesiones precursoras, situadas por debajo del umbral de detección de las modalidades de

imágenes actuales (Hingorani *et al.*, 2003). Este cáncer es agresivo, con crecimiento local perineural vascular; parece que desde su inicio ya es una enfermedad micrometastásica que impide la resección quirúrgica en la mayoría de los pacientes (aproximadamente el 80%) (Hingorani *et al.*, 2003; Khosravi y Díaz, 2005). Se caracteriza por una notable resistencia a las opciones de tratamiento más convencionales, incluyendo quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida. La resistencia se da por factores intrínsecos (regulación post-transcripcional de genes y mutaciones somáticas) y extrínsecos (baja en la concentración de glucosa, estrés oxidante, vascularización pobre e hipoxia) en el microambiente celular (Chand *et al.*, 2016).

Estrategias de abordaje y estudio del cáncer de páncreas

Para el estudio del cáncer y también de diversos fenómenos, se han utilizado modelos animales que funcionan como análogos de los humanos o de algún otro grupo de estudio (Lozada *et al.*, 2012). Para considerar a un determinado animal como un buen modelo experimental, éste debe cumplir ciertos requisitos: se debe conocer la secuencia de su genoma, debe conservar una alta identidad genética con el humano, al menos en los genes de interés, debe ser de fácil manipulación y relativo fácil mantenimiento. Estas características varían dependiendo del objetivo de la investigación (Pierce, 2014; Andersen y Winter, 2017).

Modelos experimentales para el estudio del cáncer

Para estudiar el cáncer se han empleado diversos modelos animales, como los ratones. La creación de estos modelos comienza aproximadamente hace un siglo, cuando se implementaron estrategias de cría donde al menos 20 generaciones consecutivas de apareamiento entre hermano-hermana producen cepas endogámicas, las cuales tienen una

mayor susceptibilidad al desarrollo de neoplasias. William Castle y Clarence Cook Little, desarrollan el concepto de líneas isogénicas de ratones (cepas casi idénticas genéticamente), (Jonkers y Berns, 2002). Otro tipo de estrategia es el uso de mutágenos químicos que inducen el cáncer. Estos modelos ayudan en la comprensión de los mecanismos del cáncer, así como la quimioprevención o detección temprana. Es necesario puntualizar que en los modelos murinos también se prueban diversos productos químicos y su posible actividad cancerígena (Kemp, 2015).

Los ratones transgénicos también son importantes en estos campos de estudio, puesto que los investigadores han insertado mutaciones específicas en genes endógenos que se han transmitido a través de la línea germinal de los mismos. También, se ha experimentado con xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes con tumores singénicos (trasplante de tumor en ratones con el mismo trasfondo genético del ratón del cual se aisló el tumor) y xenoinjertos (tumor humano implantado en ratones), trasplantados por vía subcutánea u ortotópica (Jonkers y Berns, 2002; Lamprecht *et al.*, 2018).

El pez cebra como modelo de estudio.

El pez cebra (*Danio rerio*) ha surgido recientemente como un atractivo organismo modelo para el estudio del cáncer debido a las ventajas que ofrece para la realización de experimentos genéticos y la facilidad de su mantenimiento y manipulación. Algunas de las principales características que lo hacen un buen modelo experimental para el estudio del cáncer son su tamaño, la transparencia de sus embriones, su rápido desarrollo y la disponibilidad de embriones para la realización de experimentos y repeticiones. Es necesario mencionar que los costos por mantenimiento de este animal son 10 veces menores que los

ratones. Además de esto, el 70% de los genes involucrados en el desarrollo de enfermedades humanas tienen un ortólogo en el pez cebra (Howe *et al.*, 2013; Lozada *et al.*, 2012; Varshney y Burgess, 2014).

Danio rerio se utiliza en diversos proyectos relacionados con el cáncer debido a que los tumores producidos en este organismo son similares molecular e histopatológicamente a los de los humanos; y su transparencia óptica permite visualizar dinámicamente el proceso de tumorigénesis *in vivo* (Langenau, 2016).

Chen *et al.* (2007) demuestran que existen similitudes anatómicas e histológicas significativas entre el páncreas de mamíferos y peces cebra. Las semejanzas estructurales generales del páncreas en el pez cebra y en los humanos, sugieren desarrollo y genética altamente conservada; al igual que los procesos morfogenéticos se conservan en varias etapas del desarrollo durante la organogénesis en pez cebra y embriones humanos (Yee *et al.* 2013).

El desarrollo del páncreas humano comienza con dos yemas ubicadas en la parte ventral y dorsal del duodeno, la yema ventral surge adyacente al divertículo hepático y la yema dorsal surge del lado opuesto al intestino (Slack, 1995). Para la formación correcta de este órgano, se identifican diversos factores de transcripción; uno de ellos es Pdx1 en mamíferos, el cual es necesario para la formación correcta de las yemas y la diferenciación de las células exocrinas y endocrinas (Offield *et al.*, 1996). El páncreas embrionario del pez cebra consiste en una isleta rodeada de parénquima exocrina y a diferencia de otros vertebrados, el páncreas no parece desarrollarse a partir de las evaginaciones del endodermo del intestino anterior, sino *in situ*, a partir de una monocapa de células endodérmicas anteriores tempranas (Lin *et al.*, 2004). Al igual que en los mamíferos, Pdx1 también es

esencial para el desarrollo temprano del páncreas en pez cebra pero no es suficiente para la organogénesis pancreática (Yee *et al.*, 2001).

Un factor de transcripción implicado en la organogénesis del páncreas tanto en peces como mamíferos es PTF1a (p48), este es crítico para el desarrollo temprano de los componentes endocrinos y acinares del páncreas. La expresión de *Ptf1a* comienza durante la evaginación de las yemas epiteliales dorsales y ventrales, persiste durante el desarrollo pancreático medio, donde conduce la formación de un complejo tubular ramificado de células progenitoras; posteriormente, el epitelio sufre una transformación que establece arquitectura tisular, produce los linajes de las células de los islotes, las acinares y las células ductales (Masui *et al.*, 2007).

Desde el siglo pasado se utiliza al pez cebra como modelo de cáncer, aproximadamente en 1982, exponiéndolo a mutágenos comunes como etilnitrosourea (ENU), desarrollando así varios tipos de neoplasias como los papilomas de piel (Beckwith, *et al.*, 2000). Otro mecanismo a través del cual se puede modelar el cáncer humano en este animal es mediante xenotrasplantes de células de cáncer humanas en éste. Los trasplantes pueden realizarse en peces de edad adulta o en embriones de 2-5 días de edad. Ahí las células pueden marcarse con fluorescencia y al ser trasplantadas al pez pueden estudiarse mecanismos como la proliferación y metástasis, entre otros (Stoletov y Klemke, 2008).

Para el estudio de algún oncogén o gen supresor de tumores son utilizadas líneas transgénicas de peces, las cuales podrían tener inactivado un gen (*Knock out*) o expresar un transgen (*Knock in*) que puede estar marcado con fluorescencia para estudiar su participación en la iniciación y progresión de un tipo específico de cáncer. Estas ediciones en el genoma

se desarrollan con técnicas de modificación del genoma como TALENS, ZFN o CRISPR-Cas9 (Hwang, *et al.*, 2013).

CRISPR-Cas9 como técnica de edición genómica.

La manipulación del material genético *in vitro* se desarrolló en los años 70's (Schildkraut, 2001). Una de las técnicas actuales más utilizadas en todo el mundo para la manipulación del material genético es la técnica CRISPR-Cas9, la cual muestra eficiencia y facilidad en su uso, a comparación con otras técnicas como TALENs y ZFNs (Doudna y Charpentier, 2014).

El nombre CRISPR proviene del inglés “clustered regularly interspaced palindromic repeats”, descrito por investigadores japoneses en 1987, como “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas” en el genoma de *Escherichia coli* (Ishino *et al.*, 1987). Actualmente sabemos que CRISPR ocurre en diferentes bacterias y arqueas (Mojica *et al.*, 2000), realizando un papel importante asociado a la nucleasa Cas como parte del sistema inmune adaptativo de estos procariontes (Bhaya *et al.*, 2011).

Este sistema de defensa consta de dos fases: en la fase de adquisición los invasores celulares como los virus, inyectan su material genético en la célula; después de la infección, las secuencias del DNA de los invasores celulares se incorporan al DNA de la bacteria/arquea como espaciadores en el locus *CRISPR* flanqueados con secuencias repetidas. Así cuando el locus *CRISPR* se transcribe, el pre-CRISPR RNA (crRNAs), codifica para las recién adquiridas secuencias protoespaciadoras. Este pre-crRNA se corta y produce crRNAs individuales asociados con una proteína Cas. La proteína Cas utiliza a los crRNAs como guías para silenciar DNA foráneo que coincida con la secuencia de los crRNAs. Para la segunda

fase o fase de interferencia, es necesario que la bacteria/arquea encuentre de nuevo el mismo DNA foráneo, entonces el complejo crRNA/Cas es capaz de identificar y silenciar el DNA del invasor (Thurtle-Schmidt y Te-Wen, 2018).

Se identifican diversos elementos implicados en el sistema CRISPR, los cuales son modificados para su uso conveniente y práctico en los diversos laboratorios del mundo. Dentro de los principales componentes está el locus *CRISPR*, el cual contiene las secuencias repetidas y espaciadores que son cadenas homólogas a las de los invasores pasados (Thurtle-Schmidt y Te-Wen, 2018). Hay tres sistemas CRISPR: tipo I, tipo II y tipo III. La diferencia entre éstos es la clase de Cas empleada: Cas3 en los sistemas de tipo I, Cas9 en tipo II y Cas10 en tipo III. La distinción entre los tipos de CRISPR-Cas se basa en los respectivos genes de firma y la típica organización de los locus respectivos (Makarova y Koonin, 2015). Actualmente, para hacer el sistema más simple, sólo se necesita una molécula de RNA programable que guía a la endonucleasa Cas9; esta molécula de RNA se le conoce como “single-stranded guide RNA” (sgRNA) (Cong *et al.*, 2013). Entonces la Cas9 utiliza como guía a la sgRNA que se empareja a una región complementaria del DNA donde efectuará los cortes en ambas cadenas de DNA. Estos cortes ocurrirán tres pares de bases río arriba de la secuencia “NGG”, conocida como “protospacer adjacent motif” (PAM) (Jinek *et al.*, 2012).

Una vez que se ha realizado el corte dirigido a la doble cadena (DSB) del DNA mediante la nucleasa (Cas), la célula buscará corregirlo por alguna de las dos principales vías de reparación: unión de extremos no homólogos (NHEJ) o recombinación homóloga (HDR). Comparado con la vía NHEJ propensa a errores, se crearán mutaciones mediante inserciones o deleciones (indels) en la región blanco, lo cual resultará en el *knock out* del locus. La vía HDR puede ser utilizada para la modificación del locus de una manera precisa, siempre y

cuando se cuenta con la presencia de piezas homólogas del DNA exógeno/endógeno. Aunque la vía HDR se observa en una frecuencia más baja que NHEJ, se puede aprovechar para integrar específicamente secuencias de DNA en el organismo, proceso conocido como *knock in* (Cong *et al.*, 2013; Lombardo *et al.*, 2011).

III. ANTECEDENTES

Se han creado modelos de ratón genéticamente modificados a los cuales se les realizó un cambio en el exón 1 de *KRAS*, esta variación consistió en la sustitución de una G por una A en el codón 12. Róo arriba de este exón se agregó una secuencia de paro flanqueada por sitios LoxP, llamando esta construcción como Lox-STOP-Lox (LSL). Esta línea de ratones (*LSL-KRAS^{G12D}*) se cruzó con ratones que expresan la recombinasa Cre con los promotores específicos PDX-1 o P48 y se obtuvieron las líneas de ratones tipo *PDX-1-Cre;LSL-KRAS^{G12D}* y *P48^{+Cre};LSL-KRAS^{G12D}*. Éstos producían mayor cantidad de KRAS (mutante activa) que el control, derivando así en lesiones PanINs las cuales son precursoras del adenocarcinoma pancreático (Hingorani *et al.*, 2003).

Park y colaboradores (2008), realizaron un modelo de cáncer de páncreas en pez cebra el cual consistió en la inserción de las construcciones *ptf1a:eGFP* y *ptf1a:eGFPkras^{G12V}* en el genoma de *D. rerio*. Entre sus resultados describieron que KRAS (mutante activa) inhibió la diferenciación de las células progenitoras pancreáticas, se aumentó la vía de señalización de SHH y se indujo el adenocarcinoma pancreático análogo a los que se han observado en ratones y en humanos.

Park y Leach (2018) crearon un modelo de estudio de cáncer de páncreas con pez cebra, ellos combinaron las técnicas CRE/Lox y GAL4/UAS para expresar *kras^{G12V}* temporalmente, bajo el domino de *ptf1a*. Con esto demostraron que las células mutadas con *kras^{G12V}* inducen a las lesiones PanIN, constituyendo un progenitor para el adenocarcinoma ductal pancreático.

Otro modelo de cáncer de páncreas en peces cebra fue desarrollado por Schiavone y colaboradores, en el 2014. Ellos utilizaron el sistema de expresión condicional GAL4/UAS

para expresar *eGFP- kras^{G12D}* en tejido pancreático, y así posteriormente estudiar *in vivo* los efectos de la mutación G12D de *kras*.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la tercera causa de muerte en México, representando un problema de salud pública en la actualidad. Aunque el cáncer de páncreas no tiene una alta incidencia en la población mexicana, es el cáncer con mayor índice de mortalidad. Además, dentro de los factores de riesgo se encuentra la diabetes, convirtiendo a la población mexicana en un grupo de riesgo para el desarrollo del cáncer de páncreas. Más aún, debido a la localización de este órgano y a que los síntomas son comúnmente confundidos con otras enfermedades, el diagnóstico de este cáncer es complicado.

Se prevé que dentro de diez años el cáncer de páncreas pase a ser la segunda causa de mortalidad a nivel mundial por lo que se debe trabajar en el entendimiento, prevención, diagnóstico y tratamiento de esta misma.

Actualmente se han desarrollado diversos modelos para estudiar el cáncer de páncreas en pez cebra, sin embargo, en ninguna de las investigaciones consultadas hasta el momento se ha logrado establecer un modelo con una alta sobrevivencia de los peces aunada a la expresión de la mutación de *kras* más frecuente en los casos de adenocarcinoma ductal pancreático con especificidad en el tejido pancreático.

Este trabajo contempla introducir la mutante *kras*^{G12D} en el genoma de pez cebra mediante la técnica de ingeniería genética CRISPR-Cas9 por recombinación homóloga, utilizando el promotor *ptf1a* con algunas modificaciones para prevenir la muerte temprana de los peces, como en el trabajo de Shiavone y colaboradores (2014) y que su expresión sea dirigida puramente al tejido pancreático. Por consiguiente, para la obtención de este modelo es imprescindible la construcción de un vector donador con sitios de homología al genoma del pez flanqueando al promotor *ptf1a* modificado y a la fusión del oncogén *kras*^{G12D} con *eGFP*.

V. HIPÓTESIS

Una estrategia de clonación secuencial, utilizando elementos genómicos del pez cebra y construcciones sintéticas, permitirá la obtención de un vector donador con potencial para incorporarse a una región específica del cromosoma 18 del pez cebra.

VI. OBJETIVO GENERAL

Construcción de vectores plasmídicos para la creación de un modelo transgénico de cáncer de páncreas con la expresión del casete *ptf1a-eGFP-kras^{G12D}* en *Danio rerio* mediante CRISPR/Cas9.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseño y clonación de un RNA guía que tenga como blanco una región específica del cromosoma 18 del pez cebra.
- Obtención mediante PCR de las secuencias genómicas del promotor mínimo de páncreas *ptf1a* y de dos regiones de homología (brazo de homología 5' llamado HA5' y brazo de homología 3' llamado HA3') que flanquean el casete *ptf1a-eGFP-kras^{G12D}* en el cromosoma 18 del pez cebra.
- Diseño de un GBLOCK que contenga la fusión traduccional de la proteína verde fluorescente eGFP y la versión mutante Kras^{G12D} de pez cebra.
- Clonación de las secuencias *ptf1a*, HA5', HA3' y la fusión traduccional *eGFP-kras^{G12D}* en el vector de clonación *pTZ57R/T* para la generación de un vector donador para hacer un *knock in*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Mantenimiento de peces y obtención de embriones

Los peces cebra cepa Tab wik y silvestres se encuentran en un sistema de acuario de seis peceras de 20 L que albergan 30 parejas de peces, con sistemas de filtro y termostato individuales. Los peces son mantenidos a pH de 6.8-7.2 y temperatura de 26-28°C, con ciclos de luz natural, aproximadamente 11 horas y 13 horas de oscuridad.

Para la reproducción de los peces se emplearon cajas de cruza, en las cuales se colocaron dos peces hembras separadas de un pez macho por toda la noche, al día siguiente durante la mañana, se quitó la separación de la caja de cruza para que la fecundación comenzara. Una vez que los huevos fueron fecundados, estos se colectaron con pipetas Pasteur, se colocaron en cajas Petri con medio para embriones (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl, 0.33 mM MgSO₄) y se llevaron a la incubadora con una temperatura de 28.5°C.

Los cuidados, alimentación y reproducción de los peces y larvas se siguieron de acuerdo a los procedimientos estándares descritos en "The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)" (Westerfield, 2000).

Todos los experimentos y procedimientos en animales fueron llevados al cabo siguiendo los lineamientos del "THE INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC) UNIVERSITY OF OREGON", disponible para consulta en "The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)". Así mismo, se siguieron los lineamientos de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

2) Elección de la región blanco para la guía sgRNA

La versión GRCz11 del genoma de pez cebra fue utilizada para elegir una región del genoma que no tuviera anotadas secuencias génicas, ni elementos de regiones regulatorias; ya que la inserción de un casete conteniendo una región mínima del promotor *ptf1a*, la secuencia de eGFP y el marco abierto de lectura de *Kras*^{G12D}, no debiera generar cambios fenotípicos, ni alteraciones del desarrollo en los individuos como consecuencia de la interrupción de una secuencia importante.

3) Diseño y clonación del sgRNA

Se utilizó la herramienta *CRISPR scan 1* para la búsqueda de la mejor secuencia blanco en una región central del cromosoma 18 del pez cebra.

La secuencia blanco fue utilizada para el diseño de las dos hebras del RNA guía utilizando las indicaciones de la página web ZiFiT, que permite obtener las secuencias de dos oligonucleótidos con extremos específicos para su posterior clonación en el vector DR274 (Addgene), diseñado para la posterior transcripción *in vitro* de las guías.

Los oligonucleótidos (sintetizados por la compañía IDT) se re-suspendieron en buffer TE hasta obtener una concentración de 10 μ M, se hibridaron mediante un protocolo de descenso lento de temperatura, sumergiendo el tubo con la mezcla 1:1 de oligonucleótidos en un vaso de precipitado conteniendo un litro de agua a 95 °C, y dejando llegar lentamente a temperatura ambiente. Los oligonucleótidos hibridados se digirieron con la enzima de restricción BsaI y se purificaron a partir de un gel de agarosa para clonarlos en el vector DR274 como se describe a continuación.

La clonación se llevó a cabo mediante ligación con enzima ligasa T4 en el vector DR274 (con resistencia a kanamicina) linealizado también con la enzima de restricción Bsal. Se transformaron bacterias DH5 α y se crecieron en medio LB con kanamicina. Se extrajo el DNA plasmídico de las colonias que crecieron en la placa de LB sólido-kanamicina y se secuenció para comprobar la identidad de la guía clonada.

4) Construcción del vector donador

4.1) Extracción de DNA genómico de embriones de peces cebra

El DNA genómico (gDNA) de peces, se obtuvo mediante el protocolo de purificación de DNA de tejidos (Protocol: *DNA purification from tissues*) con el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, cat. 51306). Para ello se utilizaron 30 embriones de peces cebra provenientes de cruza naturales, los cuales se colectaron y se mantuvieron en una incubadora a 28 °C por 48 horas. Una vez cumplido este tiempo, se les quitó el corión con pinzas (Dumont No.5) haciendo un corte gentil en el corion y volteándolos para que el embrión saliera (Westerfield, 2000).

Los 30 embriones de pez decorionados se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL en hielo por 5 minutos, se retiró el resto de agua y se les agregaron 180 μ L de buffer ATL y 20 μ L de proteinasa K. Se incubó la mezcla a 56°C por 1 hora, posteriormente se agregaron 4 μ L de RNAsa A y se incubaron con 200 μ L de buffer AL por 10 min a 70°C. Para precipitar el DNA se agregaron 200 μ L de etanol al 96%, se mezcló en el vortex y se pasó la mezcla a una columna provista por el kit. Se centrifugó 1 min a 8,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Para obtener una muestra más pura del DNA, éste se lavó y centrifugó alternadamente con los buffer AW1 y AW2. Para recuperar la muestra de material genómico, se agregó agua mili-

Q estéril a la membrana de la columna y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente dentro de un tubo Eppendorf limpio, se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min y se almacenó el DNA genómico a -20°C.

4.2) Diseño de oligonucleótidos

Para diseñar los oligonucleótidos se usaron en conjunto las herramientas Primer 3 plus, NCBI e IDT. Se eligieron los parámetros deseados para la creación de estas secuencias, también se tomaron en consideración criterios particulares como ubicación de los oligonucleótidos, longitud de los mismos, etc. Para los oligonucleótidos que requerían poseer fragmentos terminales que fueran reconocidos por alguna enzima, se agregaron los seis nucleótidos correspondientes a este sitio de reconocimiento, más algunos nucleótidos extra puesto que algunas enzimas no son eficientes cortando cerca del término de una secuencia de DNA. A estos pares de bases extra se les reconoce como “buffer zone” y dependen del tipo de enzima a utilizar.

La evaluación de estos oligonucleótidos se ejecutó mediante NCBI primer blast y IDT OligoAnalyzer. Se llevaron a cabo también PCR's *in vitro* utilizando los programas Bisearch y Genome Browser, los cuales dan como resultado las posibles regiones que se amplificarían utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados. Los oligonucleótidos que se diseñaron y utilizaron en este trabajo se enlistan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para obtener los insertos del vector donador.

Nombre	Uso	Secuencia de los oligonucleótidos (5'- 3')		Tm
Oligonucleótidos 1	Amplificación del promotor <i>ptf1a</i>	<i>Forward</i>	TTT TAA CGC GTC GGA CAT TG	53.8°C
		<i>Reverse</i>	TCA ATT GCC ATT TTA AAC GCT	51.5°C
Oligonucleótidos 2	Amplificación del brazo HA5'	<i>Forward</i>	GAC GGC CAG TGA ATT CAG CAT CAA CAA TGA CAT TTA ATA AGG	63.6°C
		<i>Reverse</i>	TAC CGA GCT CGA ATT CTA CTT TAT AGA CTC CTA CTG TTT TTA TAC TC	61.8°C
Oligonucleótidos 3	PCR anidada, oligonucleótidos externos	<i>Forward</i>	GCT CAT TTC TAT GCA TAG CTC AG	53.6°C
		<i>Reverse</i>	GGT CTC ATG GTT TGG TTC G	53.6°C
Oligonucleótidos 4	Amplificación del brazo HA3'	<i>Forward</i>	ACG CGT CGA CGT GTC AAA ATT AAT TGT TTT TTG G	61.5°C
		<i>Reverse</i>	CCC AAG CTT GGG ACA CAC ACA CAC ACA CTT	64.9°C
Oligonucleótidos 5	Amplificación de la construcción eGFP- <i>KRAS</i> ^{G12D}	<i>Forward</i>	CGC GGA TCC CGA TGA GTA AAG GAG AA	61.8°C
		<i>Reverse</i>	CGC GTC GAC GTC TCA CAT TAA TGC AC	61.7°C

4.3) Amplificación de HA5', *ptf1a* y HA3' mediante PCR

Las enzimas empleadas para la realización de estas PCR's (DNA polimerasas) fueron AmpliTaq Gold (Thermo Scientific, cat. N8080241) y CloneAmpHiFi PCR Premix (Takara, cat. 639298) esta última se utiliza en una pre-mezcla con el buffer y los dNTPs lista para usar. Ambas enzimas son altamente procesivas y poseen actividad de corrección de lectura.

La amplificación del promotor mínimo *ptf1a*, se realizó mediante PCR de punto final. Se utilizaron los oligonucleótidos número 1 de la **Tabla 1**, y el protocolo detallado en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Reactivos y programa para la amplificación del promotor *ptf1a*.

Reactivos	Cantidad	Programa
DNA genómico	500 ng	95°C por 30 segundos
Oligonucleótido <i>forward</i> (número 1) (10 µM)	5 µL	68°C por 120 segundos
Oligonucleótido <i>reverse</i> (número 1) (10 µM)	5 µL	95°C por 30 segundos
dNTPs (100 mM)	0.5 µL	65°C por 30 segundos x 3 ciclos
Buffer (10X)	5 µL	72°C por 120 segundos
Taq Gold (5U/ µL)	0.2 µL	95°C por 30 segundos
		60°C por 30 segundos x 3 ciclos
		72°C por 120 segundos
		95°C por 30 segundos
		55°C por 30 segundos x 35 ciclos
		72°C por 120 segundos

Para la amplificación del brazo de homología del extremo 5' (denominado HA5') se utilizó como molde el DNA genómico de embriones de peces cebras. Se llevó a cabo una PCR punto final, empleando los oligonucleótidos número 2 de la **Tabla 1**. Estos oligonucleótidos contienen 15 pb extras para su clonación por recombinación independiente de ligasa mediante el kit *In-fusion* (Takara Bio, cat. 121416) que se describe más adelante. Los reactivos y el programa utilizados se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Reactivos y programa para la amplificación del brazo de homología HA5'.

Reactivos	Cantidad	Programa
DNA genómico	500 ng	95°C por 30 segundos
Oligonucleótido <i>forward</i> (número 2) (10 µM)	5 µL	68°C por 120 segundos
Oligonucleótido <i>reverse</i> (número 2) (10 µM)	5 µL	95°C por 30 segundos
dNTPs (100 mM)	0.5 µL	66°C por 30 segundos x 3 ciclos
MgCl ₂ (25 mM)	5 µL	72°C por 60 segundos
Taq Gold (5U/ µL)	0.3 µL	95°C por 30 segundos
		63°C por 30 segundos x 3 ciclos
		72°C por 60 segundos
		95°C por 30 segundos
		60°C por 30 segundos x 30 ciclos
		72°C por 60 segundos

Los programas ingresados en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700, cat. P/N N805-0200) para el fragmento *ptf1a* y para el brazo HA5' se les conoce como "PCR *step-down*", en donde la temperatura inicia alta y va disminuyendo hasta la temperatura ideal de alineamiento de los oligonucleótidos. De esta manera se restringe el pegado inespecífico y se favorece la amplificación de las secuencias deseadas.

En la obtención del fragmento de homología llamado HA3' se realizó una PCR anidada en donde se emplearon dos pares de oligonucleótidos para lograr la amplificación de la secuencia deseada. Inicialmente se amplificó una región de 1200 pb que contiene la secuencia del brazo de homología HA3' utilizando los oligonucleótidos número 3, y el gDNA

del pez como molde. Los oligonucleótidos número 4 se utilizaron para la amplificación de la secuencia de tamaño esperado del HA3' (600 nt) utilizando como molde al producto obtenido con los oligonucleótidos número 3.

Los oligonucleótidos número 4 tienen sitios de corte para las enzimas Sall y BamHI para la posterior incorporación de este fragmento en el vector donador por el método tradicional de clonación con enzimas de restricción.

Los protocolos utilizados para la amplificación del fragmento que contiene al brazo HA3' y la secuencia específica HA3' se detallan en la **Tabla 4** y **Tabla 5**, respectivamente. El programa de PCR para obtener la secuencia específica HA3' utiliza dos temperaturas, una que no contempla los nucleótidos de los sitios de corte de las enzimas de restricción y otra más elevada que tiene en cuenta estos nucleótidos externos.

Tabla 4. Reactivos y programa para la amplificación del segmento que contiene al brazo de homología HA3'.

Reactivos	Cantidad	Programa
DNA genómico	50 ng	98°C por 30 segundos 53.6°C por 30 segundos x 25 ciclos 72°C por 120 segundos
Oligonucleótido <i>forward</i> (número 3) (10 µM)	0.75 µL	
Oligonucleótido <i>reverse</i> (número 3) (10 µM)	0.75 µL	
<i>CloneAmp HiFi</i>	12.5 µL	

Tabla 5. Reactivos y programa para la amplificación del brazo de homología HA3'.

Reactivos	Cantidad	Programa
DNA molde	10 ng	98°C por 10 segundos
Oligonucleótido <i>forward</i> (número 4) (10 µM)	0.75 µL	

Oligonucleótido <i>reverse</i> (número 4) (10 µM)	0.75 µL	57°C por 30 segundos x 15 ciclos 72°C por 30 segundos 98°C por 10 segundos 68°C por 60 segundos x 15 ciclos
<i>CloneAmp HiFi</i>	12.5 µL	

4.4) Diseño y síntesis de eGFP-Kras^{G12D}

El inserto denominado *eGFP-Kras^{G12D}* se envió a sintetizar en GBLOCK (fragmentos de DNA de doble cadena que van desde 125 hasta 3000 pb, estas construcciones son de alta fidelidad y están listas para su utilización en diferentes experimentos) a la compañía IDT. Éste contiene la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente eGFP fusionada a la secuencia codificante del transcrito KRAS-201 de 984 pb (versión Zv9 del ensamble del genoma de pez cebra, Ensembl) en la cual se modificó el codón 12 para generar una mutación puntual de GGC a GAC, e imitar de esta manera la mutación natural KRAS^{G12D} que genera el cambio del aminoácido glicina a aspartato.

Se realizó una PCR punto final sobre este GBLOCK para añadirle sitios de corte para las enzimas HindIII y Sall y así poderlo clonar al vector donador. Los oligonucleótidos utilizados para esta PCR fueron los número 5 de la **Tabla 1**. Los detalles de la reacción se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Reactivos y programa para la amplificación del segmento *eGFP-Kras^{G12D}*.

Reactivos	Cantidad	Programa
GBLOCK	10 ng	

Oligonucleótido <i>forward</i> (número 5) (10 µM)	0.75 µL	98°C por 30 segundos 61°C por 30 segundos x 25 ciclos 72°C por 120 segundos
Oligonucleótido <i>reverse</i> (número 5) (10 µM)	0.75 µL	
CloneAmp HiFi	12.5 µL	

4.5) Purificación de los vectores y productos de PCR

Para verificar el tamaño esperado de los productos amplificados y de los vectores digeridos se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando los marcadores de peso molecular “*ZipRuler Express DNA Ladder 1*” de *Thermo Fisher Scientific (SM1373)*, *2-Log DNA Ladder (N3200S)* de *New England Biolabs* y *Trackit 1Kb Plus DNA Ladder (10488085)* de *TermoFisher Scientific*. Las electroforesis se realizaron a 80-95 volts durante 30-50 minutos.

Los vectores digeridos para clonación y los productos de PCR previos a su digestión se purificaron a partir de los geles de agarosa para eliminar fragmentos no deseados. Se utilizó el kit de QIAGEN “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (28706). El primer paso para esta purificación fue el cortar las bandas de tamaño esperado del gel de agarosa y pesarlos, guardarlos en tubos Ependorff, agregar 3 volúmenes de buffer QG, incubar en un termo-shaker a 56°C por 10 minutos, y agitarlos. Posterior al tiempo de incubación se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló antes de colocar todo en una columna de 2 mL proporcionada por el kit para después centrifugarla durante 1 min a 13,000 rpm. Concluida la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se lavó la columna con 750 µL de buffer PE, el cual también se centrifugó y desechó. Para recuperar el DNA se agregaron 30 µL de agua

mili Q al centro de la membrana de la columna y se pasó ésta a un tubo Eppendorf limpio, se incubó por 4 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm. La concentración de los productos purificados se determinó mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer). Los productos se conservaron en un congelador REVCO a -20°C.

Los productos de PCR digeridos con enzimas de restricción se purificaron siguiendo el protocolo del kit “QIAquick PCR purification Kit” (Cat. 28106) de QIAGEN para eliminar sales y enzimas de digestión. Para esta purificación, se agregaron 5 volúmenes de buffer PB por cada volumen de producto de PCR, se pasó la mezcla a una columna provista por el kit dentro de un tubo Eppendorf limpio, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó la columna con 750 µL de buffer PE y se centrifugó. Se pasó la columna a un tubo limpio para eluir el DNA con 30 µL de agua mili Q estéril, se midió la concentración por Nanodrop y se guardó el producto a -20°C.

4.6) Inserción de *ptf1a* mediante clonación TA en el backbone del vector *ptz57R/T* para obtener el vector *ptf1a*

Para insertar el fragmento *ptf1a* al vector lineal pTZ57R/T se utilizó el kit de clonación “InsTAclone PCR” (Thermo Scientific, cat. FERK1214). Se aprovechó la secuencia “polylinker” del vector (3'-ddT) y la actividad terminal transferasa de la Taq DNA polimerasa que agregó bases A en el extremo 3' del producto *ptf1a*. La reacción de ligación se detalla en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Especificaciones para la ligación de *ptf1a* con el vector *pTZ57R/T*.

Reactivo	Cantidad
Vector pTZ57R/T (0.17 pmol ends)	3 µL

5X Ligation Buffer	6 μ L
Producto de PCR (0.52 pmol ends)	0.52 pmol ends
T4 DNA ligasa	1 μ L
Agua libre de nucleasas	c.s.p. 30 μ L

Esta mezcla de ligación se incubó por 1 hora a 22°C. Se utilizaron 2.5 μ L de la mezcla de ligación para la transformación de las bacterias.

4.7) Inserción de HA5' mediante clonación *In-fusion* en el sitio de múltiple clonado del vector *ptf1a* para construir el vector HA5'-*ptf1a*

El vector *ptf1a* (backbone de pTZ57R/T con el promotor mínimo *ptf1a* clonado) se digirió con la enzima EcoRI (*New England Biolabs*, Cat. R0101S) para linealizarlo. El producto de PCR HA5', se purificó y clonó mediante el kit de *In-fusion* directamente en el vector linealizado, aprovechando las regiones de homología agregadas a la secuencia HA5'. Para ligar el vector y este inserto, se siguió el manual de usuario del kit "In-Fusion HD Cloning Kit User Manual" (Takara Bio, Cat. 121416) protocolo I (**Tabla 8**).

Tabla 8. Especificaciones para la unión del vector *pTZ57R/T-ptf1a* con HA5'.

Reactivo	Cantidad
Vector linearizado	120 ng
HA5'	54 ng
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μ L

Agua libre de nucleasas	c.s.p. 10 µL
-------------------------	--------------

Se incubó esta reacción por 15 minutos a 50°C, se guardó en hielo para con él transformar bacterias competentes Stellar (Takara Bio, cat. 636766).

4.8) Inserción de HA3' mediante clonación con enzimas de restricción en vector HA5'-ptf1a para construir el vector HA5'-ptf1a-HA3'

Para insertar el brazo de homología HA3' dentro del vector HA5'-ptf1a se realizó primero una digestión doble, tanto del vector como del inserto. Las enzimas empleadas fueron Sall-HF (New England Biolabs, cat. R3138S) y HindIII-HF (New England Biolabs, cat. R3104S). Se linealizó el vector y se generaron sitios de unión entre el inserto y el vector. Se siguieron las instrucciones del fabricante mediante su programa NEBcloner v1.4.0 en internet (Tabla 9).

Tabla 9. Especificaciones de la digestión doble para el vector pT57R/T-HA5'-ptf1a y el inserto HA3'.

Reactivo	Cantidad
DNA	1 µg
10X CutSmart Buffer	5 µL (1X)
Sall-HF	1 µL (20 unidades)
HindIII-HF	1 µL (20 unidades)
Agua libre de nucleasas	c.s.p. 50 µL

Se incubó esta reacción a 37°C por 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo se desactivaron las enzimas: Sall-HF a 65°C por 20 min y HindIII-HF a 80°C por el mismo tiempo.

Posterior a la digestión, el inserto se purificó por columna y el vector se purificó a partir del gel de agarosa para eliminar las especies no digeridas. La ligación entre inserto y vector se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de ligación descrito en la página web de *New England Biolabs* “Ligation Protocol with T4 DNA Ligase” (M0202), con un cociente molar 1:3 vector: inserto. Se empleó la ligasa T4 de esta misma compañía (**Tabla 10**).

Tabla 10. Especificaciones de la ligación del inserto *HA3'* y el vector *HA5'-ptf1a*.

Reactivo	Cantidad
DNA vector	100 ng
Inserto HA3'	37.56 ng
10X T4 DNA ligasa buffer	2 µL
T4 DNA ligasa	1 µL

Para insertos y vector con extremos cohesivos, se incubó la reacción 20 min a temperatura ambiente y a 16°C toda la noche.

4.9) Inserción de eGFP-Kras^{G12D} mediante clonación con enzimas de restricción en vector *HA5'-ptf1a-HA3'* para construir el vector Donador (*HA5'-ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}-HA3'*)

Para insertar el GBLOCK también fue necesario realizar una doble digestión, para este paso se emplearon las enzimas BamHI (R0136S) y Sall (R0138S) de New England Biolabs. Se utilizó el protocolo de la **Tabla 11**.

Tabla 11. Especificaciones de la digestión doble para el vector HA5'-ptf1a-HA3' y el inserto eGFP-Kras^{G12D}.

Reactivo	Cantidad
DNA	1 µg
10X NEBuffer 3.1	5 µL (1X)
BamHI	1 µL (20 unidades)
Sall	1 µL (20 unidades)
Agua libre de nucleasas	c.s.p. 50 µL

Se incubó la reacción a 37°C por 4 horas. En este caso solo se requirió la inactivación de la enzima Sall a 65°C por 20 minutos.

Para insertar el fragmento eGFP-Kras^{G12D} dentro del vector HA5'-ptf1a-HA3' se realizó una ligación de acuerdo con el protocolo de ligación descrito en la página web de *New England Biolabs* "Ligation Protocol with T4 DNA Ligase" (M0202), con un cociente molar 1:3 vector: inserto. Se empleó la ligasa T4 de esta misma compañía (**Tabla 12**).

Tabla 12. Especificaciones de la ligación del inserto eGFP-Kras^{G12D} y el vector pTZ57R/T-HA5'-ptf1a.

Reactivo	Cantidad
DNA vector	100 ng
Inserto eGFP-Kras ^{G12D}	71.16 ng
10X T4 DNA ligasa buffer	2 µL
T4 DNA ligasa	1 µL

Esta reacción se dejó 20 min a temperatura ambiente y en un *termoblock* (*ThermoStat plus*, Eppendorf) a 16°C toda la noche.

5) Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica de gran utilidad que nos permite la separación y observación de muestras de DNA. Esta técnica se basa en el tamaño y carga de las moléculas a analizar, las cuales se mueven mediante la emisión de corriente eléctrica que pasa a través del gel en un medio líquido.

Este medio líquido es un buffer, se puede emplear buffer TAE o buffer TBE, durante la realización de este experimento todas las electroforesis se llevaron a cabo con buffer TBE 1x (**Tabla 13**).

Tabla 13. Preparación de buffer TBE 10x para 1L.

Reactivo	Cantidad	Concentración
Tris base	121.1 g	1 M
Ácido bórico	61.8 g	1 M
EDTA	7.4 g	0.02 M
H ₂ O miliQ	c.s.p 1L	

El buffer de carga para el DNA se compró en *New England Biolabs* “Gel Loading Dye, Blue (6X)” (cat. B7021S), y utiliza azul de bromofenol.

Es necesario preparar un gel de agarosa para esta técnica. Primero se pesó la agarosa, se colocó en un frasco Erlenmeyer, y se le añadió un volumen del buffer TBE 1x. El porcentaje de agarosa depende del tamaño de DNA a resolver (Thermo Fisher Scientific, 2012). Esta mezcla se calentó en un horno de microondas convencional procurando que no llegara a

ebullición, pero si fundiendo toda la agarosa. Se dejó enfriar durante 10 min aproximadamente a temperatura ambiente, se le añadió colorante para el DNA llamado “SYBR Safe DNA Gel Stain” (Thermo Scientific, cat. S33102) y se vertió en un soporte de electroforesis con un peine que generó pocillos donde se depositó el DNA con el buffer de carga.

Una vez que la mezcla de la agarosa solidificó, se retiró el peine y se colocó en una cámara de electroforesis la cual se rellenó con el buffer TBE 1x cubriendo el gel.

Las muestras de DNA se cargaron en el gel con el buffer de carga de DNA al 1x. Las electroforesis se realizaron en un rango de 70-100 V por 30-50 min en función del tamaño del gel de agarosa, su concentración y el DNA a analizar. Una vez transcurrido el tiempo, la visualización del DNA se hizo mediante un aparato llamado fotodocumentador (BIO-RAD).

6) Transformación de bacterias

Para los dos primeros insertos dentro del vector *pTZ57R/T* se emplearon transformaciones en “células competentes Stellar” (Takara Bio, cat. 636766) siguiendo el protocolo de transformación “Protocol PT5055-2”, que consistió en descongelar las células necesarias a utilizar en hielo, seleccionar 50 μ L y ponerlas en un tubo *Falcon*, se agregaron 5 μ L de mezcla de ligación y pusieron los tubos en hielo por 30 min, se hizo un choque de calor a las células a 42°C, exactamente por 45 segundos. Se regresaron los tubos a hielo por 1-2 minutos. Se agregó 450 μ L de medio SOC y se dejó en agitación (160-225 rpm) por 1 hora a 37°C. Las bacterias se plaquearon en 100 μ L en LB sólido con ampicilina (10-100ng) y se incubaron en cajas petri a 37°C durante toda la noche.

Para la clonación de los últimos dos insertos se emplearon transformaciones en bacterias XL-1blue con el kit “TransformAid Bacterial Transformation” (Thermo Scientific, cat. K2711) que genera células químicamente competentes en pocos pasos utilizando cloruro de

calcio. Se descongelaron células *Escherichia coli* XL-1blue y se tomaron 30 μ L para sembrarlos en cajas de LB sólido, sin antibiótico, se dejaron crecer a 37°C por 12 horas.

Se seleccionó un cuadro de bacterias de aproximadamente 4x4 mm y se colocaron en 1.5 mL de C-medio dentro de la incubadora a 37°C por 2 horas en agitación (100-250 rpm). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugó el tubo con las bacterias y el medio líquido por 1 min a 4,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet de bacterias se re-suspendió en 300 μ L de solución T (Solución A+B en partes iguales) y se incubaron en hielo durante 5 min. Se centrifugó esta mezcla y se desechó el sobrenadante, igualmente, al *pellet* se le agregaron 200 μ L de solución T y se re suspendieron las células, esto se colocó en hielo por 5 minutos. En tubos Eppendorf limpios y por separado, se agregaron 5 μ L (10-100ng) de mezcla de ligación, 5 μ L de un vector cerrado para el control positivo, 5 μ L de vector abierto para el control negativo y 5 μ L de agua para el control negativo de la técnica. Estos tubos se pusieron a enfriar en hielo por 2 min, posterior a esto se les agregaron 50 μ L de bacterias con solución T a cada tubo, se mezclaron por pipeteo y se colocaron en hielo durante 5 min.

En cajas con LB sólido más ampicilina (100 μ g/ μ L) se plaquearon 50 μ L de las bacterias con las soluciones antes mencionadas y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

7) Extracción de plásmido

De las cajas plaqueadas con las bacterias transformadas previamente incubadas, se seleccionaron colonias aisladas y se crecieron en tubos con 3 mL de medio LB líquido y ampicilina (100 μ g/ μ L) a 37°C por 16 horas en agitación (100-250 rpm).

La extracción de plásmido se realizó con el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” (QIAGEN, cat. 27106). Los cultivos líquidos se pasaron a tubos Eppendorf, se centrifugaron para concentrar las bacterias en un *pellet*. El botón se re suspendió en 250 μ L de buffer P1, se le

agregaron 250 μ L de buffer P2 y 350 μ L de buffer N3, se mezcló invirtiendo el tubo suavemente 6 veces. Se centrifugó la mezcla por 10 min a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se puso en la columna provista por el kit, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Para lavar la columna se agregaron 500 μ L de buffer PB y 750 μ L de buffer PE, alternadamente se centrifugó por 1 min. Para recuperar el plásmido de la columna se añadieron 30 μ L de agua miliQ estéril y se dejó incubando por 5 minutos, una vez completado ese tiempo se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm. El plásmido se cuantificó en Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) para medir la concentración y se guardó a una temperatura de -20°C .

8) Confirmación de la identidad de los insertos y el vector donador mediante mapas de restricción

Para confirmar la inserción de cada uno de los fragmentos en el vector, se realizaron cortes con enzimas de restricción para comprobar la variación de tamaños. Una vez digerido el plásmido con la combinación elegida de enzimas, se realizaron electroforesis para comprobar si los fragmentos resultantes de la digestión coincidían con los esperados.

La inserción del promotor *ptf1a* se evaluó mediante el incremento en el tamaño del vector luego de la digestión con la enzima EcoRI, y posteriormente se confirmó su identidad mediante secuenciación Sanger.

La inserción de HA5' se confirmó mediante digestión con las enzimas Sall y PstI, y su posterior secuenciación.

Después de la clonación de HA3' en el vector *HA5'-ptf1a* se realizó una digestión con NdeI (R0111S) y PvuII (R0151S) para comprobar la presencia del inserto. Ambas enzimas cortan en la región del brazo HA3' y en otras regiones del vector, por lo que se esperó un patrón de 4 bandas de pesos diferentes.

Para comprobar la clonación de *eGFP-Kras^{G12D}* en el vector *HA5'-ptf1a-HA3'* se realizaron digestiones independientes con las enzimas Sall (R0138S), HindIII (R0104S) y PvuII de New England Biolabs.

Se llevó a cabo una digestión combinando las enzimas HindIII, NdeI y PvuII para comprobar la clonación de todos los insertos en el vector final.

Para elaborar los mapas de restricción y predecir el patrón de bandeo después de las digestiones con las enzimas de restricción se utilizó el programa SnapGene Viewer versión 4.3.6.

9) Confirmación de la identidad del vector mediante secuenciación

La identidad de cada fragmento clonado en el backbone del vector pTZ57R/T se comprobó mediante secuenciación Sanger.

10) Obtención del vector portador de Cas9

Se obtuvieron los vectores pCS2-nCas9n-nanos-3'UTR y pCS2-nls-zcas9-nls de Addgene, catálogo 62542 y 47929 respectivamente. Las células tipo DH5 α fueron transformadas con estos vectores.

IX. RESULTADOS

1) Elección de la región blanco para la sgRNA guía

Se eligió una secuencia intergénica dentro del cromosoma 18 del pez cebra, la cual no contiene elementos anotados de secuencias codificantes, ni regulatorias. Esta región se ubica entre los genes *large2* y *cngb1a* (**Figura 4**), en la posición GRCz11:18:45416194:45417866:1 del genoma del pez cebra (Ensembl).

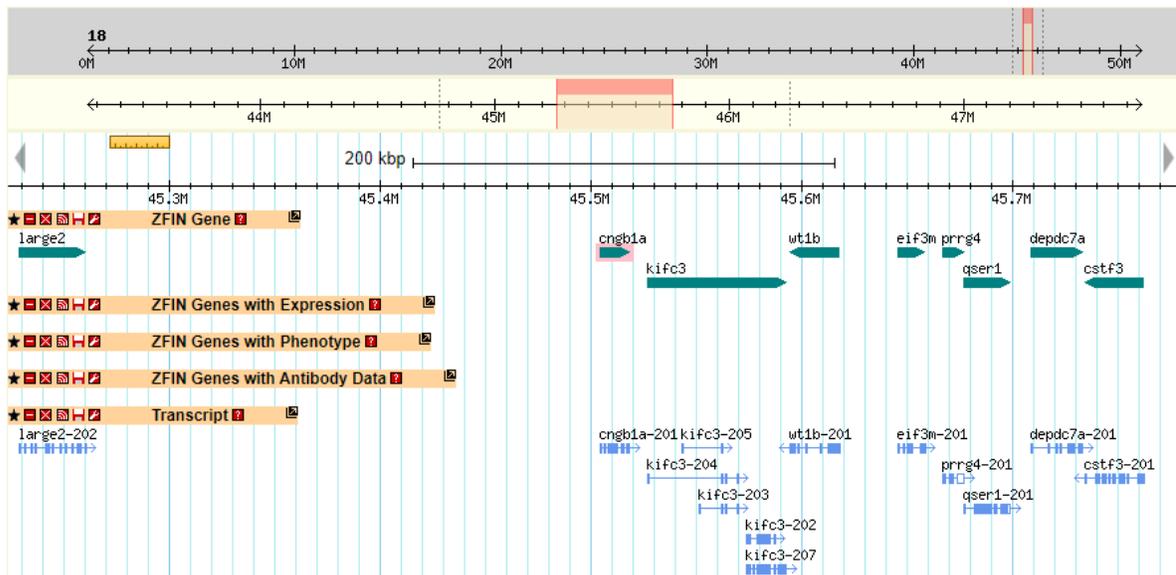


Figura 4. Región elegida para la inserción de la construcción *ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}* en el cromosoma 18 del pez cebra, entre los genes *large2* y *cngb1a*.

2) Diseño y clonación del sgRNA

La secuencia blanco AGTAGGAGTCTATAAAGTAG en el cromosoma 18 fue utilizada para el diseño de las dos hebras del RNA guía.

gRNA_1a: 5' TAGGTAGGAGTCTATAAAGTAG 3'

gRNA_1b: 5' AACCTACTTTATAGACTCCTA 3'

Estas secuencias fueron hibridadas y clonadas en el vector DR274 de 2103 pb (**Figura 5**), como se detalla en materiales y métodos, para su posterior transcripción *in vitro* utilizando el kit comercial Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems (PROMEGA) con la

enzima RNA polimerasa T7.

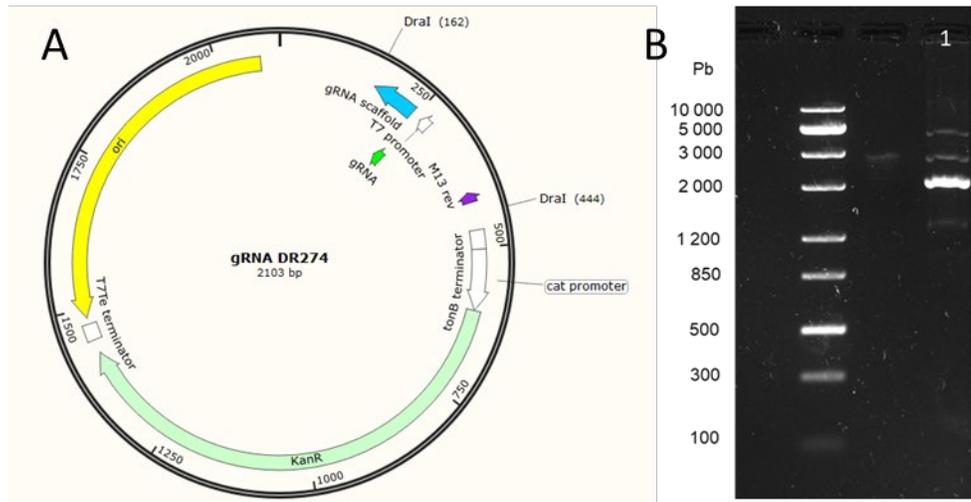


Figura 5. A. Mapa del vector DR274. B. Vector DR274 linealizado con BsaI en agarosa al 1%.

La identidad de la guía clonada en el vector DR274 fue confirmada mediante secuenciación Sanger (**Figura 6**).

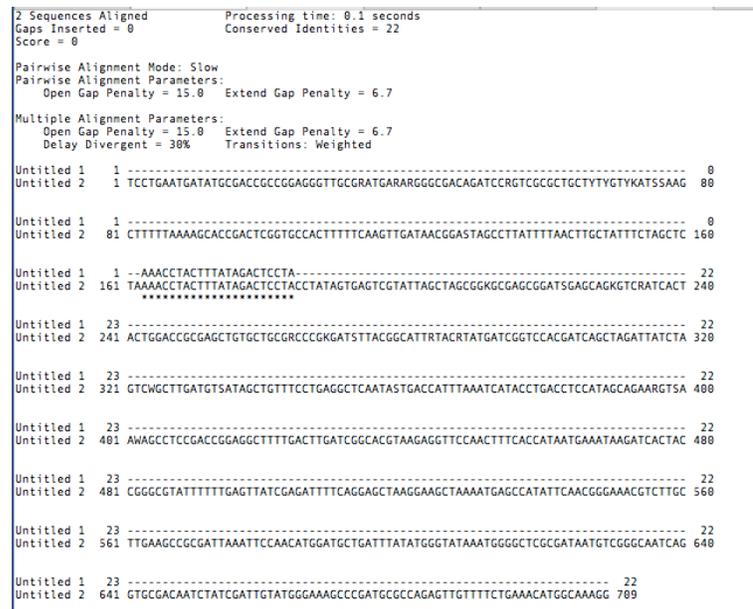


Figura 6. Alineación de la región del cromosoma 18 y el fragmento obtenido de la reacción de secuenciación del vector DR274-Guía1.

3) Construcción del vector donador

3.1) Elección de un promotor con dominio exclusivo en páncreas

Esta región dentro del pez cebra fue encontrada por Pashos *et al.* (2013). Ellos diseñaron oligonucleótidos para su obtención y amplificación, se utilizaron esos oligonucleótidos para obtener el mismo fragmento a partir de DNA genómico del pez cebra en este trabajo.

3.2) Obtención de las secuencias HA5', *ptf1a*, *eGFP-Kras^{G12D}* y HA3'

Para la amplificación mediante PCR de las secuencias del promotor mínimo de páncreas *ptf1a* y de los brazos de homología HA5' y HA3', se extrajo DNA genómico a partir de 30 embriones de pez cebra de la cepa Tab wik, este DNA genómico pesa alrededor de 1427.29 Mb lo cual fue comprobado (**Figura 7**).

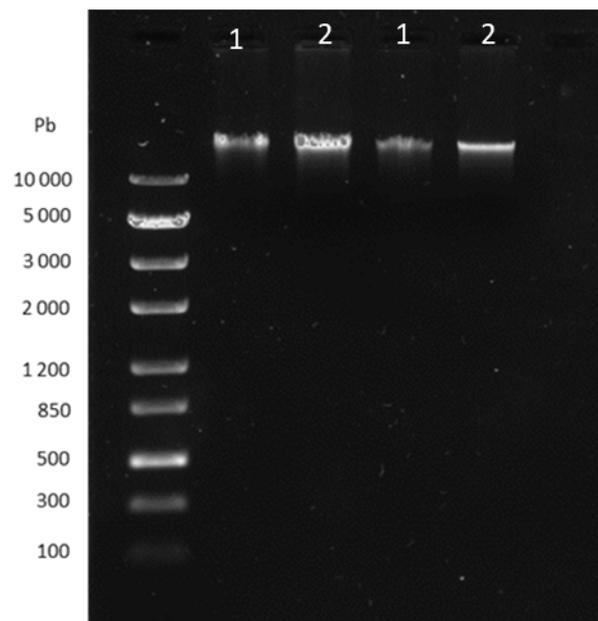


Figura 7. DNA genómico de *Danio rerio* en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: gDNA 100ng; Carril 2: gDNA 200ng. Marcador de peso molecular, 1KBplus.

Para la amplificación de los insertos *ptf1a*, HA5' y HA3' para su posterior integración al genoma del pez cebra se utilizó el gDNA del pez como molde. Para la obtención del promotor

mínimo *ptf1a* y del brazo de homología HA5' se realizaron PCR's punto final con los oligonucleótidos especificados en la **Tabla 1** y las condiciones especificadas en materiales y métodos. Un fragmento de aproximadamente 1300 pb obtenido por PCR se observó en un gel de agarosa de 1 %, sugiriendo la correcta amplificación del promotor *ptf1a* (1311 pb) (**Figura 8**). Un producto de aproximadamente 600 pb (**Figura 9**) fue obtenido por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para HA5' (631 pb), sugiriendo la amplificación del producto esperado.

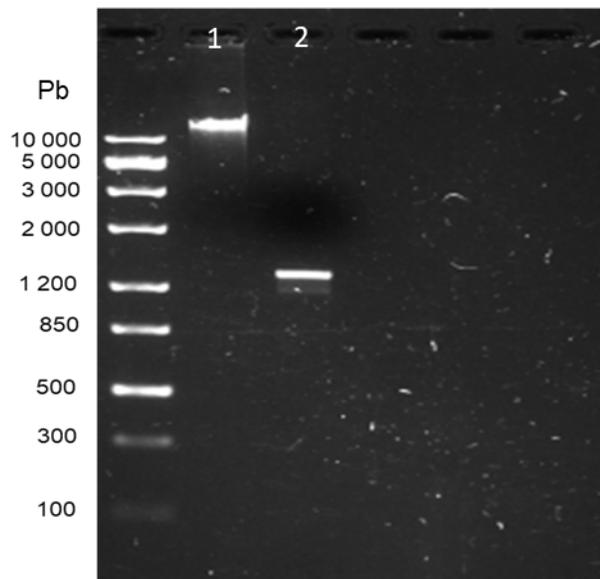


Figura 8. Promotor mínimo de *ptf1a*. Carril 1: gDNA de pez cebra. Carril 2: Promotor de *ptf1a*. Gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.

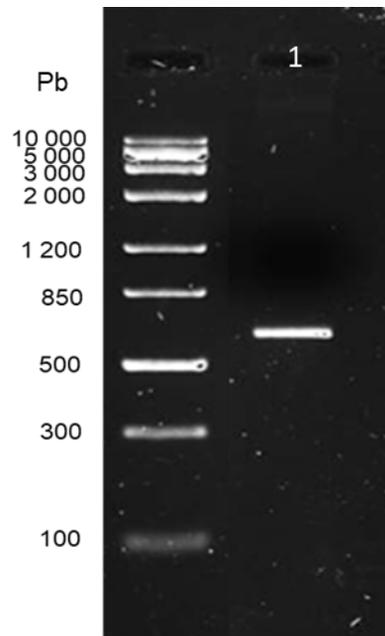


Figura 9. Fragmento HA5' en un gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.

La **Figura 10. A.** muestra un gel de agarosa con una banda de aproximadamente 1169 pb, la cual corresponde a la amplificación de una secuencia más extensa del brazo de homología HA3' obtenida a partir del molde gDNA. A partir de esta secuencia y con los oligonucleótidos número 4 especificados en la **Tabla 1** se obtuvo el fragmento HA3'. En la **Figura 10. B.** Se muestran dos bandas, una mayor a 1200 pb y la segunda de 600 pb, la cual correspondería al brazo de homología HA3'. La banda esperada de 600 pb se purificó a partir del gel de agarosa.

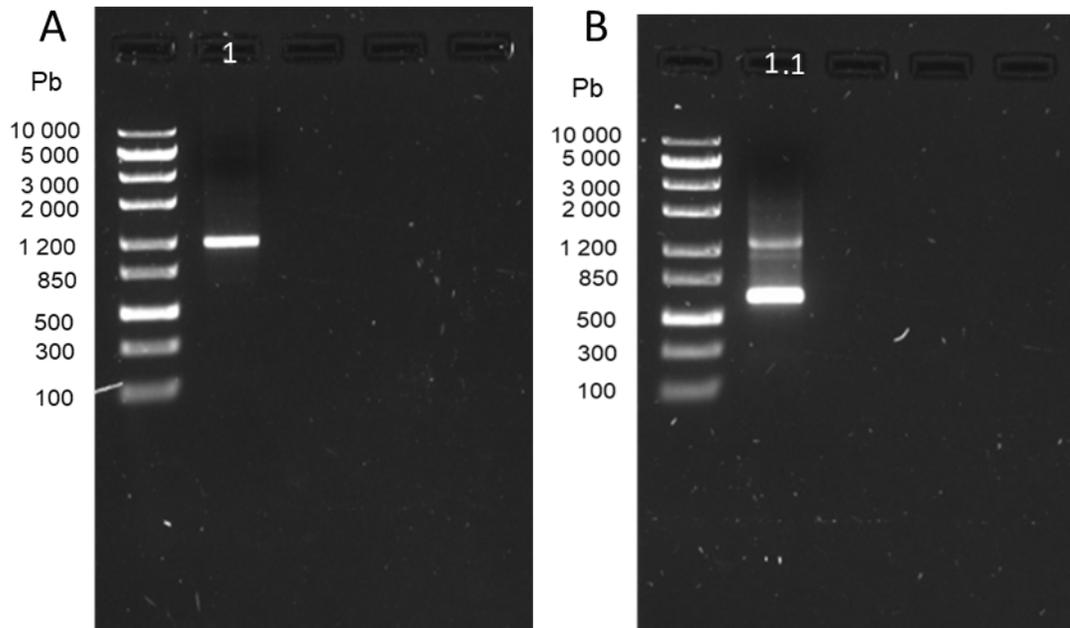


Figura 10. A. Producto de PCR de 1169 pb. **B.** Productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos 4. Agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.

El producto de PCR *eGFP-Kras^{G12D}* obtenido utilizando oligonucleótidos con sitios para enzimas de restricción, se corrió y visualizó en un gel de agarosa al 1%. Se observó una banda de 1278 pb sugiriendo la correcta amplificación de dicho fragmento (**Figura 11**).

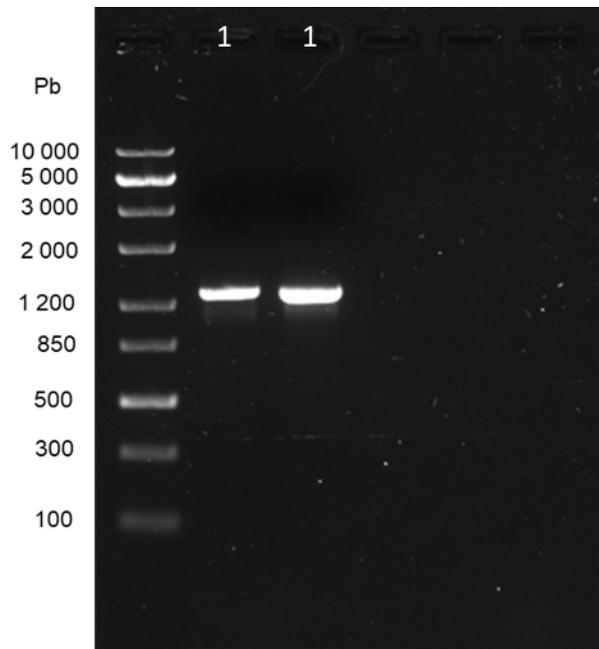


Figura 11. Producto de PCR *eGFP-Kras^{G12D}* con los sitios para enzimas de restricción en un gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular, 1KBPlus.

3.4) Clonación de HA5', *ptf1a*, *eGFP-Kras^{G12D}* y HA3' en el vector pTZ57R/T

La clonación de todos los insertos se realizaron con estrategias diversas, como se especifica en materiales y métodos. El orden de inserción dentro del vector es el siguiente: promotor mínimo de *ptf1a*, brazo de homología HA5', brazo de homología HA3' y *eGFP-Kras^{G12D}* de acuerdo con la estrategia elegida de clonación. Los métodos empleados consistieron en el sistema de clonación TA, la tecnología *In-fusion* y técnicas de clonado con enzimas de restricción respectivamente. El tamaño creciente del vector permitió evaluar la inserción de cada uno de los elementos de manera secuencial. El vector tiene un peso inicial de 2,887 pb (**Figura 12**).

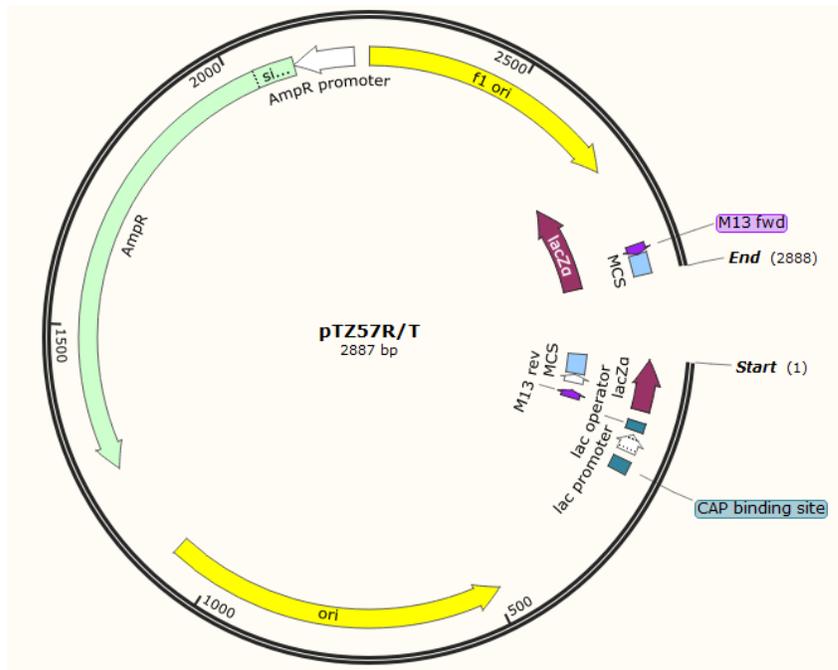


Figura 12. Mapa del vector de clonación *pTZ57R/T*.

La clonación del inserto promotor mínimo *ptf1a* mediante clonación TA, se comprobó mediante linealización del vector *ptf1a* (vector *pTZ57R/T-ptf1a*) con la enzima *EcoRI* y su visualización posterior con electroforesis en gel de agarosa al 1%. El fragmento clonado ya en el vector le da un peso de 4199 pb (**Figura 13**).

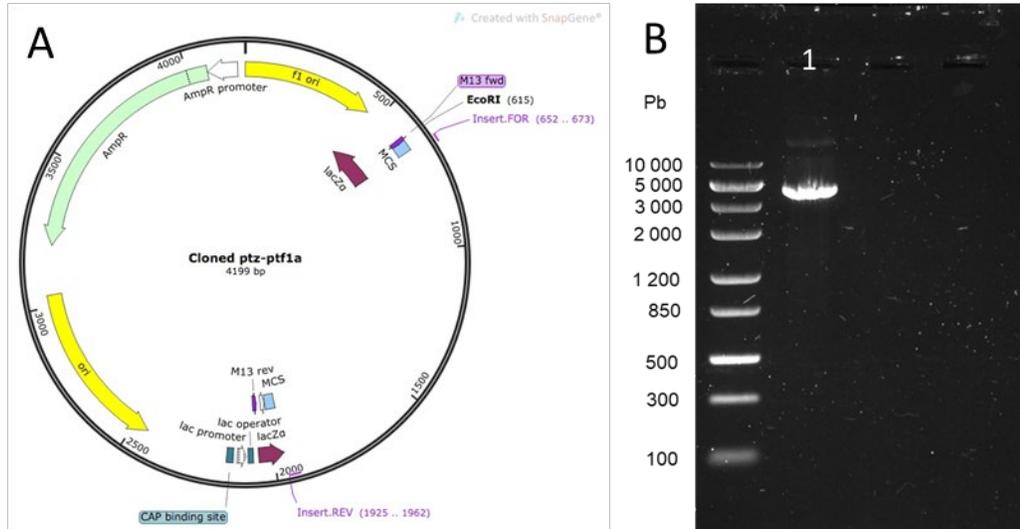


Figura 13. A. Mapa del vector ptf1a. **B.** Vector ptf1a linealizado en un gel de agarosa al 1%.

La clonación del inserto HA5' mediante la técnica “*In-fusion*”, se comprobó mediante digestión del vector resultante, con las enzimas Sal I y PstI por separado. La digestión con SalI solo linealizó al vector, el cual tiene un peso de 4804pb. Al ser digerido con PstI se obtuvieron dos bandas, una de 3627 y otra de 1177 pb que se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. (**Figura 14**).

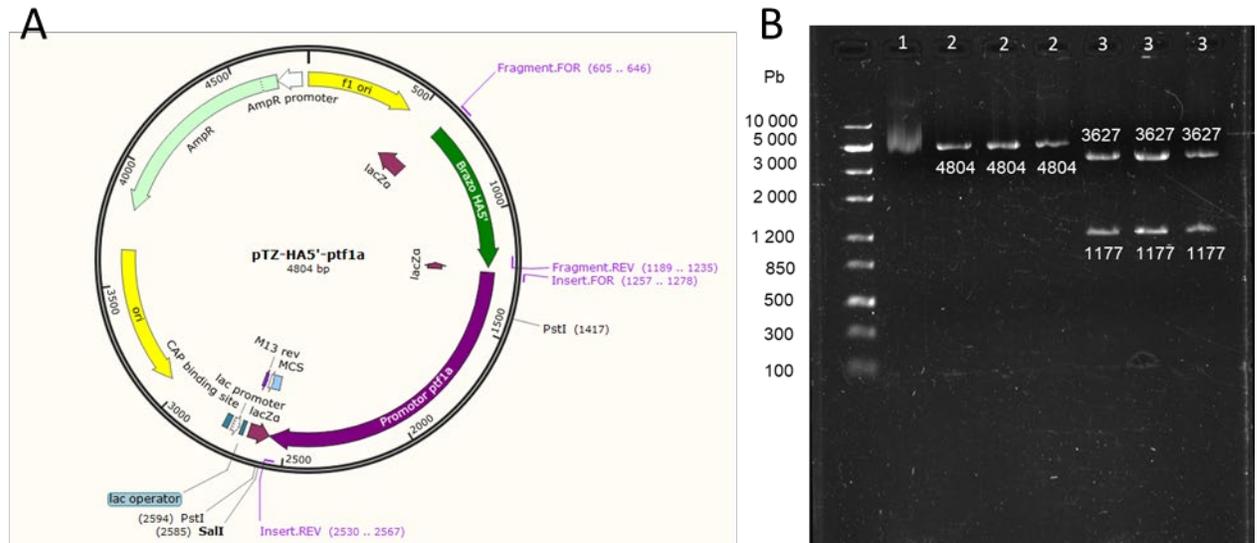


Figura 14. A. Mapa del vector HA5'-ptf1a con los sitios de restricción para las enzimas Sall y PstI. **B.** Bandas del vector HA5'-ptf1a digerido en un gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: Vector sin digerir; Carril 2: Vector digerido con Sall; Carril 3: Vector digerido con PstI.

La clonación del inserto HA3' se comprobó a través de un mapa de restricción sobre el vector resultante *HA5'-ptf1a-HA3'*, el cual se obtuvo luego de la selección de las colonias que crecieron en agar sólido con ampicilina luego de la transformación (**Figura 15**).

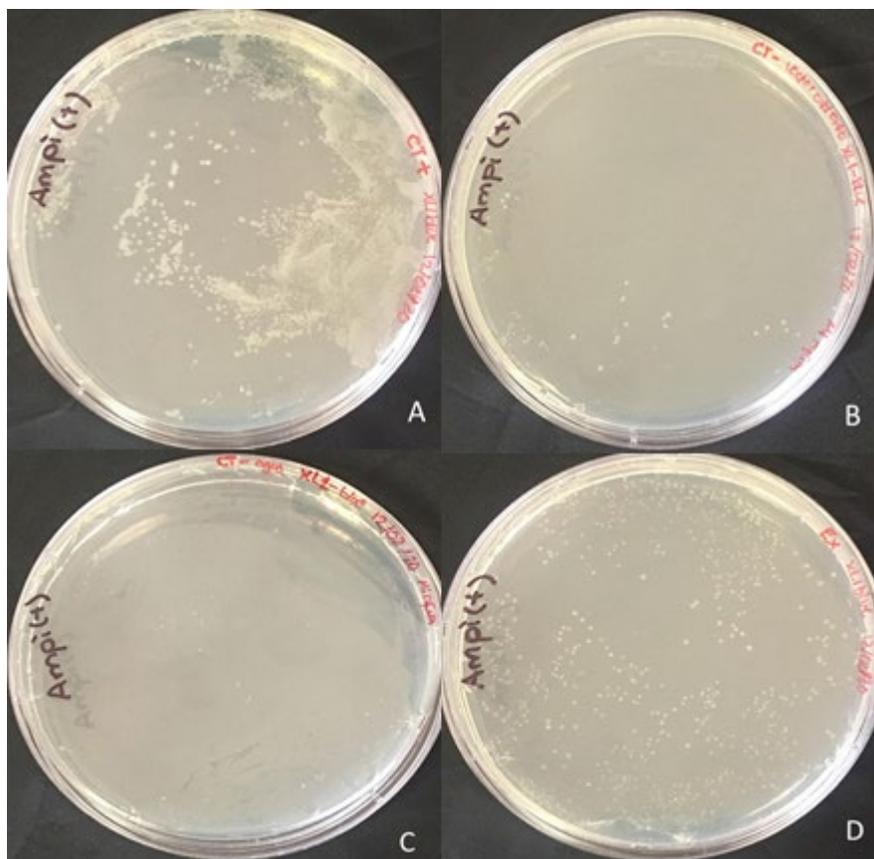


Figura 15. Transformación de la ligación de HA5'-ptf1a con HA3' en bacterias XL1Blue. A) Control positivo. B) Control negativo con el vector abierto. C) control negativo sin vector. D) Ligación con el inserto HA3'.

Un mapa de restricción del vector *HA5'-ptf1a-HA3'* se llevó a cabo utilizando las enzimas de restricción PvuII y NdeI en combinación, se obtuvieron 4 bandas, una de 2513 pb, una de 2172 pb, una tercera de 433 pb y una cuarta de 273 pb (**Figura 16**), como era de esperarse, sugiriendo la presencia del inserto HA3' en el vector.

También se realizaron digestiones independientes utilizando PvuII y NdeI. El corte con NdeI linealizó el vector, dando un tamaño de 5391 pb (**Figura 16**), la enzima PvuII generó 3 bandas, dos de las cuales tuvieron 2513 y 2445 pb (no diferenciables en el gel). Los tamaños y patrones de bandeos se compararon entre el vector *HA5'-ptf1a- HA3'* y el vector previo

HA5'-ptf1a, para el cual la enzima PvuII sólo genera dos bandas de 2513 y 2291 pb, con la finalidad de confirmar la presencia de HA3' en el vector.

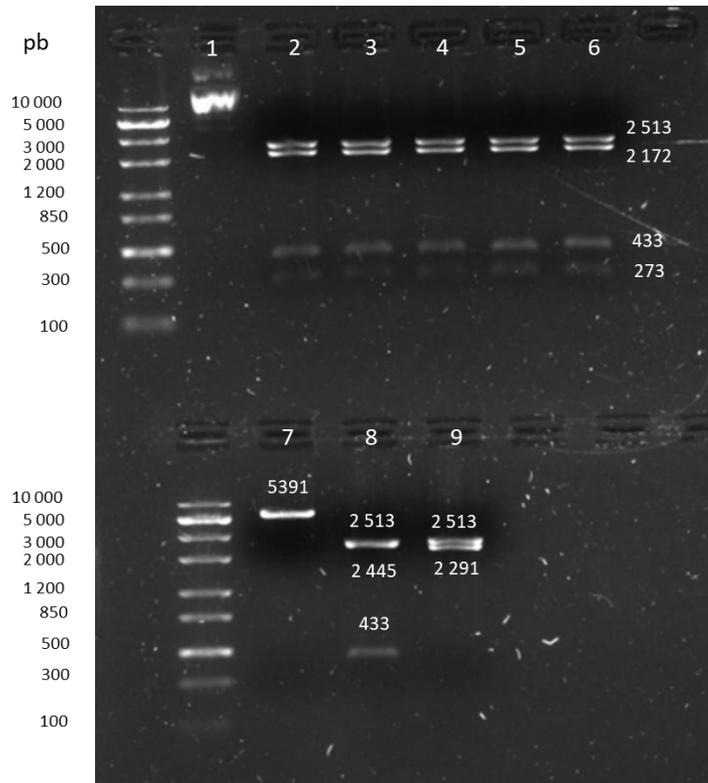


Figura 16. Mapa de restricción del vector HA5'-ptf1a-HA3'. Carril 1: Vector cerrado; Carriles 2-6: Vector de las colonias (1 a la 5) digeridas con PvuII y NdeI en una doble digestión; Carril 7: Vector de la colonia 5 digerido con NdeI; Carril 8: Vector de la colonia 5 digerido con NdeI; Carril 9: Vector HA5'-*ptf1a* digerido con PvuII. Gel de agarosa al 0.8%

La clonación de la construcción *eGFP-Kras^{G12D}*, se llevó a cabo mediante enzimas de restricción como se detalla en materiales y métodos. Las colonias que crecieron en las placas de agarosa-ampicilina posterior a la ligación del fragmento, fueron crecidas y el DNA plasmídico extraído y procesado mediante digestiones enzimáticas para comprobar la eficiencia de la clonación.

El vector HA5'-*ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}*-HA3' se digirió con la enzima Sall para linealizarlo y comparar tamaño con el vector previo. En la **Figura 17** se puede observar que el vector con este último inserto tiene un peso de 6670 pb aproximadamente y el vector previo 5392 pb aproximadamente, sugiriendo la presencia del fragmento *eGFP-Kras^{G12D}* dentro de este nuevo vector, que se nombró EMSC_*Kras^{G12D}*.

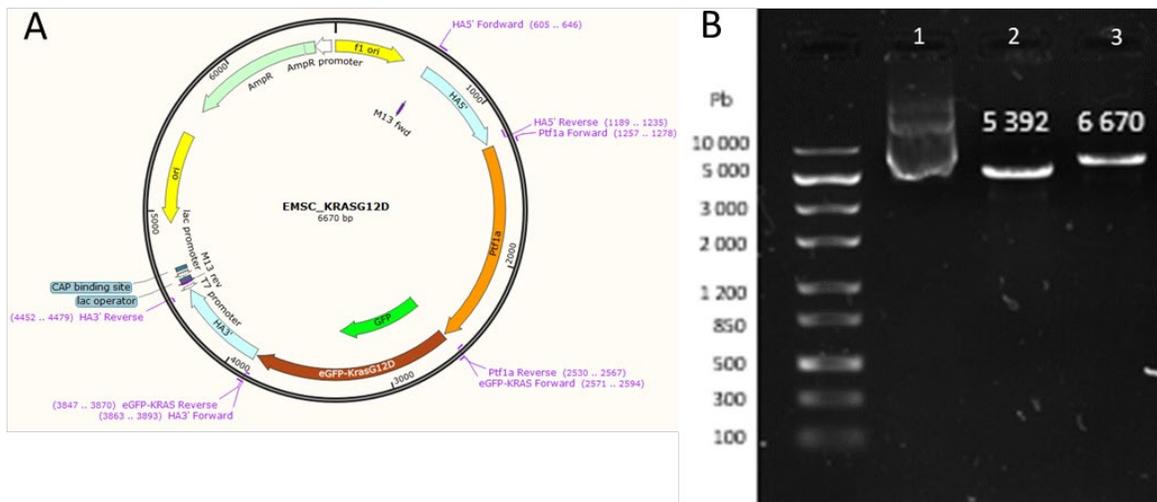


Figura 17. Vector donador (HA5'-*ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}*-HA3'). **A.** Mapa del vector EMSC_*Kras^{G12D}*. **B.** Carril 1: Vector cerrado; Carril 2: Vector anterior (sin *eGFP-Kras^{G12D}*) linealizado con Sall; Carril 3: Vector donador linealizado con Sall. Gel de agarosa al 0.8%

Con la finalidad de obtener más información acerca de la identidad de los fragmentos clonados en el vector EMSC_*Kras^{G12D}*, se realizaron digestiones enzimáticas independientes para observar el patrón de bandas. Se emplearon las enzimas HindIII, NdeI y PvuII ya que estas contenían sitios dentro de los últimos dos insertos clonados. En la **Figura 18** se muestra el patrón de bandas obtenido. Empleando la enzima HindIII se generaron dos bandas, una con un tamaño de 5502 pb y la segunda con 1168 pb. En la digestión con PvuII no se observan las cuatro bandas puesto que dos de ellas tienen tamaños similares (2728 y 2513 pb), sin

embargo, las otras dos bandas sí se observan, una de 996 pb y la última de 433 pb. Empleando la enzima NdeI el patrón de bandas generado constó de dos, una de 5501 pb y la segunda de 1169 pb.

Estas digestiones se analizaron mediante electroforesis. Las mismas digestiones se realizaron en el vector previo (HA5'-*ptf1a*-HA3') para comparar los mapas de restricción con el vector final (EMSC_*Kras*^{G12D}). Las bandas coincidieron con las esperadas, sugiriendo que el vector EMSC_*Kras*^{G12D} efectivamente contiene a la fusión traduccional de eGFP-*Kras*^{G12D} bajo el promotor mínimo de páncreas, flanqueados por los brazos de homología HA5' y HA3'.

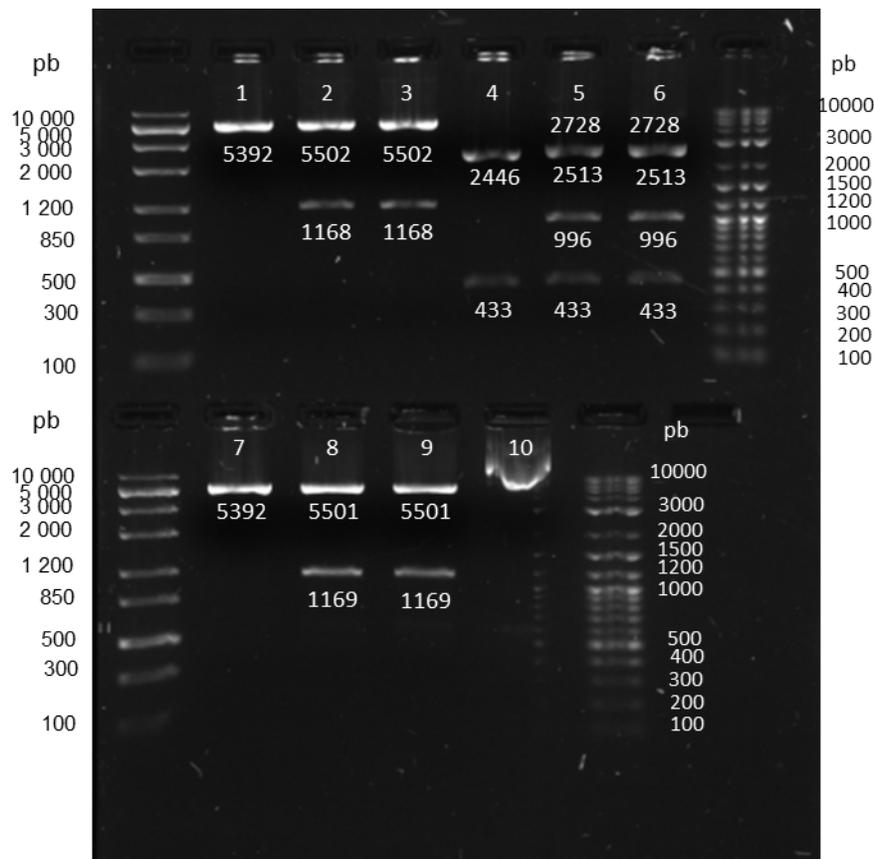


Figura 18. Mapa de restricción del vector final EMSC_*Kras*^{G12D}. Carril 1: Vector HA5'-*ptf1a*-HA3' digerido con HindIII; Carril 2 y 3: Vector EMSC_*Kras*^{G12D} digerido con HindIII; Carril 4: Vector HA5'-*ptf1a*-HA3' digerido con PvuII; Carril 5 y 6: Vector EMSC_*Kras*^{G12D} digerido con PvuII; Carril 7: Vector HA5'-*ptf1a*-HA3' digerido con NdeI; Carril 8 y 9: Vector EMSC_*Kras*^{G12D} digerido con NdeI; Carril 10: Vector EMSC_*Kras*^{G12D} sin digerir.

X. DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas se ha vuelto un desafío primordial en el área de la salud humana, dada la alta mortalidad de este tipo de cáncer. El diseño de modelos experimentales complejos, que permiten el estudio integral de la enfermedad y desde estadios más tempranos, es una estrategia novedosa y muy útil en la actualidad. Los esfuerzos en este trabajo apuntan a la generación de un modelo de cáncer de páncreas que sea representativo de la mayoría de los casos clínicos, en cuanto a la causa genética (presencia de la mutación G12D en el oncogén *Kras*) y a las células afectadas (células acinares pancreáticas). La elección del sistema de edición de genoma CRISPR/Cas9 como vehículo para la inserción del oncogén en el genoma del pez cebra, se basó en la principal característica de este sistema, su especificidad, disminuyendo al mínimo las posibilidades de efectos secundarios inherentes a la técnica o al sitio de inserción del transgén.

La región seleccionada para la integración del casete está posicionada en el cromosoma 18, exactamente 67,417 pb río arriba del gen *cngb1a*, entre las secuencias codificantes de los genes *large2* y *cngb1a*. Suster y colaboradores (2009) integraron un casete en esta misma región sin reportar alguna anomalía en el desarrollo del pez cebra. Así mismo, se analizó esta región del genoma de *D. rerio* en zfin concluyendo que está desprovista de secuencias codificantes, no codificantes y no contiene elementos de secuencias regulatorias conocidas. Se espera que la inserción de la construcción de menos de 4 kb en ese sitio, genere efectos fenotípicos derivados exclusivamente de la expresión del oncogén *Kras*^{G12D} en el páncreas de los peces, y no derivada de la interrupción de la secuencia genómica del cromosoma 18 de los peces.

Los últimos avances en las tecnologías de edición de genomas usando el sistema CRISPR/Cas9 han permitido que el proceso se vuelva más simple, para ello, se diseña una

guía (sgRNA) que llevará a la nucleasa Cas9 al sitio blanco en el DNA del organismo para crear una ruptura de doble hélice (DSB). Los llamados *knock outs* en los cuales se interrumpe la secuencia de un gen por inserciones o deleciones (indels) son llevados a cabo por la vía de reparación no homóloga (NHEJ) propia del organismo. Para generar un *knock in*, el cual consiste en la integración de DNA exógeno o el reemplazo de segmentos genómicos llevado a cabo por la vía de reparación homóloga (HDR); para este proceso se requiere además de lo ya mencionado, un vector donador el cual consiste en el casete que se quiere integrar al genoma y brazos de homología conteniendo la secuencia que flanquea a la DSB para que esta vía de reparación actúe (Miura *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que hay una relación entre la longitud de los brazos de homología con la eficiencia del *knock in*; en el 2014, Li y colaboradores demostraron que aumentando la longitud de los brazos de homología obtenían un mayor número de integración del casete en células que con brazos de homología pequeños.

Li y colaboradores reportaron, en el 2017, que para un desempeño óptimo, el tamaño de los brazos de homología debe ser de 350-700 nt, sin embargo, también se debe considerar que al utilizar brazos de homología más largos, el tamaño de la construcción aumentará, por lo tanto, al medir las cantidades a insertar dentro de las células (μg), brazos de homología más largos corresponderán a un menor número de copias del vector, teniendo posiblemente un efecto en la vía de reparación homóloga.

Además de los brazos de homología de aproximadamente 600 nt que el vector de este trabajo posee, también se ha etiquetado el gen *Kras* con la proteína verde fluorescente (eGFP). Diversos autores mencionan que éste es uno de los mejores métodos para poder

estudiar la dinámica y función de las proteínas dentro de la célula (Beites *et al.*, 2001; Mahen *et al.*, 2014).

La eGFP es una variante de la GFP, la cual es una versión mejorada de la proteína nativa, ésta solo tiene un pico de excitación a los 489 nm y un pico de emisión a los 509 nm, muestra una disminución paulatina del fotoblanqueamiento en contraste con la GFP nativa que muestra un incremento inicial y luego un rápido descenso en la fluorescencia (Patterson *et al.*, 1997).

KRAS junto con otras isoformas de la familia RAS es uno de los oncogenes con mayor prevalencia en los tipos de cáncer humanos, siendo las mutaciones en los codones 12 y 13 las más comunes (Liu *et al.*, 2019). Dentro del cáncer de páncreas las sustituciones más comunes se dan en el codón número 12, esto está asociado a una menor supervivencia del paciente (Sinn *et al.*, 2014).

Dentro de las mutaciones en el codón número 12, KRAS^{G12D} es la forma más común encontrada en la mayoría de los tumores pancreáticos (Magliano y Logsdon, 2013; Sinn *et al.*, 2014). Esta mutación mantiene a la proteína KRAS en un estado activo constitutivamente ya que se evita la unión con la proteína GAP propiciando la proliferación desmedida de las células, entre otras cosas (Ryan *et al.*, 2014; Zeitouni *et al.*, 2016).

La función de KRAS como proteína requiere de la asociación con la membrana plasmática, este anclaje es promovido por la farnesilación y se da en el extremo C terminal de KRAS (Cox y Der, 1992) es por esto, que la proteína eGFP se fusionó al extremo N terminal. Se analizaron diferentes experimentos donde se creó la proteína KRAS fusionada a GFP en el extremo N terminal y no se reportaron cambios en su actividad tumoral, lo que

sugiere que la unión de GFP a KRAS en el extremo N terminal no interfiere con su función (Niv *et al.*, 1999; Davison *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2008).

Existen diferentes factores de transcripción que regulan el desarrollo del páncreas, éstos se expresan en tipos celulares específicos y en una secuencia característica, que ayuda a la diferenciación de células exocrinas y endocrinas. Entre estos factores de transcripción podemos reconocer a PTF1a el cual se expresa en el endodermo de los peces cebra a las 32 hpf y marca a las células precursoras exocrinas (Lin *et al.*, 2004).

PTF1a es una subunidad dentro del complejo PTF1 que es un factor de transcripción que controla la transcripción específica de genes en el páncreas, en su mayoría genes que codifican para enzimas del tracto digestivo (Krapp *et al.*, 1996). Ptf1a o p48 juega un papel en el desarrollo y diferenciación temprana y tardía del páncreas. Pascual *et al.* (2007) mencionan que su actividad no solo se restringe al páncreas, ya que también es necesario para el desarrollo del cerebelo, *ptf1a* se expresa en la zona ventricular, una zona germinativa que genera progenitores de las células inhibitorias de Purkinje e interneuronas.

La pérdida de *Ptf1a* en mamíferos lleva a una pérdida de la yema ventral y un arresto temprano en el desarrollo de la yema dorsal (Krapp *et al.*, 1996). Estudios realizados en ratones muestran la importancia de este gen durante la neurogénesis, animales con el genotipo *Ptf1a*^{-/-} mostraron una reducción en el primordio cerebeloso en una etapa E16.5 llevando a una agenesia cerebelosa al nacer. Este genotipo es letal puesto que los ratones solo sobreviven de dos a tres horas después de su nacimiento (Krapp *et al.*, 1998; Sellick *et al.*, 2004). En *Danio rerio*, la pérdida de *Ptf1a* resulta en la ausencia de la yema ventral pero la yema dorsal no se afecta, ya que tiene un desarrollo independiente a *Ptf1a* (Lin *et al.*, 2004).

En este pez, el desarrollo del páncreas difiere del desarrollo en los mamíferos, ya que en éstos, las células progenitoras exocrinas y endocrinas provienen de una misma yema ubicadas de manera ventral y dorsal del duodeno (Slack, 1995); sin embargo, para *D. rerio* los precursores exocrinos positivos a *Ptf1a* y los elementos endocrinos positivos a la insulina divergen antes del inicio de la formación del tubo intestinal (Wallace y Pack, 2003). Sabiendo la importancia del gen *Ptf1a* se decidió utilizar su promotor para inducir la expresión del oncogén *Kras*^{G12D}, sin embargo, la expresión estará limitada a células exocrinas del páncreas. Los estudios de expresión del promotor *ptf1a* indican regiones necesarias para la expresión de *ptf1a* en tejidos como retina, cerebro posterior, médula espinal y cerebelo. La expresión de *ptf1a* en páncreas está dirigida por una región intensificadora ubicada lejanamente, río abajo de la secuencia codificante y un elemento autorregulatorio río arriba de este gen. Los elementos autorregulatorios del promotor *ptf1a* son estrictamente necesarios para la expansión ventral del páncreas (Pashos *et al.*, 2013).

Para fines de este trabajo se decidió seleccionar solo la región autorregulatoria del promotor *ptf1a* por cuestiones metodológicas. Evaluamos la dificultad de clonar regiones muy grandes en vectores plasmídicos así como la dificultad que implica insertar construcciones muy grandes mediante transgénesis debido a la premisa de que a mayor tamaño a insertar, mayor es el tamaño requerido de los brazos de homología. De igual manera se consideró el mantenimiento de la topología del DNA. Las propiedades topológicas influyen sus interacciones mecánicas y bioquímicas (Neuman, 2010), así que al modificar las distancias entre las regiones involucradas en la regulación en cis, podría verse afectada la función del promotor en sí y del intensificador.

Se espera que el uso de un promotor mínimo, que mostró el suficiente poder para dirigir la expresión sostenida de la proteína verde fluorescente en el páncreas de peces cebras durante todo su desarrollo (Pashos *et al.*, 2013), sea ideal para dirigir la expresión basal del oncogén seleccionado, e inducir transformación maligna en las células pancreáticas de los peces.

En 2014, Schiavone y colaboradores utilizaron el promotor de *ptf1a* completo clonado en un BAC (cromosoma artificial de bacteria), para la inducción de la expresión de *Kras*^{G12D} en páncreas de peces cebras. Los resultados mostraron la expresión del oncogén en el cerebelo de los peces y lo hizo inclusive con mayor fuerza que en el propio páncreas. Aproximadamente el 92% de los peces inyectados con tg(*ptf1a:Gal4*)/UAS:eGFP-KRAS^{G12D} mostraron enfermedad severa y mortalidad entre la segunda semana post fertilización y la semana 32, el primer pico de muerte fue entre la primera y la segunda semana post fertilización. Los autores aluden que la fuerte disminución de la supervivencia estuvo ligada a displasia cerebelar o meduloblastoma exacerbado, desviando de este modo, el objetivo de estudio. El modelo de Schiavone, resultó ineficiente para estudiar de manera integral el cáncer de páncreas a través de un modelo animal.

La metodología CRISPR/Cas9 en peces cebras puede ejecutarse mediante la administración de Cas9 como DNA (microinyectando el vector plasmídico linealizado) para su procesamiento a proteína dentro de las células; como mRNA (una vez llevada a cabo la transcripción *in vitro*) o como proteína. Al insertarlo como vector éste tiene que contener un promotor compatible con el organismo al que se ha insertado (promotor CMV por ejemplo), y llevar a cabo la introducción del material genético en el estadio de una célula donde existe comunicación entre las blastómeras, y la membrana nuclear es permeable debido al estadio

de continua división mitótica. Insertar Cas9 como proteína es la opción más difícil de las tres debido a su tamaño y carga, su expresión dentro de la célula es transitoria y podría activar respuestas inmunes o causar toxicidad. Se debe hacer mención también que purificar la proteína puede ser más difícil que obtener el plásmido o mRNA, también se considera un mecanismo más caro (Glass *et al.*, 2018).

La primera opción que abordaremos en este trabajo será administrar la endonucleasa Cas9 como mRNA, el cual puede ser traducido a proteína por los ribosomas en el citoplasma celular, lo que evita los pasos de transporte núcleo-citoplasma y su expresión será más rápida que administrarlo como DNA. La microinyección del mRNA Cas9, permitirá la expresión de la proteína de manera más estable que mediante la administración de la proteína, sin embargo, evitará que la expresión sea demasiado alta para limitar de esta manera los posibles cortes fuera del blanco (efecto *off target*). El mRNA es menos estable que el DNA por lo que lo protegeremos de la degradación mediante la incorporación de la caperuza 5' (Glass *et al.*, 2018).

Este trabajo contempla las ventajas de dos modalidades de Cas9. En primer lugar, y con el objetivo de tener información rápida a cerca del funcionamiento del modelo, se empleará el vector nls-zcas9-nls. Este RNA se traducirá en proteína y actuará en todas las células de los peces desde el inicio de su desarrollo, propiciando los cortes en el sitio blanco y la concomitante inserción del casete *ptf1a-eGFP-Kras^{G12D}* en todas las células (Li-En *et al.*, 2013). Con el objetivo de generar líneas estables para los futuros estudios, se utilizará el vector pCS2-nCas9n-nanos3'UTR, 3'UTR nanos es el UTR de un mRNA de origen materno que se acumula en la línea germinal de los peces (Vejnar *et al.*, 2016). Esto reducirá la letalidad

en los peces, permitiendo que las ediciones genómicas se hereden con más facilidad a la F1 (Moreno-Mateos *et al.*, 2016).

Se abordaron diferentes estrategias metodológicas para la generación del vector donador de acuerdo a las características de los insertos y del vector elegido. La clonación TA se valió de los residuos de adenina que deja la polimerasa en el extremo 3' del fragmento amplificado, estos residuos se pueden ligar directamente con vectores comerciales lineales que tienen colas de timina como es el caso del vector pTZ57R/T. Esta fue la estrategia implementada para clonar el promotor mínimo de *ptf1a* luego de haber obtenido su secuencia mediante PCR (Bertero *et al.*, 2017).

La incorporación de los brazos de homología HA5' y HA3' se llevó a cabo usando la metodología de clonación *In-fusion* basada en la ligación mediante extremos de homología de 20 nt en el vector. Se ha reportado que esta metodología es muy eficiente para el clonado de más de un fragmento a la vez en un vector. La amplificación de HA5' y HA3' a partir de DNA genómico se valió de oligonucleótidos de 20 pb para la inserción por homología en sitios 5' y 3' del vector (Bertero *et al.*, 2017, Takara Bio, 2016). Inesperadamente, solamente el brazo HA5' se incorporó al vector exitosamente, por lo que HA3' fue introducido mediante clonación por enzimas de restricción, al igual que el fragmento *eGFP-Kras^{G12D}*. Para la clonación con enzimas de restricción, se diseñaron oligonucleótidos con sitios para la digestión con enzimas de restricción para la amplificación de los últimos dos fragmentos (Bertero *et al.*, 2017).

Para la amplificación de cada uno de los insertos se utilizó la enzima polimerasa CloneAmp HiFi, que es altamente procesiva y tiene actividad de control de lectura, además

está formulada con un anticuerpo de inicio rápido para prevenir la amplificación de regiones inespecíficas (Takara Bio, 2016).

XI. CONCLUSIONES

- La utilización de un gradiente decreciente de temperatura resultó adecuado para la exitosa hibridación y clonación de las guías de RNA en el vector DR274 sin complicaciones.
- La extracción de DNA genómico de embriones de 48 hpf de peces cebra, utilizando el kit de QIAGEN para DNA de tejidos y realizando modificaciones, permitió la obtención de DNA genómico de alta calidad para su utilización como molde en reacciones de PCR.
- Las herramientas bioinformáticas utilizadas para el diseño de los diferentes pares de oligonucleótidos fueron adecuadas y dieron como resultado la amplificación de las secuencias esperadas mediante las reacciones de PCR.
- La combinación de las tres estrategias de clonación permitió la optimización del aprovechamiento de los sitios disponibles para clonado en el vector pTZ57R/T.
- La elección del vector pTZ57R/T como *backbone* para la construcción del vector donador resultó adecuada ya que facilitó la clonación del promotor *ptf1a* mediante clonación TA y nos permitió generar un vector de clonación de tamaño final relativamente pequeño.

XII. PERSPECTIVAS A CORTO PLAZO

- Obtener el mRNA de la guía 1, y el mRNA de nls-zcas9-nls mediante transcripción *in vitro* utilizando el kit RIBOPROBE de Promega.
- Microinyectar embriones de una célula con la mezcla de CRISPR/Cas9 que contendrá los transcritos de mRNA de la guía 1, nls-zcas9-nls y el vector EMSC_*Kras*^{G12D} linealizado.
- Analizar los embriones microinyectados a los 5 dpf, para evaluar la integración del DNA donador en el genoma. Se evaluarán mediante PCR utilizando como DNA molde una sección de la cola de los embriones. Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de una región de 700 pb del cromosoma 18 del pez cebra, se espera ver la interrupción de esta secuencia por la inserción de la construcción eGFP-*Kras*^{G12D}.

XIII. PERSPECTIVAS A MEDIANO PLAZO

- Microinyectar embriones de una célula con la mezcla de CRISPR/Cas9 que contendrá los transcritos de mRNA de la guía 1, de 3'UTR-nanos-cas9 y el vector EMSC_*Kras*^{G12D} linealizado.
- Criar a la F0 hasta la edad juvenil y realizar cruzas naturales. Obtener los embriones F1.
- Analizar los embriones F1 mediante PCR de una fracción de la cola de los embriones a los 5 dpf, para evaluar la integración del DNA donador en el genoma.
- Una vez obtenida la línea F1 de los peces transgénicos elegidos, se evaluarán las vías moleculares involucradas en el desarrollo de las alteraciones malignas de las células acinares, posibles marcadores tempranos de cáncer de páncreas, la heterogeneidad celular de los tumores, se diseñará un estudio del linaje celular de las células que dan origen al

adenocarcinoma ductal pancreático, así como analizar el aporte del microambiente del tumor en fenotipos como la migración celular y metástasis. Por último, abordaremos un estudio de los posibles blancos terapéuticos para el tratamiento oportuno de esta enfermedad.

XIV. REFERENCIAS

- Andersen, M. y Winter, L. 2017. Animal models in biological and biomedical research experimental and ethical concerns. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 91(1): 1-14.
- Beckwith, L., Moore, J., Tsao-Wu, G., Harshbarger, J., Cheng, K. 2000. Ethylnitrosourea induces neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Laboratory Investigation*. 80: 379-385.
- Beites, C., Peng, X., Trimble, W. 2001. Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in Exocytosis. *Methods in Enzymology*. 329: 499-510.
- Bertero, A., Brown, S., Vallier, L. 2017. Methods of cloning. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 19-39.
- Bhaya, D., Davison, M. y Barrangou, R. 2011. CRISPR-Cas systems in bacterial and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Reviews of Genetics*. 45: 273-97.
- Biankin, A., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M. C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A. M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., Wani, S., ... Grimmond, S. M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. 491(7424): 399–405.
- Brune, K., Abe, T., Canto, M., O'Malley, L., Klein, A.P., Maitra, A., Volkan, A., Fishman, E.K., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Goggins, M., Hubran, R.H. 2006. Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*. 30(9): 1067-76.
- Chand, S., O'Hayer, K., Blanco, F., Winter, J., Brody, J. 2016. The landscape of pancreatic cancer therapeutics resistance mechanisms. *International Journal of Biological Sciences*. 12: 273-283.
- Chen, S., Li, C., Yuan, G., Xie, F. 2007. Anatomical and histological observation of the pancreas in adult zebrafish. *Pancreas*. 34(1): 120-125.
- Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, PD., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, LA., Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339(6121): 819-23.
- Cox, A., Der, C. 1992. Protein prenylation: more than just glue? *Current Opinion in Cell Biology*. 4:1008-1016.
- Davison, J., Woo, S., Rhee, J., Leach, S. 2008. Characterization of KRAS-mediated pancreatic tumorigenesis in zebrafish. *Methods in Enzymology*. 438: 391-417
- Doudna, J. y Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 346(6213): 1258096-9.
- Eser, S., Schnieke, A., Scheider, G. y Saur, D. 2014. Oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*. 111(5): 817-822.
- Ezzati, M., Henley, S., Lopez, A., Thun, M. 2005. The role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *International Journal of Cancer*. 116: 936-971.
- Feldmann, G., R. Beaty, R.H. Hruban, A. Maitra. 2007. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal Hepatobiliary Pancreatic Surgery*. 14: 224-232.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, DM., Forman, D., Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 136: E359-E386.

- Fidler, I. y Hart, I. 1982. Biological Diversity in Metastatic Neoplasms: Origins and Implications. *Science*. 217(10): 998-1003.
- Glass, Z., Lee, M., Li, Y., Xu, Q. 2018. Engineering the delivery system for CRISPR based genome editing. *Trends in Biotechnology*. 36(2): 173-185.
- GLOBOCAN. 2019. México Fact sheets. Consultado el 26 de junio de 2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674.
- Hidalgo, M., Cascinus, S., Kleeff, J., Labianca, R., Löhner, J., Neoptolemos, J., Real, F., Van Laethem, J., Heinemann, V. 2013. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology*. 15: 8-18.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M., Tuveson, D. 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 4(6): 437-450.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Stemple, D.L. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446): 498-503.
- Hruban, R., Wilentz, R., Kern, S. 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts. *American Journal of Pathology*. 156(6): 1821-1825.
- Hruban, R., Takaori, K., Klimstra, D., Adsay, V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A., Biankin, S., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Klöppel, G., Longnecker, D., Lüttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G., Shimizu, M., Yonezawa, S. 2004. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology*. 28(8): 977-987.
- Huang, L., Jansen, L., Balavarca, Y., Babaei, M., Van der Geest, L., Lemmens, V., Van, L., De Schutter, H., Johannesen, T., Primic-Zakelj, M., Zadnik, V., Besselink, M., Schrotz-King, P., Brenner, H. 2018. Stratified survival of resected and overall pancreatic cancer patients in Europe and the USA in the early twenty-first century: a large, international population-based study. *BMC Medicine*. 16(125).
- Hwang, W., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M., Tsai, S., Sander, J., Peterson, R., Yeh, J., Joung, J. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 31(3):227-229.
- INEGI. 2018. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Consultado el 26 de junio de 2019. <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. y Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 169: 5429-5433.
- Jaffee, E., Hruban, R., Canto, M., Kern, S. 2002. Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell*. 2: 25-28.
- Jancik, S., Drábek, J., Radzioch, D., Hajdúch, M. 2010. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-13.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. y Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 816-21.
- Jonkers, J. y Berns, A. (2002). Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2(4): 251-265.
- Kemp, C. 2015. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harbor Protocol*. 10: 865-874.
- Kern, S., Hruban, R., Hollingsworth, M.A., Brand, R., Adrian, T.E., Jaffee, E., Tempero, M. A. 2001. A white paper: The product of a pancreas cancer think tank. *Cancer Research*. 61(12): 4923-32.
- Khosravi, P., Díaz, V. 2005. Adenocarcinoma de páncreas: actualizaciones terapéuticas. *Anales de medicina interna*. 22(8): 390-394.
- Klapman, J., Malafa, M. 2008. Early detection of pancreatic cancer: why, who, and how to screen. *Cancer Control*. 15(4): 280-287.
- Krapp, A., Knofler, M., Frutiger, S., Hughes, G., Hagenbuchle, O., Wellauer, P. 1996. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO Journal*. 15: 4317-4329.
- Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbüchle, O., Wellauer, P. 1998. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes and Development*. 12(23): 3752-63.
- Lamprecht, U., Horvat, S., Cemazar, M. 2018. Transgenic mouse models in cancer research. *Frontiers in Oncology*. 8(268): 1-18.
- Langenau, D. 2016. Cancer and zebrafish. Mechanisms, techniques, and models. Suiza: Springer.
- Li, D., Xie, K, Wolff, R y Abbruzzese, J. 2004. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 363(9414): 15841-8.
- Li-En, J., Wentz, S. y Chen, W. 2013. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(34): 13904-13909.
- Li, H., Beckman, K., Pessino, V., Huang, B., Weissman, J., Leonetti, M. 2017. Design and specificity of long ssDNA donors for CRISPR-based knock-in. *BioRxiv*.
- Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P., Pu, W. 2014. Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLOS ONE*. 9(8): 1-10.
- Lin, J., Biankin, A., Horb, M., Ghosh, B., Prasad, N., Yee, N., Pack, M., Leach, S. 2004. Differential requirement for ptf1a in endocrine and exocrine lineages of developing zebrafish pancreas. *Developmental Biology*. 274: 491-503.
- Liu, P., Wang, Y., Li, X. 2019. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 9(5): 871-879.
- Lombardo, A., Cesana, D., Genovese, P., Di Stefano, B., Provasi, E., Colombo, DF., Neri, M., Magnani, Z., Cantore, A., Lo Riso, P., Damo, M., Pello, OM., Holmes, MC., Gregory, PD., Gritti, A., Broccoli, V., Bonini, C., Naldini, L. 2011. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nature Methods*. 8(10): 861-9.
- Lozada, J., Palmeros, B., Ramírez, M., Fernández, M. 2012. El pez cebrá: una especie modelo. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 25(1).

- Lucas, A., Malvezzi, M., Carioli, G., Negri, E., La Vecchia, G., Boffetta, P., Bosetti, C. 2016. Global trends in pancreatic cancer mortality from 1980 through 2013 and predictions for 2017. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 14(10): 1452-1462.
- Machicado, J.D., Rebours, V., Yadav, D. 2016. Epidemiology of chronic pancreatitis. *Pancreapedia*. 1-15.
- Magliano, M. y Logsdon, C. 2013. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*. 144(6): 1220-1229.
- Mahen, R., Koch, B., Wachsmuth, M., Politi, A., Perez-Gonzalez, A., Mergenthaler, J., Cai, Y., Ellenberg, J. 2014. Comparative assessment of fluorescent transgene methods for quantitative imaging in human cells. *Molecular Biology of the Cell*. 25(22): 3610-3618.
- Makarova, K. y Koonin, E. 2015. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods of Molecular Biology*. 1311:47-75.
- Masui, T., Long, Q., Beres, T., Magnuson, M., MacDonald, R. 2007. Early pancreatic development requires the vertebrate suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes & Development*. 21(20): 2629-2643.
- Memba, R., Duggan, S.N., Ni Chonchubhair, H.M., Griffin, O.M., Bashir, Y., O'Connor, D.B., Murphy, A., McMahon J., Volcov, Y., Ryan, B.M., y Conlon, K.C. 2017. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology*. 17: 867-874.
- Midha, S., Chawla, S., Garg, P. 2016. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*. 381: 269-277.
- Miura, H., Quadros, R.M., Gurumurthy, C.B., Ohtsuka, M. 2018. Easy-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. *Nature Protocols*. 13: 195-215.
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., Juez, G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 36: 244-246.
- Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J.P., Mis, E. K., Khokha, M.K., Giraldez, A.J. 2016. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9 targeting *in vivo*. *Nature Methods*. 12(10): 982-8.
- Moskaluk, C., Hruban, R., Kern, S. 1997. P16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research*. 57(11): 2140-3.
- Nandan, M. y Yang, V. 2011. An update on the Biology of RAS/RAF mutations in Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. 7(2): 113-120.
- Neuman, K. 2010. Single molecule measurements of DNA topology and topoisomerases. *Journal of Biological Chemistry*. 285(25): 18967-18971.
- Niv, H., Gutman, O., Henis, Y., Kloog, Y. 1999. Membrane interactions of a constitutively active GFP-Ki-Ras 4B and their role in signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 1606-1613.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001.
- Offield, M., Jetton, J., Labosky, P., Ray, M., Stein, R., Magnuson, M., Hogan, B., Wright, C. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 122: 983-995.
- OMS. 2019. Cáncer. Consultado el 26 de junio de 2019. <https://www.who.int/topics/cancer/es/>

- Park, J. T. y Leach, S. 2018. Zebrafish models of *KRAS*-initiated pancreatic cancer. *Animal Cells and Systems*. 22(6): 353-359.
- Park, S. W., Davison, J. M., Rhee, J., Hruban, R. H., Maitra, A., Leach, S.D. 2008. Oncogenic *KRAS* induces progenitor cell expansion and malignant transformation in zebrafish exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 134(7): 2080-2090.
- Parkin, D., Boyd, L., Walker, L. 2011. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *British Journal of Cancer*. 105(2): 77-81.
- Pasca, M., Logsdon, C. 2013. Roles of *KRAS* in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*. 144(6): 1220-1229.
- Pascual, M., Abasolo, I., Mingorance, A., Martinez, A., Del Río, J., Christopher, V., Real, X., Soriano, E. 2007. Cerebellar GABAergic progenitors adopt an external granule cell-like phenotype in the absence of Ptf1a transcription factor expression. *PNAS*. 104 (12): 5193-5198.
- Pashos, E., Tae, J., Leach, S., Fisher, S. 2013. Distinct enhancers of ptf1a mediate specifications and expansion of ventral pancreas in zebrafish. *Developmental Biology*. 381: 471-481.
- Patterson, G., Knobel, S., Sharif, W., Kain, S., Piston, D. 1997. Use of green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Journal of Biophysics*. 73(5): 2782-2790.
- Pierce, B. 2014. Genética. Un enfoque conceptual. Editorial Médica Panamericana. USA. 6-5pp.
- Röder, P., Wu, B., Lui, Y., Han, W. 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*. 48: 1-19.
- Ryan, D., Hong, T., Bardeesy, N. 2014. Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*. 371: 2140-2141.
- Schiavone, M., Rampazzo, E., Casari, A., Battilana, G., Persano, L., Moro, E., Liu, S., Leach, S. D., Tiso, N., Argenton, F. 2014. Zebrafish reporter lines reveal *in vivo* signaling pathway activities involved in pancreatic cancer. *Disease Models & Mechanisms*. 7: 883-894.
- Schildkraut, I. 2001. Genetic Engineering. En S. Brenner y J. H. Miller. (Ed.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 834). San Diego: Academic Press.
- Sellick, G., Barker, K., Stolte-Dijkstra, I., Fleischmann, C., Coleman, R., Garrett, C., Gloyn, A., Edghill, E., Hattersley, A., Wellauer, P., Goodwin, G., Houlston, R. 2004. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nature genetics*. 36(12): 1301-1305.
- Serrano, M., Lin, A., McCurrach, M., Beach, D., Lowe, S. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4. *Cell*. (88): 593-602.
- Sinn, B., Strieler, J., Rudl, M., Lehmann, A., Bahra, M., Denkert, C., Sinn, M., Stieler, J., Klauschen, F., Budezies, J., Weichert, W., Stenzinger, A., Kamphues, C., Dietel, M., Riess, H. 2014. *KRAS* mutations in codon 12 or 13 are associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 43(4): 578-583.
- Slack, J. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 121: 1569-1580.
- Stevens, R.J., Roddam, A.W., Beral, V. 2007. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 96: 507-509.
- Stoletov, K. y Klemke, R. 2008. Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogen*. 27(33): 4509-4520.
- Suster, M., Sumiyama, K., Kawakami, K. (2009). Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics*. 10: 477.
- Takara Bio. 2016. In-Fusion HD Cloning Kit User Manual. USA.

- Thermo Fisher Scientific. 2012. General Recommendations for DNA electrophoresis. Protocol. Consultado el 4 de febrero de 2021. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012614_Gen_Recommend_DNA_Electrophoresis_UG.pdf.
- Thurtle-Schmidt, D. y Te-Wen, L. 2018. Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 46(2): 195-205.
- Varshney, G. y Burgess, S. 2014. Mutagenesis and phenotyping resources in zebrafish for studying development and human disease. *Briefings in Functional Genomics*. 13(2): 82-94.
- Vejnar, C.E., Moreno-Mateos, M.A., Cifuentes, D., Bazzini, A. A., Giraldez, A. J. 2016. Optimized CRISPR-Cas9 system for genome editing in zebrafish. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016(10): 856-870.
- Wallace, K., Pack, M. 2003. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Development*. 255: 12-29.
- Wang, Y.T., Gou, Y.W., Jin, W.W., Xiao, M., Fang, H.Y. 2016. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC cancer*. 16: 212.
- Wennerberg, K., Rossman, K., Der, C. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*. 118: 843-846.
- Westerfield, M. 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. University of Oregon Press, Eugene.
- Woo, S., Davison, J., Rhee, J., Hruban, R., Maitra, A., Leach, S. 2008. Oncogenic KRAS induces progenitor cell expansion and malignant transformation in zebrafish exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 134(7): 2080-2090.
- Yee, N., Kazi, A., Yee, R. 2013. Translating discovery in zebrafish pancreatic development human pancreatic cancer: biomarkers, targets, pathogenesis, and therapeutics. *Zebrafish*. 10(2): 132-146.
- Yee, N., Yusuff, S. y Pack, M. 2001. Zebrafish morphant displays defects in pancreas development and digestive organ chirality, and potentially identifies a multipotent pancreas progenitor cell. *Genesis*. 30(3): 137-140.
- Zeitouni, D., Pylayeva-Gupta, Y., Der, C., Bryant, C. 2016. KRAS mutant pancreatic cancer: no lone path to an effective treatment. *Cancers*. 8(4): 45.
- Zenonos, K., Kyprianou, K. 2013. RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World Gastrointestinal Oology*. 5(5): 97-101.