



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Papel de la Angiotensina II en la proliferación y
expresión de citocinas en la línea celular tumoral
pancreática Capan-1”**

Tesis que presenta

IVÁN PÉREZ DÍAZ

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Guillermo Robles Díaz

México, D.F.

2011



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.

El presente proyecto se realizó en la Unidad de Hígado Páncreas y Motilidad de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, en los departamentos de Gastroenterología, Patología y Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Guillermo Robles Díaz.

PATROCINIO

Mis estudios de doctorado fueron apoyados por una beca otorgada por el CONACyT (No. de registro: 169735).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente al Dr. Guillermo Robles Díaz por apoyarme constantemente y todo su cariño.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y al David Kershenobich Stalnikowitz, así como también a los miembros del jurado para la obtención de grado.

A la Dra. Gabriela Gutiérrez y a la M.C. María Teresa Ramírez por su afecto y su gran ayuda en el laboratorio.

A la Dra. Carolina Guzmán por su orientación y apoyo en la realización de esta investigación.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz a Cristino a Milena y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo incondicional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca-crédito (No. de registro:169735) durante la realización de mis estudios de doctorado.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
1. ANTECEDENTES.....	10
1.1 CÁNCER DE PÁNCREAS.....	10
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ALDOSTERONA.....	16
1.3 SISTEMAS LOCALES GENERADORES DE ANG II.....	25
1.4 ANG II y CÁNCER.....	33
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVO, HIPÓTESIS.....	38
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	39
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
2.4 HIPÓTESIS.....	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	40
3.2 MEDIOS Y REACTIVOS.....	42
3.3 LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR.....	41
3.4 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ANG I.....	42
3.5 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ANG II, VEGF.....	43
3.6 ICQ PARA ANG II Y RECEPTORES AT1 Y AT2.....	43
3.7 RT-PCR PARA LOS RECEPTORES AT1 y AT2.....	45
3.8 ESTUDIOS DE UNIÓN AL RECEPTOR.....	47
3.9 CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	48
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49

4. RESULTADOS	50
4.1 DETECCIÓN DE ANG I EN EL CULTIVO DE CÉLULAS CAPAN-1.....	50
4.2 DETECCIÓN DE ANG II EN EL CULTIVO DE CÉLULAS CAPAN-1.....	51
4.3 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES AT1 Y AT2.....	53
4.4 DETECCIÓN Y FUNCIONALIDAD DE SITIOS DE UNIÓN “NO-AT1, NO-AT2”.....	56
4.5 EFECTO DE LA ANG II EXÓGENA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN DE CITOCINAS.....	58
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	60
6. PERSPECTIVAS	53
7. SUPLEMENTOS	64
1 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER DE PÁNCREAS.....	64
2 DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS.....	82
8. ANEXO	85
PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES BASADAS EN ESTE TRABAJO.....	85
9. REFERENCIAS	86

RESUMEN

Desafortunadamente para la gran mayoría de los pacientes que padecen adenocarcinoma ductal de páncreas (CAP), el diagnóstico se establece de forma tardía, cuando el pronóstico es muy pobre y no hay posibilidades terapéuticas. Esto se debe a que las manifestaciones clínicas aparecen tardíamente, son poco específicas y a la falta de precisión en los métodos para identificar esta neoplasia. En la actualidad no existe un estudio serológico o bioquímico que haga o excluya el diagnóstico de CAP en etapa temprana es decir en un período de resecabilidad.

Aunque se han realizado muchos avances a nivel molecular en cuanto al entendimiento de la etiopatogenia de esta enfermedad, los factores determinantes en el desarrollo y progresión de esta neoplasia persisten ampliamente desconocidos y no existen en la actualidad opciones terapéuticas que incrementen la sobrevida de los pacientes.

Clásicamente se ha considerado que el papel principal del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRA) y de su principal efector la Angiotensina II (Ang II) es en el mantenimiento de la tensión arterial y el balance hidro-electrolítico a través de sus dos tipos principales de receptores denominados AT1 y AT2. Además de este SRA circulante, en un número creciente de estudios se sugiere la existencia de Sistemas Locales Generadores de Angiotensina II (SLGA) intrínsecos de varios tejidos, los cuales pueden actuar de forma autocrina,

paracrina e inclusive intracrina cumpliendo funciones tisulares altamente específicas y que puede operar en parte o completamente independiente de su contraparte circulante.

Estudios recientes de expresión y localización de componentes clave del SRA en los tejidos, muestran la existencia de un SRA intrínseco en el páncreas, el cual pudiese ser de importancia en la fisiología de este órgano, regulando funciones propias del tejido como la secreción ductal de aniones así como la secreción de insulina por las células β .¹

Por otra parte a nivel de los tejidos se ha encontrado que la Ang II puede regular la proliferación celular a través de su receptor AT1 mientras que el AT2 tiene efectos contrarios.

El objetivo de este trabajo fue investigar en la línea celular tumoral pancreática Capan-1 (modelo experimental in vitro) la presencia de un SLGA y su papel en la proliferación celular y secreción de VEGF y FGF-b.

ABSTRACT

Unfortunately for the vast majority of patients with pancreatic cancer, the diagnosis is made in a late stage, when the prognosis is poor and there are no therapeutic options. This is because the clinical manifestations appear late and are not specific additionally to the lack of accurate methods for identifying this tumor. Currently no exist a serological or biochemical studies to make or exclude the diagnosis of pancreatic cancer in a early stage (resectable period).

Although there are many advances at the molecular level in understanding the pathogenesis of this disease, development and progression factors remain largely unknown and nowadays there are no treatment options that increase survival of patients.

Classically the renin–angiotensin system (RAS) is considered of a blood-borne cascade, whose final and bioactive product, angiotensin II, plays an important endocrine role in the maintenance of blood pressure and hydro-electrolytic balance via their interactions with specific angiotensin receptors named AT1 and AT2.

In addition to this circulating RAS, there are an increasing number of studies to suggest the existence of a local angiotensin-generating system (LAGS) in several tissues. The LAGS can act locally as a paracrine, autocrine or intracrine factor in

meeting specific needs for individual tissues and it can operate, in whole or in part, independently of the circulating counterpart.

Recent studies on the expression and localization of key RAS components, particularly angiotensinogen and renin, have provided solid evidence for the existence of an intrinsic LAGS in the pancreas.

Recently it's suggested that Ang II may regulate cell proliferation through AT1 receptor while the AT2 acts in opposite way.

The aim of this study was to investigate in pancreatic cancer cell line Capan-1 (in vitro experimental model) the presence of a LAGS and clarify it's role in cell proliferation and cytokine (VEGF, FGF-b) secretion.

1. ANTECEDENTES

1.1 CÁNCER DE PÁNCREAS

Alrededor del mundo, cerca de 200,000 personas mueren anualmente por CAP. En México el CAP es la quinta causa de muerte por cáncer en hombres y la sexta en mujeres (INEGI 2005), en Estados Unidos (EE.UU.) es la cuarta causa de muerte por cáncer en ambos sexos,² en Japón ocupa el quinto lugar, mientras que en Europa se ubica en la sexta posición.

En EE.UU. cada año son diagnosticados aproximadamente 42, 470 pacientes con CAP y se espera que la mayoría de estos pacientes mueran a causa de la enfermedad.³ Es decir la letalidad del CAP es tan alta, que su incidencia (9 casos por cada 100 000 habitantes) se considera representativa de su mortalidad.

Este Cáncer es raro antes de los 40 años, pero la incidencia se incrementa bruscamente después de esta edad, alcanzando el mayor pico de incidencia entre los 45 y 70 años. La incidencia es mayor en hombres con una relación H:M de 2:1 en poblaciones menores de 50 años, igualándose hacia los 70 años. Algunos datos sugieren que la incidencia total del CAP declina con el paso del tiempo.^{4, 5.}

La sobrevida a 5 años es de 4.6%, y en general la mayoría de los pacientes fallecen dentro de los primeros 6 meses a partir del diagnóstico.

Aunque esta neoplasia representa menos de 2% de los nuevos cánceres es responsable del 6% de todas las muertes por cáncer ocupando la cuarta causa de muerte por cáncer.¹⁻³

La resección quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo en el CAP, pero debido a lo tardío de la presentación de la enfermedad solo 15-20% de los pacientes son candidatos a pancreatometomía con fines curativos. Aún en estos pacientes el pronóstico es pobre, con una sobrevivida a 5 años después de una resección con fines curativos de alrededor del 25-30%.⁶ El adenocarcinoma ductal representa el 90% de los tumores pancreáticos.

Etiología y Factores de Riesgo

Los únicos factores de riesgo consistentemente reportados para el CAP son la edad avanzada y el tabaquismo; de hecho se ha considerado que el 25 % de los CAP podrían atribuirse al tabaquismo.^{7, 8, 9} Sin embargo, se considera que existen otros factores de riesgo: demográficos, ambientales y genéticos. Tabla 1.

Tabla 1. Factores de riesgo para CAP	
Factores de riesgo no heredables (modificables)	Factores de riesgo heredables
<p>Tabaquismo</p> <p>Obesidad y actividad física disminuida</p> <p>Diabetes Mellitus</p> <p>Consumo azúcares, edulcorantes, grasa animal, alcohol.</p> <p>Niveles bajos de vitamina D</p> <p>Lesiones quísticas del páncreas, pancreatitis crónica, cirugía del tubo digestivo.</p>	<p>Pancreatitis hereditaria</p> <p>CAP familiar</p> <p>Fibrosis quística</p> <p>Síndromes hereditarios asociados</p> <p> Síndrome de Peutz-Jeghers</p> <p> Síndrome de Lynch</p> <p> Síndrome Mola-Melanoma</p> <p> CA. hereditario de mama y ovario</p>

Patogénesis del CAP

Las investigaciones realizadas hasta el momento sugieren que el desarrollo de neoplasias malignas es un proceso de varios pasos, en el que distintos oncogenes se activan y genes supresores de tumores son inactivados en una clona celular. Este proceso finalmente da origen a una población de células resistentes a los mecanismos moleculares que regulan la proliferación celular y la muerte celular programada.^{10,11} Como regla general, múltiples combinaciones de mutaciones genéticas son comúnmente encontradas en los CAP y de forma general pueden ser divididas en 3 categorías:

1. Activación de oncogenes (K-ras)*
2. Inactivación de genes supresores de tumores (p53, p16/CDKN2A y SMAD4)*
3. Inactivación de genes encargados de la reparación del ADN (hMLH1 y MSH2)*

**Entre paréntesis se muestran los genes que se han asociado al desarrollo de CAP.*

Aunque la mayoría de estas alteraciones genéticas representan mutaciones somáticas, otras están presentes en líneas germinales de familiares de primer grado confiriéndoles una predisposición familiar al CAP. Tabla 2.

Tabla 2. Genes que pueden estar mutados en línea germinal en el CAP	
Gen	Enfermedades asociadas
<i>BRCA2</i>	Cáncer de mama, ovario y CAP
<i>PALB2</i>	cáncer de mama y de páncreas
<i>p16/CDKN2A</i>	melanoma y CAP
<i>STK11</i>	Síndrome de Peutz-Jeghers y CAP
<i>PRSS1</i>	pancreatitis familiar y CAP
<i>hMLH1 y MSH2</i>	HNPCC y CAP

La lesión denominada neoplasia pancreática intraepitelial (PanIN) es la lesión precursora de CAP mejor caracterizada. Las PanIN son portadoras de varias mutaciones que se encuentran en el CAP invasivo y se ha visto que a mayor número de mutaciones es mayor grado de displasia de la lesión. La progresión de un epitelio mínimamente displásico PanIN 1 a una displasia más severa (grado 2 y 3) y finalmente a un carcinoma invasivo, se produce a la par de una acumulación sucesiva de mutaciones que incluyen la activación del oncogén K-ras, la inactivación de los genes supresores p16/CDKN2A, p53 y SMAD4. Esta secuencia de eventos se sustenta en estudios en modelos animales en los que después de la activación de K-ras junto con la inactivación del p53 resulta en el desarrollo de CAP que es muy similar a la enfermedad de los humanos.¹²

1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

El SRA se le ha considerado clásicamente como una cascada de acontecimientos que ocurren a nivel sanguíneo, desencadenada por la liberación de renina por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón y cuyo producto final biológicamente activo es un péptido de 8 aminoácidos llamado Ang II. Esta molécula actúa endocrinamente para mantener la presión arterial y el balance hidroelectrolítico a través de sus dos principales subtipos de receptores de siete dominios transmembranales identificados, conocidos como tipo 1 y 2 (AT1 y AT2 respectivamente).¹³

Componentes del SRA

Los componentes principales de este sistema son: la renina, el angiotensinógeno (Ao), la enzima convertidora de Angiotensina II (ECA1), la Ang II y los receptores de siete dominios transmembranales AT1 y AT2.¹⁴ La renina es una aspartil proteasa, sintetizada y almacenada en el aparato yuxtaglomerular (área especial de la nefrona), que cataliza específicamente la liberación hidrolítica del decapeptido Angiotensina I (Ang I) a partir del Ao. La liberación de renina está regulada por la acción de diferentes factores que actúan sobre las células yuxtaglomerulares entre ellos: la estimulación simpática de los vasos renales, la disminución de la presión de perfusión al riñón, el mecanismo de baroreceptor en las células yuxtaglomerulares; y factores humorales como: Ang II y endotelina 1,

entre otros. La liberación de la renina se realiza a través del incremento de la formación de AMP cíclico, el cual estimula la exocitosis de esta enzima y es el paso limitante de este sistema.¹⁵ Una vez liberada la renina, esta actúa sobre su sustrato, el Ao de origen hepático que es el sustrato peptídico circulante a partir del cual la renina libera a la Ang I.³¹

La ECA1 es una dipeptidil-carboxi-peptidasa, cuyos sustratos son la Ang I y la bradicinina; esta última se desactiva. La ECA1 está distribuida ampliamente en el cuerpo y en la mayoría de los tejidos se localiza en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares, de modo que se encuentra en contacto estrecho con la circulación.¹⁶ Figura 1.

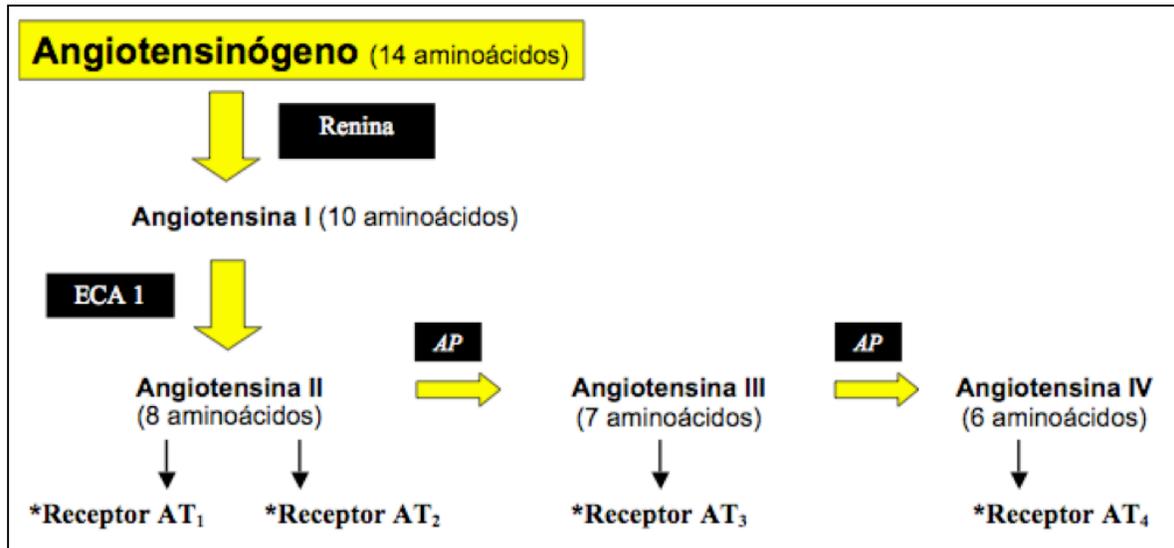


FIGURA 1. Sistema renina-angiotensina circulante. El angiotensinógeno sintetizado y secretado principalmente en el hígado. En la circulación el angiotensinógeno es cortado por la renina (aspartil proteasa) generando así la angiotensina I. La renina es secretada a nivel renal. La angiotensina I a su vez es cortada por la ECA1 (enzima convertidora de angiotensina II tipo 1) dando lugar a la formación de angiotensina II. Esta última es cortada por varias AP (aminopetidasa) para formar angiotensina III y IV. *Indica que el receptor puede reconocer otros péptidos de la angiotensina II.

La Ang II es un octapéptido con una vida media biológica de 15 a 60 segundos, que actúa en varios tejidos del cuerpo, incluyendo músculo liso vascular (agente presor 40 veces más potente que la noradrenalina), corteza suprarrenal (actúa en la zona glomerulosa de la corteza estimulando la biosíntesis y secreción de aldosterona), en riñón (incrementa la resorción de sodio en el túbulo proximal), en el sistema nervioso (estimula la ingestión de agua y aumenta la secreción de vasopresina y ACTH).³¹

Las células de la zona glomerulosa de la corteza adrenal sintetizan la aldosterona a partir del colesterol, en una cascada de 5 pasos. No existe un pool de aldosterona presintetizada en las células glomerulosas (la secreción es constitutiva), es decir, la secreción de aldosterona se incrementa al incrementar su síntesis. El principal secretagogo de la aldosterona es la Ang II, y en menor medida el incremento en los niveles séricos de K⁺ y los niveles de la hormona adrenocorticotropa (ACTH).^{17,18.}

Después de la unión de la Ang II a su receptor de 7 dominios transmembrana acoplado a la proteína G α_q , se produce un incremento en los niveles de calcio intracelular, a través de la generación del inositol trifosfato (IP3) que libera Ca²⁺ de las reservas intracelulares. Este incremento en el calcio intracelular promueve a su vez la apertura de canales de calcio denominados SOCCs de sus siglas en inglés (store-operated Ca²⁺ channels).

Además la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G, promueve la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje tipo L. El influjo de Ca^{2+} incrementa la actividad de las enzimas SCC (de sus siglas en inglés, side-chain-cleavage enzyme) y aldosterona sintetasa, esta última presente únicamente en células glomerulosas. Lo anterior produce un incremento en la síntesis y secreción de la aldosterona.¹⁹ Por otro lado el Ca^{2+} intracelular induce la activación de PKC con la subsiguiente activación de la vía de MAP cinasas, promoviendo la síntesis de proteínas de la vía encargada de la síntesis de la aldosterona.²⁰ Figura 2.

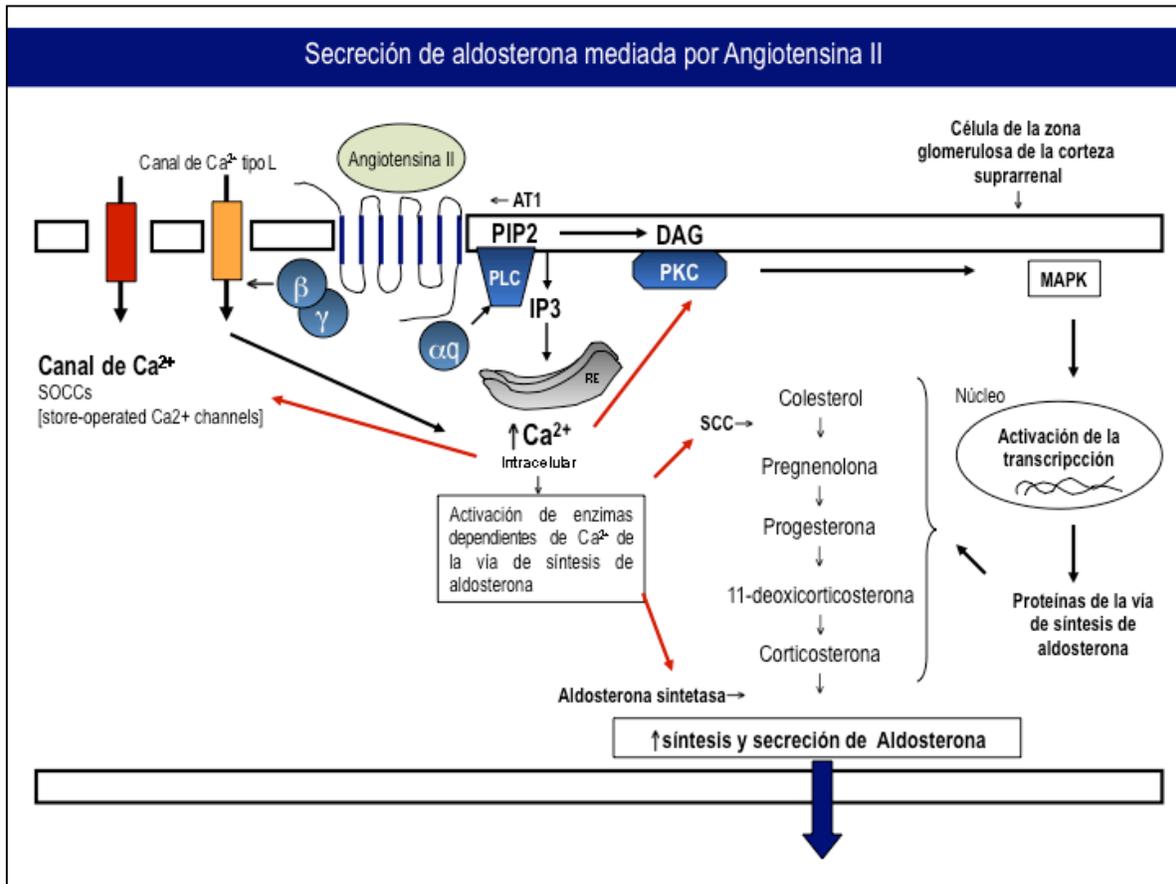


Figura 2. Secreción de aldosterona, mediada por angiotensina II. **AT1:** Receptor tipo 1 para Ang II, **PIP2:** Fosfatidil inositol 4,5-difosfato, **PLC:** Fosfolipasa C, **DAG:** Diacilglicerol, **IP3:** Inositol 1,4,5 trifosfato, **PKC:** Proteína cinasa C, **RE:** Retículo endoplásmico, **SCC** de sus siglas en ingles (side-chain-cleavage enzyme).

Receptores de Angiotensina II

Actualmente se han reconocido dos principales subtipos de receptores de Ang II, designados tipos 1 y 2 (AT1 y AT2).^{21, 22} La mayoría de las acciones conocidas de la Ang II están mediadas por el subtipo 1 (AT1), este receptor pertenece a la familia de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a las proteínas G, mientras tanto la función y las vías de transducción de señales para receptores AT2 están bajo investigación.^{23, 24} Estos receptores comparten el 34% de su secuencia de codificación, y ambos poseen 7 dominios transmembranales, y activan segundos mensajeros tanto acoplados como independientes a proteínas G.^{25, 26, 27} Tabla 3. En los roedores se han encontrado subclases del receptor AT1, que son los subtipos AT1A y AT1B.^{28, 29, 30}

TABLA 3				
Cuadro comparativo de las características de los receptores AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄				
	Receptor AT₁	Receptor AT₂	Receptor AT₃	Receptor AT₄
Cromosoma	Cromosoma 3 (humanos) 17, 2 (murinos)	Cromosoma X	?	?
Estructura	7 dominios transmembrana 359 aminoácidos ~41 kD	7 dominios transmembrana 363 aminoácidos ~44 kD	?	IRAP ~1025 aminoácidos ~170 kD
K_d (Angiotensina II)	~2-5 nM	~2-5 nM	~3-3 nM	~1-10 nM
Isoformas	Única en humanos AT _{1a} , AT _{1b} en roedores	?	?	?
Orden de afinidad	Ang II > Ang III	Ang II = Ang III	Ang IV > Ang II	Ang IV > Ang II
Agonistas sintéticos	?	CGP42112A	?	LVV-hemorfin-7
Antagonistas sintéticos	Bifenilimidazoles (Losartán, Candesartán etc.), saralasin	Tetrahidroimidazopiridinas (PD123319, PD123177, EXP655), saralasin.	?	Divalinal-angiotensina IV
Distribución predominante	Tejidos adultos	Tejidos fetales	Descrito únicamente en una línea celular	Sistema nervioso, Riñón
Localización celular	Membrana plasmática, citoplasma y núcleo por internalización del complejo Ang II-AT ₁	Membrana plasmática. No se internaliza	Membrana plasmática	Membrana plasmática
Función	Vasoconstricción, liberación de aldosterona, filtración glomerular, proliferación celular	Vasodilatación, antiproliferación, diferenciación celular	?	?

IRAP = siglas de su nombre en inglés *insulin-regulated membrane aminopeptidase*.

Acciones de la Angiotensina II a Nivel Renal

La Ang II es más conocida por su potente efecto vasoconstrictor, sin embargo posee diversas funciones en el organismo. Afecta la función renal actuando sobre el flujo sanguíneo, la filtración glomerular y sobre el transporte tubular, al aumentar la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en el túbulo proximal. También estimula la contracción del mesangio glomerular y el depósito de fibronectina y colágena. Por otro lado, estimula el crecimiento de la pared de los vasos en el organismo, en especial a nivel renal. Esto provoca la disminución de la luz de la vasculatura renal. Se ha reportado que todos los componentes de SRA están presentes en el riñón. El receptor AT1 es el receptor más abundante y se localiza en la arteriola aferente y eferente, el glomérulo y el túbulo proximal tanto en los animales como en los humanos y se encarga de regular las acciones vasoconstrictoras de Ang II, de la reabsorción de sodio y agua, pero también promueve la hipertrofia celular, la proliferación y los depósitos de matriz extracelular en el riñón, así como la estimulación de la secreción de TGF- β . El receptor AT2 se localiza en la corteza renal en particular en las arteriolas interlobulares pero no en el glomérulo, además es muy abundante en el tejido fetal pero disminuye rápidamente después del nacimiento y la unión de la Ang II a este receptor produce vasodilatación.^{31, 32, 33, 34.}

1.3 SISTEMAS LOCALES GENERADORES DE ANGIOTENSINA II (SLGA)

Clásicamente se ha considerado que el papel principal del SRA es en el mantenimiento de la tensión arterial y el balance hidroelectrolítico, sin embargo en los últimos años se ha reconocido la existencia de SLGA, intrínsecos a varios tejidos, en los cuales la Ang II actúa localmente como un factor autocrino, paracrino e incluso intracrino, para satisfacer necesidades específicas y propias del tejido de donde se origina y que además puede operar totalmente independiente de su contraparte circulante.^{35, 36, 37, 38, 39.}

Se considera que la generación de Ang II cerca de sus sitios de unión (AT1 y AT2), es importante para asegurar el cumplimiento de funciones celulares, que requieren ser precisamente reguladas, sin acciones concomitantes inapropiadas en tejidos no relacionados. Estos sistemas han identificados en: útero,⁴⁰ cerebro,⁴¹ corazón,⁴² testículos,⁴³ glándula mamaria,⁴⁴ ojo⁴⁵ y se ha visto que incrementan su expresión en estados patológicos (hipoxia, hiperglucemia, inflamación, obesidad, tumores),^{46, 47, 48, 49.} donde la Ang II a través del receptor membranar AT1 favorece el crecimiento y la proliferación celular (adipocitos, células de músculo liso vascular, cardiomiocitos, fibroblastos, células de la zona glomerulosa, células tumorales) mientras que el AT2 tiene un efecto contrario.^{50, 51, 52, 53.} Figura 3.

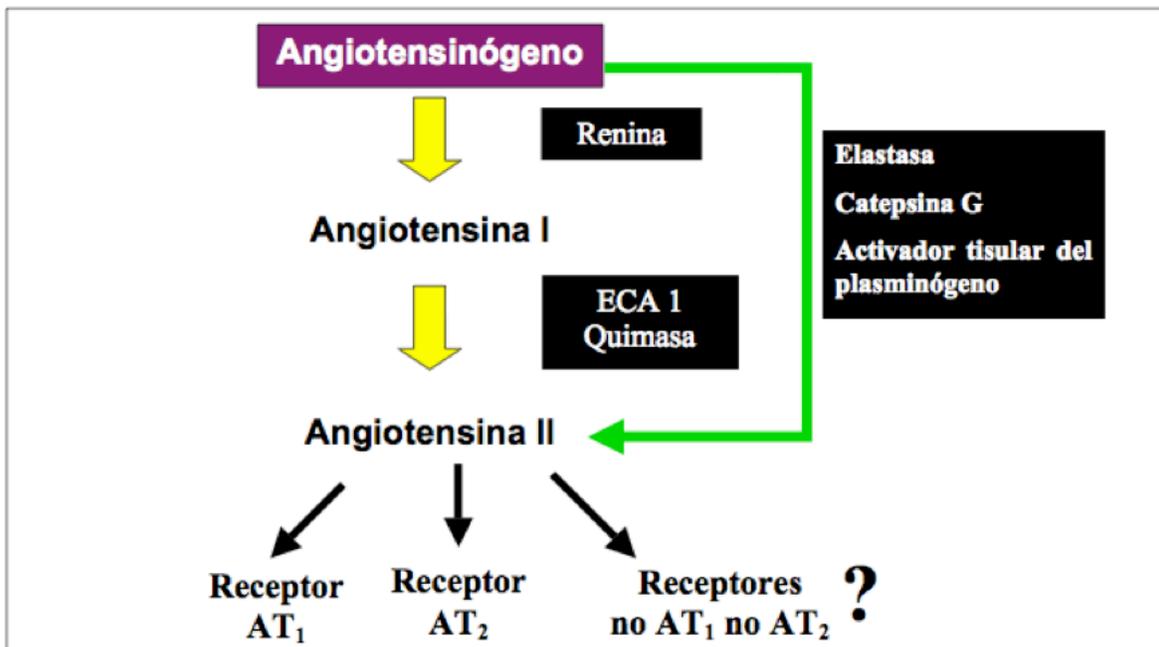


FIGURA 3. Sistema local generador de angiotensina II. El angiotensinógeno sintetizado en los tejidos, es cortado localmente por la renina tisular, generando angiotensina I, la cual puede ser cortada por enzimas como la ECA1 (enzima convertidora de angiotensina II tipo 1), ó la quimasa para formar angiotensina II. Además en los tejidos se puede generar angiotensina II directamente del angiotensinógeno por medio de enzimas como la elastasa, la catepsina G y el activador tisular del plasminógeno.

Además actualmente se postula que en los tejidos existen receptores para Ang II distintos a los típicos receptores membranales AT1 y AT2, a los que se ha denominado receptores “no-AT1, no-AT2”, que pueden o no compartir propiedades físicas o farmacológicas con los típicos receptores membranales.^{54, 55, 56.}

En 1992 Sugiura y colaboradores clonaron una proteína citosólica de hígado porcino, capaz de unir Ang II y a sus análogos con afinidad similar a la del receptor membranal AT1.⁵⁷ Sin embargo, los autores no encontraron homología al comparar la secuencia de aminoácidos con la descrita para el receptor membranal AT1. Además, estas proteínas no mostraron afinidad por el Dup753 o el EXP655 los cuales son antagonistas no peptídicos de los receptores membranales AT1 y AT2 respectivamente. Estos hallazgos sugieren que en el citosol existen proteínas de unión para Ang II con propiedades estructurales y farmacológicas diferentes a los receptores membranales AT1 y AT2.

En 1992 Tang y colaboradores,⁵⁸ empleando preparados nucleares extraídos de hígado de rata y Ang II marcada con ¹²⁵I, demostraron la presencia de sitios en el núcleo que unen Ang II con alta afinidad (K_d 1.4 nM), así como la unión de diferentes péptidos análogos de la Ang II. Además, se observó que un antagonista del receptor AT1 (Dup753), bloqueó y desplazó por completo la unión de la Ang II al receptor nuclear con una K_d similar a la observada a nivel membranal, lo que sugiere que ambos receptores comparten propiedades farmacológicas. En apoyo a estas observaciones se encuentra la identificación por medio de microscopía

electrónica y Ang II marcada [¹²⁵I] de sitios de unión para Ang II en envolturas nucleares extraídas de tejido hepático de rata, unión que era bloqueada por un antagonista del receptor AT1 (Dup753), mientras que no se afectaba con antagonistas específicos del receptor AT2.⁵⁹ También se ha demostrado la presencia de Ang II en el núcleo de neuronas de corteza cerebelar de rata, con predominio en la eucromatina transcripcionalmente activa.⁶⁰

Por otra parte, Eggena y colaboradores,⁶¹ pusieron de manifiesto el papel de la Ang II como un factor capaz de modificar la conformación de la cromatina, y que se une a secuencias específicas del ADN, produciendo cambios en la expresión de genes blanco implicados en la proliferación celular. En este estudio se observó un incremento en el ARN total extraído de núcleos de tejido hepático murino, en respuesta a la Ang II (10⁻⁹ mol/L). También se observó que el ARNm específico tanto para renina como para el angiotensinógeno se incrementaron. Estos efectos son inhibidos por el antagonista específico para el receptor AT1 (Dup753), como por un antagonista no selectivo de los receptores membranales (saralasin).

Funcionalidad de los Receptores “no-AT1, no-AT2”

La funcionalidad intracelular de los receptores “no-AT1, no-AT2” ha sido estudiada a través de los efectos de la Ang II sobre la contracción de músculo liso vascular y sobre la proliferación celular. A finales de los noventa se identificó un receptor funcional intracelular para la Ang II en el músculo liso vascular de la rata (aorta).⁶² Este receptor comparte algunas propiedades farmacológicas con los receptores membranales AT1 y AT2, por ejemplo, la contracción muscular inducida por la administración intracelular de la Ang II es inhibida con antagonistas específicos para cada receptor y también con el antagonista no selectivo. Sin embargo, la especificidad de este receptor se pone de manifiesto cuando no se afecta la contracción del músculo liso inducida por la Ang II al administrar intracelularmente un inhibidor específico del receptor de IP₃ (heparina), lo que sugiere su acción por una vía independiente de proteínas G y fosfolipasa C para producir contracción del músculo liso vascular.

La proliferación celular inducida de forma intracrina por la Ang II se ha estudiado en la línea celular de rata (H4-II-E-C3)⁶³ que tiene la capacidad de generar Ang II intracelularmente. Se observó que la transfección de las células con una forma no secretable de Angiotensinógeno (Ang [-s] Exp), produjo un incremento en el índice mitótico y un aumento en el ARNm del PDGF; (siglas de su nombre en inglés *platelet derived - growth factor*). Al administrar anticuerpos contra la Ang II en el cultivo celular no se modificaron los resultados, lo que sugiere que el efecto no es

mediado por una vía extracelular y apoya la existencia de un sitio de acción intracelular para la Ang II. Por otra parte se observó que el efecto mitótico fue bloqueado en forma selectiva por el antagonista del receptor AT1 (Dup753), mientras que otro antagonista (Candesartan) no fue capaz de bloquear dicho efecto.

Lo anterior probablemente se debe a la internalización selectiva de complejos Dup753-receptor AT1,⁶⁴ ya que al bloquearse la internalización de los receptores AT1 con óxido fenilarsénico en el cultivo celular, se suprime el efecto inhibitorio del Dup753 en la proliferación celular mediada por la Ang II generada de forma intracelular. La internalización del complejo Ang II-receptor AT1 es un mecanismo de desensibilización, que se conoce bien desde la década pasada. Es claro que el receptor membranal es capaz de migrar de la membrana plasmática al núcleo celular.⁶⁵ De esta forma la Ang II proveniente de la circulación una vez que se une al receptor AT1 puede penetrar a la célula. Al dissociarse el complejo ligando-receptor (Ang II-receptor AT1), la Ang II es degradada o puede interactuar con otros blancos intracelulares como los receptores “no-AT1, no-AT2”.

SLGA en el Páncreas

Estudios recientes de expresión y localización de componentes clave de este sistema (Ao y renina) proveen de sólida evidencia de la existencia de un SRA intrínseco en el páncreas.⁶⁶ Al parecer este SRA tisular juega un papel en la regulación final de funciones endocrinas y exocrinas del páncreas como son la secreción ductal de aniones y la secreción hormonal por los islotes.^{67, 68, 69.}

En un trabajo, al examinar tejido de páncreas humano sano, Tahmasebi y colaboradores encontraron la existencia de AT1 y pro-renina en el endotelio y células β de los islotes de Langerhans, y mediante hibridización *in situ* localizaron el ARNm de la pro-renina en fibras reticulares de los islotes y fibroblastos adyacentes a los vasos sanguíneos.⁷⁰ Por otra parte, se ha demostrado la existencia de AT1 y AT2 en la línea de células ductales con fibrosis quística CFPAC-1, y en la de células acinares de rata AR42J.^{64, 66.} Estos estudios han demostrado la funcionalidad de los receptores al elevarse la concentración de calcio intracelular y activarse la vía de la fosfolipasa C ante el estímulo con Ang II. Incluso, se ha descrito que la Ang II estimula la secreción de amilasa en la línea AR42J y la excreción de aniones en la línea de fibrosis quística CFPAC-1, ambos efectos mediados por el AT1.⁶⁶

En 1995 Stern y colaboradores informaron que los inhibidores de la ECA1 de Ang II (IECAS) eran un factor protector contra el desarrollo de diabetes en pacientes hipertensos. Carlsson en 1998 encontró en un modelo experimental, que la Ang II retarda la primera fase de liberación de insulina.⁶⁹

Estos hallazgos sugieren la existencia de un SRA local pancreático que pudiese ser de importancia en la fisiología de este órgano, actuando como un potenciador del SRA sistémico o regulando funciones propias del tejido de manera autocrina y paracrina.

1.4 ANGIOTENSINA II y CÁNCER

Desde la década pasada cierta evidencia epidemiológica, sugería que la Ang II podría estar involucrada en el cáncer, como lo mostró el estudio de Lever en 1998 quien en un análisis retrospectivo encontró que la administración a largo plazo de IECAS representaba un factor protector contra el desarrollo de cáncer.⁷¹ Recientemente a nivel experimental se ha asociado a la Ang II, con procesos de neovascularización, crecimiento y proliferación celular. Schellin y colaboradores encontraron que la Ang II es un factor mitógeno para las células de músculo liso vascular y cardiaco lo cual puede contribuir al desarrollo de hipertrofia cardiovascular. En otro estudio se demostró que la administración de un IECA “Captopril” a dos líneas celulares de carcinoma ductal mamario disminuía la proliferación celular.⁷² Arrieta-Rodríguez y su grupo encontraron que en glioma C6 de rata, el antagonista específico del receptor AT1 (ARA-II) Dup753, disminuía la proliferación celular en un 50% (volumen tumoral y número de mitosis), así como la neovascularización tumoral.⁷³

SLGA y CAP

Reddy y cols. realizaron un experimento en cultivos celulares de carcinoma de células ductales pancreáticas de hámster y encontraron que el Captopril (IECA) disminuyó la proliferación celular a la mitad, en comparación con el grupo control. Este estudio apoya la existencia de un SRA local que pudiese estar involucrado en el desarrollo de neoplasias pancreáticas.⁷⁴ El mecanismo por el cual los IECAS y los ARA-II disminuyen la proliferación celular y la angiogénesis no ha sido bien estudiado, aunque se sabe que estos efectos están mediados por el AT1, mientras que el AT2 tiene un efecto contrarregulador; como lo apoya un estudio reciente, en el cual se encontró que 50% de los CAP expresan receptores AT1, lo cual pudiese representar un potencial blanco terapéutico.⁷⁵

Una característica importante del CAP es que produce una fuerte reacción desmoplásica caracterizada por la formación de estroma denso por las células estelares pancreáticas (miofibroblastos).⁷⁶ Esta formación y recambio del estroma se lleva a cabo por la activación de las células estelares por citocinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En su forma activa las células estelares secretan colágeno, componentes de la matriz extracelular y metaloproteinasas, cabe señalar que el estroma no es justamente una barrera mecánica, sino más bien constituye un compartimiento dinámico involucrado en el proceso de crecimiento, invasión y diseminación tumoral.⁷⁷

A través de la estimulación del AT1, la Ang II es capaz de incrementar la expresión de los factores de transcripción *c-fos*, *c-myc* y *c-jun*, e inducir la vía Jak-STAT, resultando en la producción de citocinas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el PDGF, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), y el TGF- β ; todos estos relacionados con la proliferación celular, angiogénesis y desarrollo de tumoral. El TGF- β se encuentra elevado en pacientes con tumores pancreáticos. Por otra parte, el efecto angiogénico e inmunodepresor (con consiguiente disminución en la vigilancia inmunológica) del TGF- β puede también participar directamente en el desarrollo de neoplasias.^{78, 79.}

El VEGF es la citocina más importante reconocida hasta ahora en el proceso de angiogénesis. Se ha visto que el grado de expresión de esta proteína se relaciona con el grado de vascularización tumoral y que ambos factores tienen importancia pronóstica. Sin embargo, esta asociación no es tan clara en el CAP, ya que los estudios realizados han encontrado resultados opuestos. Los primeros datos mostraron que al igual que sucede con la mayoría de los tumores sólidos el CAP es dependiente de la angiogénesis, sin embargo el tratamiento del CAP con inhibidores de la angiogénesis ha fallado y paradójicamente un estudio reciente en ratones demostró que al incrementar la vascularización del tumor por medio de la manipulación la vía hedgehog, se incrementó significativamente la eficacia con la que los agentes quimioterapéuticos llegan a los tumores pancreáticos.⁸⁰ Además se ha identificado en los tumores pancreáticos un subgrupo de células cancerosas con propiedades de células madre, que potencialmente pudieran funcionar como

una fuente tumoral. Se sabe que estas células son resistentes a la quimioterapia y a la radioterapia lo cual puede explicar la pobre respuesta de los tratamientos en esta enfermedad.⁸¹

Por otra parte, en otros modelos tumorales más estudiados como el de los gliomas, se ha encontrado que la angiogénesis y el VEGF son esenciales en el proceso de tumorigénesis, y que el bloqueo de este factor de crecimiento reduce el crecimiento tumoral. Es importante señalar que la inducción de estas citocinas por parte de la Ang II puede llevar a la subsecuente elevación de otras que también han sido asociadas con el desarrollo de tumores. De esta manera, el VEGF es capaz de inducir el factor de crecimiento similar al epitelial captador de heparina (HB-EGF), que se ha demostrado elevado en tumores pancreáticos y que es capaz de inducir crecimiento de estos tumores. Similarmente, el TGF- β y el b-FGF son capaces de inducir la expresión del oncogén *c-met* y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) respectivamente, fuertemente asociados con la progresión tumoral en el páncreas.^{82, 83, 84.}

Línea celular Capan-1

Las células Capan-1 derivan de una metástasis de CAP humano,⁸⁵ y constituyen un modelo in vitro adecuado para estudios experimentales que ayuden al descubrimiento y comprensión de factores involucrados en la aparición y progresión del CAP, dado que esta línea se obtuvo de un hombre de 40 años de origen caucásico con diagnóstico histológico de CAP.

Estas células son de morfología epitelial y cuando se inoculan en ratones producen tumores compatibles con CAP. Cabe mencionar que hasta donde sabemos no se había explorado la existencia de un SLGA en esta la línea celular. Además la evidencia presentada hasta ahora apoya la posible existencia de un SRA local pancreático, cuyas funciones pueden ser de importancia en la carcinogénesis del órgano. Estas células solo se distribuyen para los propósitos de investigación por la American Type Culture Collection (ATCC) No. HTB-79.^{86, 87.}

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVO E HIPÓTESIS

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CAP es una de las neoplasias más frecuentes del aparato digestivo y la mortalidad que conlleva es muy alta (prácticamente igual a su incidencia). En la actualidad no existe una terapia que incremente la sobrevida de los pacientes que padecen esta enfermedad.

La Ang II aumenta la proliferación de varios tipos celulares, a través de su receptor membranal AT1. Algunos tumores malignos expresan receptores para Ang II. La evidencia hasta ahora, apoya la posibilidad de la existencia de un SRA local pancreático, cuyas funciones pueden ser de importancia en la carcinogénesis del mismo órgano. Nuestro interés en analizar la existencia de un SLGA en el CAP se debe a que su expresión puede afectar positivamente la proliferación celular y la secreción de citocinas involucradas en el crecimiento y diseminación tumoral como el VEGF, b-FGF. Se utilizará como modelo *in vitro* la línea celular de CAP Capan-1, la cual ha mostrado ser de utilidad para estudios moleculares de los tumores pancreáticos.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los componentes principales de un SLGA y evaluar su papel sobre la proliferación y secreción de citocinas en la línea celular tumoral pancreática Capan-1.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

En la línea celular Capan-1:

Analizar la expresión de Ang I y II.

Analizar la expresión de los receptores AT1 y AT2.

Evaluar el efecto de la Ang II exógena sobre la proliferación celular.

Evaluar el efecto de la Ang II endógena sobre la proliferación celular a través del receptor AT1.

Analizar la secreción de VEGF, b-FGF basal y cuando se administra Ang II.

Explorar la existencia de sitios de unión para Ang II diferentes a los receptores de siete dominios transmembranales clásicamente descritos.

2.4 HIPÓTESIS

En las células Capan-1 existe un SLGA que estimula la proliferación celular y la secreción de citocinas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es un modelo experimental *in vitro* prospectivo, longitudinal y comparativo que se llevará a cabo utilizando la línea celular tumoral de origen pancreática Capan-1.

Trabajar con líneas celulares tiene la ventaja de poder aislar y homogenizar a la población celular, lo que permite estandarizar técnicas de biología celular para medir entre otras cosas: Tiempo de duplicación, secreción de citocinas, hormonas, enzimas u otros productos, así como receptores de membrana, lo cual pueden ser clave para el esclarecimiento de la fisiopatología de las enfermedades, como en el caso de las neoplasias malignas. Además la Línea Celular Capan-1 por su origen (metástasis de CAP) representa un modelo experimental adecuado para el estudio del CAP ya que conserva algunas de las características del tejido del cual provienen.

3.2 MEDIOS Y REACTIVOS

El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), el suero bovino fetal (SBF) y reactivo de Trizol, fueron comprados de Gibco (Rockville, MD, USA). El kit para radioinmunoanálisis (RIA), la angiotensina I marcada con 125-I, así como la timidina tritiada [3H] se obtuvieron de DuPont NEN (Boston, MA, USA). La 125I-[Sar1-Ile8] angiotensina II se obtuvo de laboratorios Covance (Princeton, NJ, USA). Los estuches de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) fueron para Ang II SPI-BIO (Fontenay-aux-Roses, PAR, FRANCE), y para VEGF y b-FGF fueron de y R&D Systems (Minneapolis, MIN, USA). Los anticuerpos específicos para Ang II, receptores AT1 y AT2 fueron de tipo IgG policlonal de conejo, de Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). La Ang II (Calbiochem (Gibbstown, NJ, USA)), Dup753 y PD123177 fueron donados generosamente por el laboratorio del Dr. Kevin J. Catt.

3.3 LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR

Para este estudio se utilizaron las líneas celulares pancreáticas Capan-1 y AR42J, las cuales se obtuvieron de la ATCC (Rockville, MD, USA). Ambas líneas celulares fueron crecidas y mantenidas hasta la realización de los experimentos en medio DEMEM, adicionado con 10% SBF y antibióticos al 1% (50 µg/ml de estreptomicina, 50 U/ml de penicilina), además de 2mM L-glutamina.

Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a una temperatura 37° centígrados en una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada 3-4 días. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 6 pozos con aproximadamente 3x10⁵ células en cada uno. Todos los cultivos fueron crecidos en medio completo por 24 horas antes de la realización de los experimentos excepto en los que se indique un procedimiento distinto. Después de este periodo, los cultivos se lavaron con un amortiguador de fosfato (PBS) con el propósito de eliminar el SBF, sustituyendo el medio de cultivo por uno libre de suero, el cual solo contenía antibióticos.

3.4 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ANG I

La presencia de Ang I (por lo tanto, de forma indirecta de Ao y renina) en el sobrenadante de los células Capan-1, ó en el homogenizado celular se determinó por RIA. Las células Capan-1 se cultivaron en pozos de 100 mm. hasta su confluencia. Un día antes de los experimentos las células se lavaron con PBS y fueron sembradas en medio libre de SBF. Aproximadamente fueron sonicadas 1x10⁶ en 1 ml de DMEM fresco sin SBF (a 4°C x 15 s), y esto fue utilizado como homogenizado celular para estudiar el contenido de Ang I. El homogenizado de células (1 ml) ó el medio de cultivo (1 ml) fueron incubados con 0.1 ml de solución amortiguadora (pH 7.4) a 37° por 3 h. La Ang I en la mezcla de reacción fue expresada como ng de Ang I / ml.

3.5 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ANG II y VEGF

Después de transcurridas 24 horas de incubación en medio de cultivo libre de SBF, el suero fue colectado y centrifugado para la determinación de la concentración de Ang II, del VEGF y del b-FGF en el medio de cultivo utilizando estuches comerciales específicos basados en la técnica de ELISA, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron evaluadas por triplicado, y las mediciones fueron echas a los 30 y 60 minutos de haber detenido la reacción utilizando una densidad óptica de 405 nm; Se utilizó estándar de Ang II como control positivo y DEMEM como control negativo.

3.6 INMUNOCITOQUÍMICA PARA ANG II Y LOS RECEPTORES AT1 Y AT2

La inmunotinción para localizar a la Ang II y a los recetores AT1 y AT2 tanto en las células Capan-1 como en los tejidos control se realizó usando la técnica convencional de avidina-biotina-peroxidasa. Las células fueron crecidas en portaobjetos, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído en PBS por 20 minutos. Los cortes de tejido cardiaco, útero y placenta fueron obtenidos de una colección de tejidos humanos del departamento de patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, y utilizados como control positivo. Los cortes fueron desparafinados y deshidratados.

Todas las laminillas se incubaron por 10 minutos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% en metanol para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Ambos fueron incubados en solución bloqueadora (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) por 30 minutos. Tanto las células como los tejidos fueron lavados tres veces por 5 minutos con PBS y después incubados por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales dirigidos contra Ang II, AT1 o AT2 a una dilución de 1:100. Se utilizaron un anticuerpos policlonales de conejo contra un péptido ubicado cerca de la región amino-terminal del receptor tipo 1 de Ang II humano y para el receptor tipo 2 de Ang II se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra los aminoácidos 221-363 localizados en la región carboxi-terminal del receptor de Ang II humano.

Posteriormente las laminillas se incubaron por 10 minutos con el anticuerpo secundario biotilnado y con el complejo avidina-peroxidasa. Las preparaciones fueron reveladas usando diaminobenzidina. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y los ciclos de lavado fueron realizados usando PBS. Finalmente los cortes y extendidos celulares se tiñeron con hematoxilina. Para determinar la especificidad de la tinción, se preincubo el anticuerpo primario contra el AT1 con el péptido bloqueador específico (sc-1173 P, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antes de adicionarlo en los cortes. Como controles negativos adicionales, se realizó el inmunoensayo omitiendo los anticuerpos primarios.

3.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR) PARA LOS RECEPTORES AT1 y AT2)

La extracción del ARN tanto de las células como de los tejidos control se realizó con el reactivo de Trizol de acuerdo al protocolo del fabricante y como se describe a continuación. Después de retirar el medio de cultivo de los cultivos celulares, las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente se agregó 1 ml de Trizol en cada una de las cajas de cultivo con el propósito de lisar y disolver los componentes celulares y preservar el ARN. Después de homogenizar el lisado celular se colocó en tubos eppendorf y se dejó reposar 5 min. a temperatura ambiente, para posteriormente agregarle 0.2 ml de cloroformo, agitarlo vigorosamente por 15 segundos. Después de un reposo de 5 minutos, las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm. por 15 minutos a 4°C, recuperando la fase acuosa, agregándole 0.5 ml de isopropanol. Inmediatamente de un reposo de 15 minutos a temperatura ambiente se procedió a centrifugar a 12000 rpm. por 10 minutos a 4°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y al pellet obtenido se le agregó 1 ml de etanol al 75%. Previa agitación en vortex, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm. por 5 minutos a 4°C, desechándose el sobrenadante. El pellet obtenido se dejó secar al aire ambiente para finalmente disolverlo en agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.1%.

La transcripción reversa (RT) se realizó usando un ensayo comercial (Gene Amp, Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA). Se tomaron 5 µg de ARN total a los cuales se le agregaron 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de cada uno de los dNTP's (*deoxinucleótidos trifosfatos*) a una concentración de 10 mM; 0.5 µl de inhibidor de ARNasa, 0.5 µL de oligo dT, 0.5 µl de transcriptasa reversa de origen murino a una concentración de 50 µM/µL y 1 µL de un buffer para PCR 10X . La mezcla se llevó a reacción en un termociclador (Perkin Elmer 480) y se sometió a 37°C por 60 min. seguido de 5 min. a 95°C.

La reacción de PCR se realizó usando AmpliTaq ADN polimerasa (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA). A 3 µl de ADN complementario (ADNc) obtenido de la reacción de RT, se le agregaron 2 µl de MgCl₂ 25 mM; 4µl de Buffer de PCR 10X; 31.75 µl de agua estéril; 0.25 µl de ADN a una concentración de 5U / µl y 2.5 µl de los oligonucleótidos específicos para cada receptor. La secuencia de los primers que se utilizó fue la siguiente 5'- AGATGATTGTCCCAAAGCTG-3' (sentido), y 5'- GCTTCTTGGTGGATGAGCTT-3' (antisentido), para el receptor AT1 y 5'- AATATGAAGGGCAACTCCAC-3' (sentido), 5'-TTAAGACACAAAGGTCTCCAT-3' (antisentido) para el receptor AT2. La mezcla de reacción fue colocada en un termociclador sometiendo a una desnaturalización inicial a 95°C por dos minutos, y posteriormente a 35 ciclos de amplificación (95°C, 30 seg. 60° C, 30 seg. y 72 ° C 30 seg.) finalizando a 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron con luz ultravioleta. Como control interno para los experimentos de PCR, realizamos una amplificación de 19 ciclos con primers para la β 2-microglobulina. El tamaño esperado de los productos de PCR para los receptores AT1 y AT2 fue 1010 pb y 1100 pb respectivamente.

Nota: Se realizó la búsqueda de un tejido que en condiciones normales expresara los receptores de Ang II subtipos AT1 y AT2 (control positivo). De acuerdo a lo reportado por Cox⁸⁸ se utilizó útero como control positivo para los receptores AT1 y AT2. Un control adicional para el AT1, de acuerdo a lo reportado por Leung⁸⁹ fue tejido placentario. Finalmente, como control adicional del análisis de PCR, realizamos los experimentos con células Capan-1 del laboratorio de la Dra. Marcia Hiriart del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

3.8 ESTUDIOS DE UNIÓN AL RECEPTOR

La unión de ^{125}I -[Sar1,Ile8] Angiotensina II a las células Capan-1 intactas fue determinada de acuerdo al protocolo descrito por Stuzmann M.⁹⁰ La evaluación se llevó a cabo en placas de cultivo de 6 pozos con aproximadamente 1×10^6 células en cada uno. Las células fueron lavadas dos veces en medio 199 frío e incubadas con 1×10^5 cpm (0.05-0.1 mCi) de ^{125}I -[Sar1-Ile8] Angiotensina II en ausencia o presencia de los antagonistas específicos para los receptores AT1(Dup753) y AT2 (PD123177).

Después de lavar dos veces con PBS frío, las células Capan-1 fueron cosechadas en un buffer de solubilización (NaOH 0.5 N y SDS 0.5%) y la radiactividad celular asociada fue determinada en presencia de un exceso de [Sar1,Ile8] Angiotensina II sin marcar.

3.9 CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular en las células Capan-1 y en las células AR42J (controles) en presencia de Ang II o Dup753 se evaluó por medio de la técnica de incorporación de timidina tritiada (3H-timidina). Brevemente 1×10^5 células fueron cultivadas en triplicado en DMEM con 10% de SBF por 24 horas, posteriormente el medio fue reemplazado con medio de cultivo libre de SBF y las células fueron incubadas por 24, 48, o 72 horas en presencia o en ausencia de cantidades crecientes de Ang II (en el caso de las Capan-1 y AR42J) o Dup753 (únicamente para las células Capan-1). Veinticuatro horas antes de cada tiempo de cultivo, el medio fue reemplazado por medio adicionado con 2 mCi de [3H]-timidina (Amersham, Arlington Heights, IL) más las moléculas en estudio a las concentraciones mencionadas y de acuerdo al grupo experimental. Una vez transcurridas las 24 horas, las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, se fijaron con una solución de metanol al 95% con 5% de PBS Vol / Vol, retirándose este por decantación. Posteriormente se les adicionaron 300 ml de NaOH 0.1 N dejándose a temperatura ambiente por 16 horas. Previa neutralización con ácido acético 1N, las células fueron transferidas a frascos con 5 ml de líquido de

centelleo. La radiactividad incorporada al ADN fue cuantificada en un contador (*SCINTILLATION ANALYZER 1600 TR*) durante 5 minutos. Cabe mencionar que se hizo control de la viabilidad celular por medio de azul de tripano.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados en medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas para una $P < 0.05$. La comparación entre los grupos, se llevó a cabo por análisis de varianza (A N O V A). Se utilizó el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), Chicago, IL, USA. Versión para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 DETECCIÓN DE ANGIOTENSINA I EN EL CULTIVO CAPAN-1

Detectamos la presencia de Ang I en el homogenizado celular, pero no en ninguno de los sobrenadantes de las Células Capan-1. La concentración de Ang I en el homogenizado celular fue de 0.4 ± 0.08 ng/ml. De forma indirecta los resultados demuestran que de manera basal en la línea celular Capan-1 se encuentran presentes los principales componentes del SRA (Ao, renina o enzimas con actividad de renina) y que esta Ang I generada no es secretada.

4.2 DETECCIÓN DE ANGIOTENSINA II EN EL CULTIVO CAPAN-1

De forma similar a la Ang I, no se detectó la presencia de Ang II en el sobrenadante del cultivo celular ni a los 30 o a los 60 minutos por medio de la técnica de ELISA. Figura 4, Únicamente se detectó inmunoreactividad para Ang II directamente en las células Capan-1 por medio de inmunocitoquímica. Figura 5A

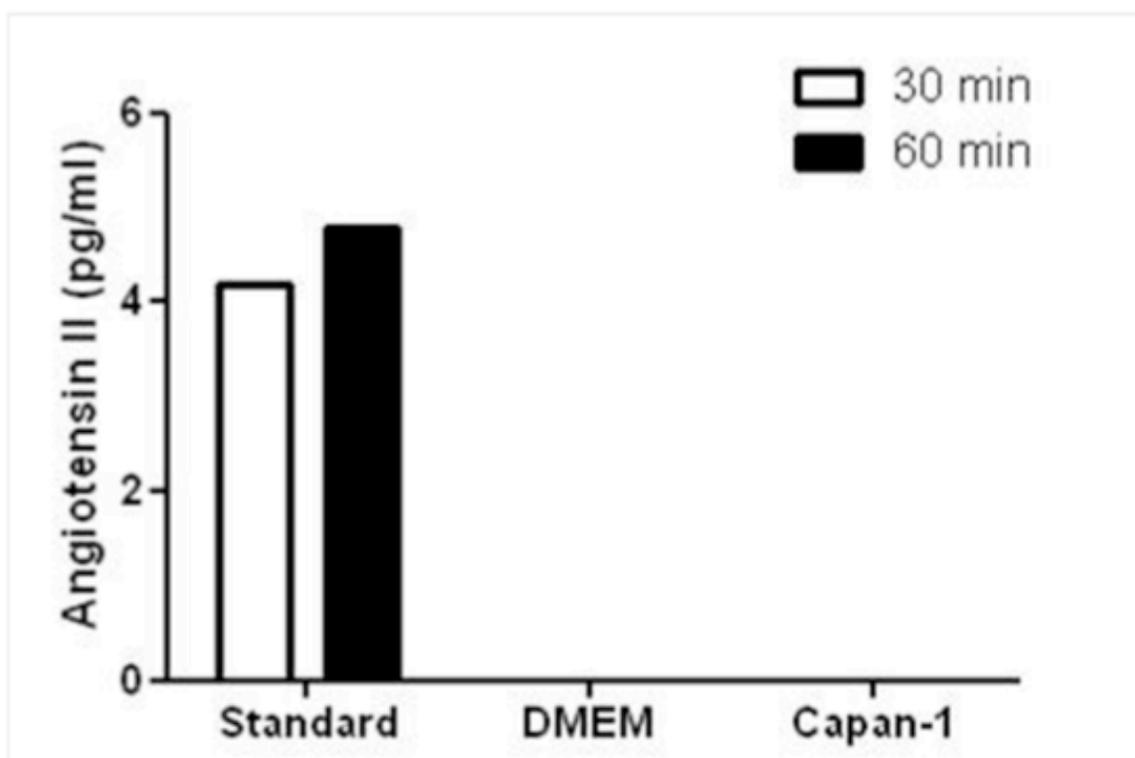


FIGURA 4. Niveles de Angiotensina II en las células Capan-1. Un total de 10^6 células Capan-1 fueron cultivadas en DMEM como se describe en material y métodos. La Angiotensina II fue evaluada en el sobrenadante del cultivo por ELISA. Se utilizaron estándares de calidad como controles positivos a una concentración de 4.2 pg/mL (30 minutos), y de 4.8 pg/mL (60 minutos), y medio de cultivo DMEM libre de SBF como control negativo.

La inmunoreactividad para Ang II fue también positiva en el tejido cardiaco (control positivo) Figura 5B, y se perdió cuando se realizó la inmunotinción sin el anticuerpo primario para Ang II (control negativo). Figura 5C.

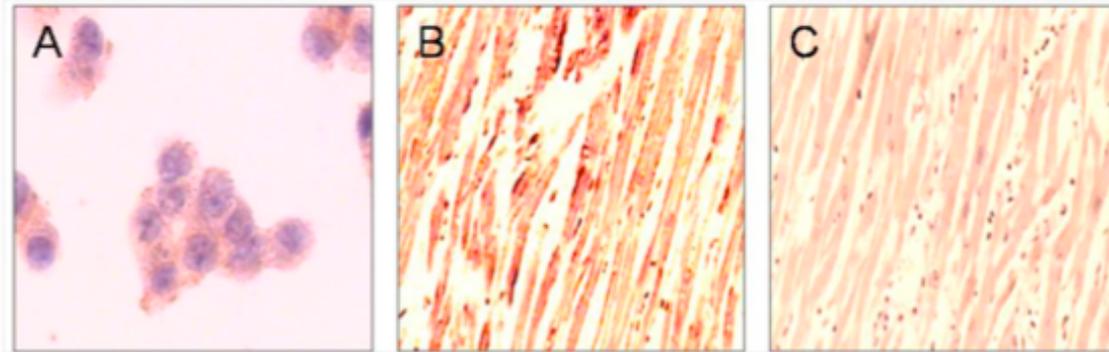


FIGURA 5. Inmunoreactividad para Angiotensina II en las células Capan-1. Las células Capan-1 fueron inmunoteñidas para angiotensina II como se describe previamente. A, Células Capan-1 (400x). B, Tejido cardiaco (control positivo; 200x). Tejido cardiaco sin el anticuerpo primario (control negativo; 200x).

4.3 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES AT1 Y AT2

El análisis de PCR mostró que las células Capan-1 no expresan los receptores típicos membranales para Ang II, AT1 y AT2 (Figura 6, carriles 1 y 2) mientras que ambos fueron positivos en el útero (control positivo, carriles 5 y 6). El control de carga (β 2-microglobulina) fue positivo en todos los casos.

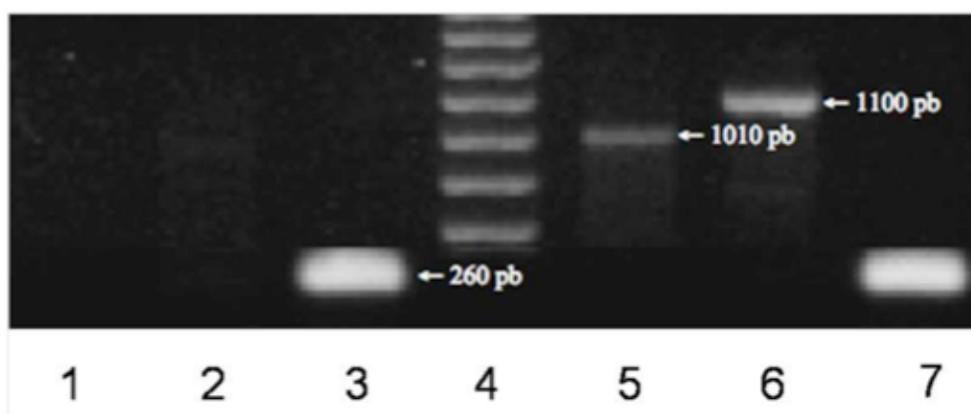


Figura 5.- RT PCR para los receptores AT₁ [1010 pb] y AT₂ [1100 pb]. Carril: 1= AT₁, 2= AT₂, 3= β 2 microglobulina (260 pb) (Células Capan-1), 4= Marcador de peso molecular, 5= AT₁, 6= AT₂, 7= β 2 microglobulina (260 pb), (Útero).

FIGURA 6. Expresión de los receptores para Angiotensina II en las células Capan-1. La expresión de los receptores para Angiotensina II AT1 y AT2 en células Capan-1, se investigó por medio de reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa. Se utilizó tejido uterino como control de expresión positivo y β 2-microglobulina como control de carga. AT1R: 1010 pb; AT2R: 1100 pb; β 2-microglobulina: 260 pb. Carril 1: AT1; carril 2: AT2; carril 3: β 2-microglobulina, en las células Capan-1; carril 4: marcador de peso molecular; carril 5: AT1; carril 6: AT2; carril 7: β 2-microglobulina en el tejido uterino.

De acuerdo con el estudio de PCR, el análisis de inmunocitoquímica también confirmó la ausencia de los receptores para Ang II AT1 y AT2 en las células Capan-1. (Figura 7, A y C), mientras que fue positiva en el tejido cardíaco (control positivo) Figura 7, B y D. Los resultados de este estudio muestran que a diferencia de lo que ocurre en otras líneas celulares de CAP (PANC-1, MIA PaCa-2, Capan-2) en la línea celular Capan-1, no se encuentran presentes los receptores típicos membranales para Ang II.

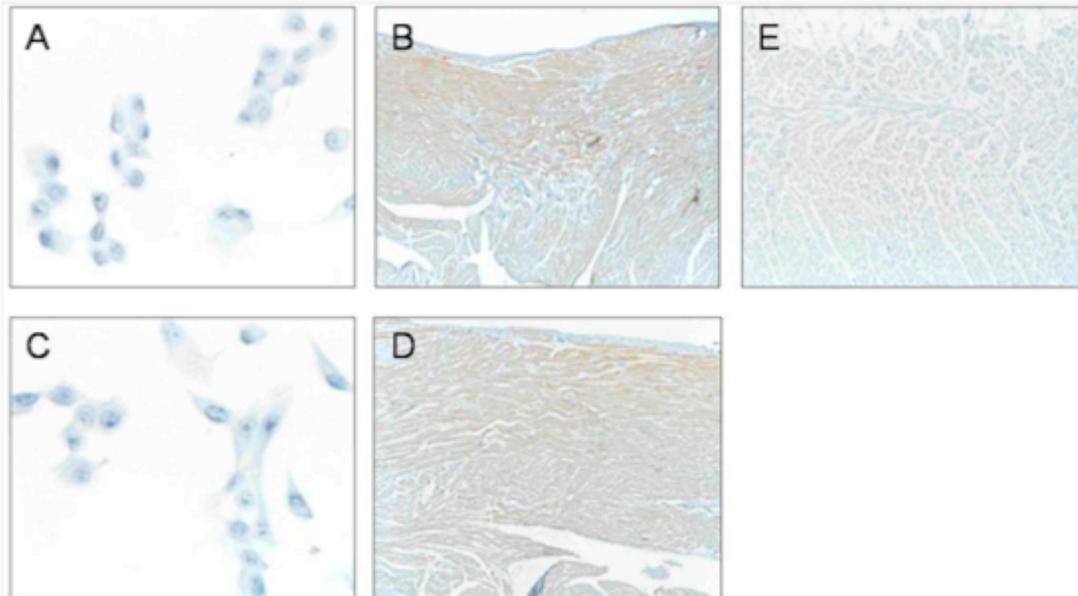


FIGURA 7. Inmunoreactividad para los receptores AT1 y AT2 en las células Capan-1. Las células Capan-1 fueron inmunoteñidas para los receptores AT1 (A) y AT2 (C) como se describe previamente. Se utilizó tejido cardíaco como control positivo para el receptor AT1 (B) y AT2 (D), mientras que la inmunotinción en presencia del péptido bloqueador del anticuerpo dirigido contra el AT1 se utilizó como control negativo (E).

4.4 DETECCIÓN Y FUNCIONALIDAD DE SITIOS DE UNIÓN “NO-AT1, NO-AT2” PARA ANGIOTENSINA II

La identificación de sitios de unión para Ang II en la membrana de las células Capan-1 se realizó por medio de un ensayo de unión. Se observó unión específica de la Ang II en la membrana celular de las células Capan-1 (control) la cual no fue desplazado por el antagonista del receptor específico AT1 (Dup753) ni por el antagonista de los receptores AT2 (PD123177), lo cual sugiere que en estas células hay sitios de unión "no-AT1, no-AT2 ", que difieren farmacológicamente con los clásicos receptores AT1 y AT2. Figura 8.

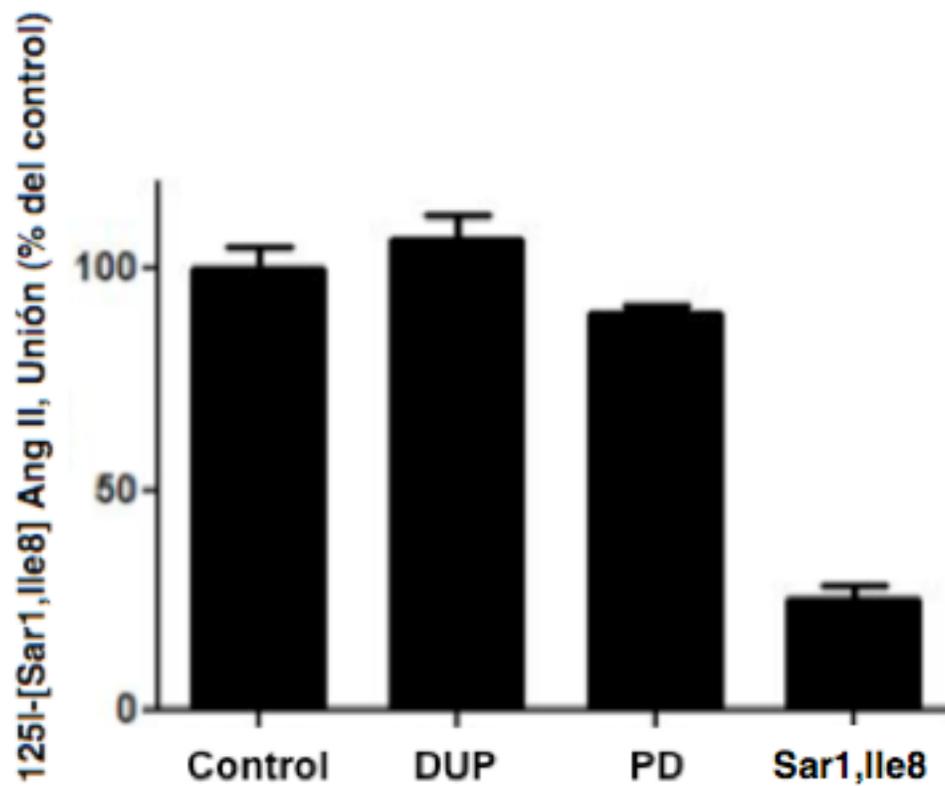


FIGURA 8. Inhibición de la unión de 125I-[Sar1,Ile8] Angiotensina II a las células Capan-1 por varios fármacos. Las células fueron incubadas por 4 horas a 4° C, en presencia de 125I-[Sar1,Ile8] Angiotensina II 0.25nM y las concentraciones indicadas de Dup753, PD123177 o Sar1, Ile8. Después de lavar las células, la unión específica de 125I-[Sar1,Ile8] Angiotensina II fue determinada. Cada valor representa el porcentaje del control.

4.5 EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II EXÓGENA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN DE CITOCINAS.

Con el propósito de evaluar la posible funcionalidad de los sitios de unión no-AT1, no-AT2, se decidió seguir con el análisis, evaluando el efecto de la Ang II exógena sobre la proliferación celular y secreción de VEGF. Además dado, que algunos autores han demostrado que dichos sitios pueden ser sensibles a los bloqueadores convencionales para los receptores típicos de membrana se realizó el análisis empleando el bloqueador específico para el receptor AT1 (Dup753). Los resultados mostraron que ni la Ang II ni el Dup753 exógenos modificaron la proliferación celular en las células Capan-1, mientras que en las células AR42J (control positivo), se produjo un aumento estadísticamente significativo en la proliferación celular en respuesta al estímulo con Ang II (Figura 8 [A - C]). Por otro lado, de acuerdo a lo informado anteriormente por Holloway,⁹¹ encontramos que de forma basal las células Capan-1 secretan VEGF, y esta secreción no se alteró tras la administración de Ang II exógena (Figura 8 [D]). Nuestros hallazgos en su conjunto sugieren que en la línea celular Capan-1, el SLGA opera de forma intracrina e independiente al SRA circulante.

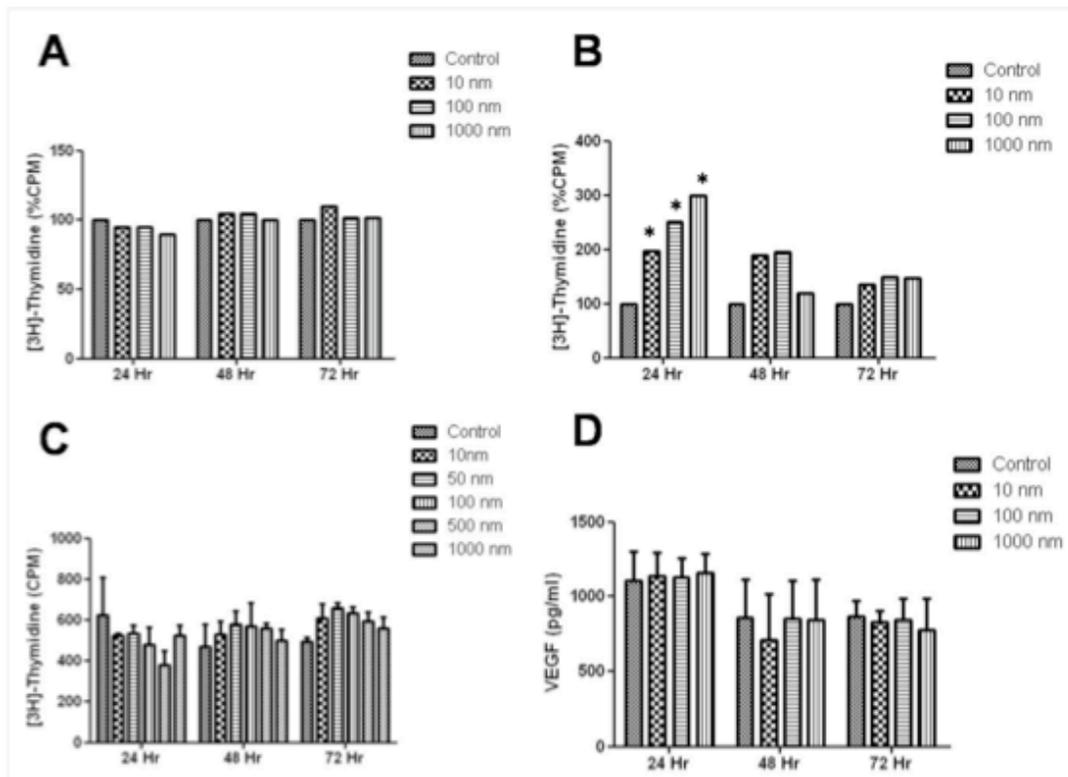


FIGURA 9. Proliferación celular y secreción de VEGF en presencia de Angiotensina II exógena. Dosis crecientes de Angiotensina II fueron adicionadas a las células Capan-1 y AR42J en cultivo (A - B), y de Dup753 únicamente a las Capan-1 (C). La proliferación celular se midió por medio de timidina [3H]. No se observó que la administración exógena de angiotensina II o de Dup753 modificara la proliferación de las células Capan-1. Tampoco se observó modificación en la secreción de VEGF con la administración exógena de angiotensina II (D). La secreción de factor de crecimiento vascular endotelial bajo un estímulo creciente de Angiotensina II se midió por medio de ELISA.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El CAP es una de las neoplasias más frecuentes del aparato digestivo y la mortalidad que conlleva es muy alta siendo esta representativa de su incidencia. Alrededor del mundo el CAP causa un estimado de 213 000 muertes al año. La mortalidad es tan alta en parte debido a que el CAP usualmente no produce síntomas hasta que se ha diseminado. La falta de herramientas sensibles y específicas para detectar la enfermedad en etapa temprana y la carencia de tratamientos que incrementen la sobrevida de los pacientes, son las razones por las que se requieren de manera urgente, estrategias novedosas de diagnóstico y tratamiento.

A pesar de todos los avances a nivel molecular del CAP el mecanismo por medio del cual el CAP tiene un comportamiento tan agresivo se desconoce ampliamente de aquí la importancia de los estudios a nivel molecular que aporten datos acerca de las vías que favorecen dicho comportamiento, particularmente las vías involucradas en la proliferación y diseminación de este cáncer. La evidencia generada hasta ahora, apoya la posibilidad de la existencia de un SRA local pancreático, cuyas funciones pueden ser de importancia en la carcinogénesis del mismo órgano. En varios tejidos y líneas celulares la Ang II claramente favorece la proliferación celular.

A la fecha no se había documentado la existencia de un SLGA en las células Capan-1 y el hecho de que en esta línea celular se generen grandes cantidades de Ang II, podría dar lugar al desarrollo de estrategias para antagonizar a la Ang II, en el tratamiento oncológico. Es decir una nueva modalidad terapéutica dirigida a la regulación del SRA tisular podría derivarse del estudio de estos sistemas.

Por otro lado, en el presente trabajo como en el de otros autores se han demostrado sitios de unión diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2, localizados en diferentes compartimientos celulares, modulando funciones que van desde la liberación de Ca^+ intracelular hasta la regulación de la transcripción.

Las células Capan-1 expresan Ang I y II, pero no expresan los receptores típicos membranales para Ang II (AT1 y AT2) y no se encontró que la adición de Ang II exógena o del Dup753 bloqueador del receptor AT1 al cultivo de células Capan-1 modificara la proliferación celular. Todo esto aunado al hallazgo de que la Ang II no se secreta, sugiere fuertemente que en las células Capan-1 la Ang II opera de manera intracrina actuando en sitios de unión no-AT1, no-AT2. Para responder a lo anterior se realizó la búsqueda de sitios de unión para Ang II por medio de ensayo de unión. Sin embargo, para mayor entendimiento del efecto de la Ang II intracelular se requiere un mayor estudio utilizando estrategias intracelulares de estimulación y bloqueo de la Ang II (ejemplo. liposomas cargados con Ang II o antagonistas).

La existencia de otros subtipos de receptores para la Ang II actualmente se estudia y discute intensamente. A la fecha varios autores han descrito sitios de unión intracelulares específicos para Ang II. Tabla 4.

Tabla 4. Sitios de unión no-AT1, no-AT2 en diferentes tejidos de mamíferos			
Tejido	Especie	Compartimiento celular	Referencia
Hígado	Conejo	Citosol	1989 Kiron ⁹² ,
Corazón	Cerdo	Citosol	1992 Sugiura ⁵³
Hígado	Rata	Núcleo	1992 Booz ⁹³
Células Cardiacas	Ratón	Núcleo	1993 Robetson ⁹⁴
Queratinocitos	Humano	¿?	1996 Steckelings ⁹⁵
Músculo liso vascular	Rata (Línea celular)	Citosol	2001 Filipeanu ^{96, 97}
Cerebro	Rata	Membranas celulares	2010 Karamyan ⁹⁸

Estudios han demostrado que la Ang II puede actuar intracelularmente uniéndose a receptores diferentes a los típicos membranales. Los cuales pueden estar involucrados en la angiogénesis⁹⁹ Finalmente, la ausencia de receptores AT1 y AT2 en las células Capan-1, refleja la heterogeneidad de fenotipos de las células tumorales pancreáticas.

6 PERSPECTIVAS

Algunos estudios sugieren que tanto en el citosol como en el núcleo celular existen receptores para la Ang II diferentes a los típicos receptores membranales AT1 y AT2. Sin embargo, falta por establecer las características de estos receptores, y su papel en las funciones de la Ang II. Estos nuevos receptores parecen ser péptidos que comparten algunas propiedades farmacológicas con los receptores membranales AT1 y AT2 y parecen jugar un papel importante en las respuestas celulares desencadenadas por la Ang II que todavía son poco comprendidas. Los resultados de este estudio, sugieren la acción intracrina para la Ang II como mecanismo de regulación celular, dejando atrás el concepto clásico de la Ang II sólo como un péptido vasoactivo, cuyas acciones se llevan a cabo a través de dos receptores membranales. Los estudios a futuro podrán dirigirse a establecer si el papel principal de los nuevos receptores denominados como "no-AT1, no-AT2" se encuentra a nivel del SLGA, a través de regular funciones tejido específicas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Los receptores "no-AT1, no AT-2" podrían explicar la localización de la Ang II en el núcleo y en particular en la cromatina transcripcionalmente activa, donde puede influir en forma directa sobre la síntesis de ARNm. Es necesario realizar más estudios para la caracterización precisa de estos sitios de unión para la Ang II, lo cual abre la posibilidad de encontrar nuevos blancos potenciales para la modulación de la función celular a través de esta hormona.

Suplemento 1

BASES MOLECULARES DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Introducción

Los tumores esporádicos, se originan de la adquisición de mutaciones somáticas, alteraciones genéticas y epigenéticas que producen cambios en la secuencia, la estructura y la expresión genética. Dichas alteraciones se encuentran presentes en la mayoría de las células cancerosas y son las responsables de la capacidad que tienen los tumores de generar sus propias señales mitogénicas, evadir la apoptosis, resistir a señales inhibitorias, proliferar sin límites y son también responsables de sus propiedades angiogénicas y de diseminación a distancia.

Los oncogenes fueron inicialmente caracterizados como elementos genéticos transformantes contenidos dentro de retrovirus oncogénicos, sin embargo el rol de los oncogenes en la iniciación del cáncer ha permanecido ambiguo. De hecho se ha visto que la expresión ectópica de oncogenes individuales en células primarias no produce transformación sin eventos genéticos cooperadores. Además la transducción retroviral de oncogenes en cultivos primarios de roedor o de humano no estimula la proliferación y en su lugar causa detención del crecimiento o apoptosis por medio de la activación de la vía P19ARF/p53.

Aunque el oncogen K-ras se encuentra mutado en una proporción significativa de los cánceres de páncreas, colon y pulmón, su papel en las etapas tempranas de la carcinogénesis no es clara. Los estudios realizados hasta el momento muestran que la mutación activante del encogen K-ras no se considera que sea un evento suficiente para inducir proliferación celular anormal en ausencia alteración en otros genes cooperadores. ¹⁰⁰

Los estudios que analizaron la mutación del RAS como un evento inicial de la transformación celular paradójicamente mostraron que al inducir la expresión de un K-ras mutado en cultivos primarios, se provocaba detención del crecimiento, a menos de que se acompañara de alteración en otros oncogenes cooperadores o la pérdida coincidente de la función de p53 o p19ARF. ¹⁵

En un estudio se encontró que la expresión condicional de un alelo K-ras endógeno en fibroblastos embrionicos de murino, causa un incremento en la proliferación celular y una transformación parcial en ausencia de otras anomalías genéticas. En otro estudio reciente se encontró que la expresión diseminada de un alelo endógeno no tiene consecuencias manifiestas en la mayoría de los tejidos, apoyando la premisa de que el papel oncogénico del RAS se restringe a la progresión tumoral.

Usando una estrategia gen-dirigido, se generó un ratón mutante que alberga un alelo condicional K-ras y se encontró que la expresión generalizada de K-ras causa letalidad embrionaria, mientras que la expresión dirigida estimula la proliferación anormal en los tejidos portadores de la mutación en K-ras.

Es importante señalar en este punto que la incapacidad de los oncogenes ectópicamente expresados para transformar cultivos primarios in vitro contrasta con varias observaciones clínicas en las que las células preneoplásicas son portadoras de una sola mutación oncogénica en ausencia de eventos genéticos cooperadores obvios. Por ejemplo, las mutaciones en K-ras en las hiperplasias ductales pancreáticas, ocurren en poblaciones celulares que aparentemente no tienen otras mutaciones oncogénicas agregadas. Estos hallazgos sugieren que la expresión aberrante de oncogenes introducidos ectópicamente confiere diferentes efectos biológicos, que los oncogenes expresados endógenamente.¹⁰¹

En general las alteraciones moleculares encontradas con mayor frecuencia en el CAP son las mutaciones activantes del oncogén K-ras (90%), sobre expresión del oncogén HER2-neu (50% al 70%) y pérdida de la expresión en los tumores supresores p16/CDKN2, p53, y DPC4 (100%, 70% y 50% respectivamente).

Oncogenes

K-ras: El gen K-ras se encuentra localizado en el cromosoma 22p y es uno de los genes más frecuentemente mutados en el CAP (>90%). Este gen es el homólogo humano de un gen del *Virus del Sarcoma Murino de Kirsten* (*Kirsten murine sarcoma virus*), de ahí el nombre de K-ras. La gran mayoría de las mutaciones en este ocurren en el codón 12 y son activantes. La transcripción del gen K-ras mutante produce una proteína RAS anormal que se encuentra bloqueada en su forma activada, lo que produce una activación aberrante de señales que favorecen la proliferación y la supervivencia celular. Análisis genéticos y bioquímicos han establecido que las proteínas RAS funcionan como GTPasas acopladas a la membrana plasmática que activan vías efectoras cuando unen GTP. Estas vías efectoras de RAS como la Raf/MEK/ERK (MAPK) y PI3K/AKT promueven la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Las bases moleculares de la oncogenicidad del RAS se deben a que las mutaciones de sentido equivocado lo transforman en un efector constitutivo ya que lo estabilizan en su forma unida al GTP por medio de disminuir su actividad de intrínseca de GTP-asa.^{15, 102.}

Genes supresores de tumores

La pérdida de la función de varios genes supresores de tumores ha sido documentada en los tumores pancreáticos. Para que la función de un gen se pierda, ambas copias (tanto el alelo materno como el paterno) del gen deben ser inactivadas. Lo anterior puede ocurrir por una mutación genética de una de las copias con pérdida del segundo alelo (pérdida de la heterocigocidad) ó por una deleción homocigota de ambas copias del gen; en otros casos la función se pierde por una hipermetilación del promotor del gen. Los genes supresores de tumores que se encuentran inactivados en más de la mitad de los cánceres de páncreas son el p16/CDKN2A, p53, SMAD4 (DPC4).¹⁷

p16: El gen p16 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9 y se encuentra mutado en el 95% de los cánceres de páncreas. Su falta de función se debe a una mutación somática, siendo en el 40% de las veces por una deleción homocigota, en un porcentaje similar por una mutación intragénica acoplada a una deleción del segundo alelo y en 15% de los casos la inactivación genética por metilación de su promotor. Lo anterior da como resultado en la mayoría de las veces una pérdida de la función de la proteína CDK/N2A que es el producto del gen p16. La inactivación del gen p16 en el CAP es importante por varias razones:

Con la pérdida de la función del gen se elimina un importante control del ciclo celular, ya que la proteína p16 es la encargada de la regulación de la transición del ciclo celular de G1 a S. Las mutaciones hereditarias en el p16 son una de las causas del síndrome de mola atípica familiar y melanoma, lo que se asocia a un incremento en el riesgo de CAP.^{14, 103.}

Las deleciones homocigotas que inactivan al gen p16 frecuentemente inactivan a un gen adyacente conocido como MTAP que codifica la enzima 5´metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) y datos de estudios realizados en líneas celulares sugieren que la inactivación del gen MTAP en algunos cánceres de páncreas podría ser como un marcador molecular subrogado para la deleción homocigota del p16.^{14, 104.}

p53: Es un gen localizado en el cromosoma 17p y es uno de los genes más frecuentemente afectados en el cáncer humano incluyendo el CAP. Este gen se encuentra inactivado en el 75-85% de los cánceres de páncreas y casi siempre debido a una mutación somática (la mayoría de las veces) acoplada con la pérdida del segundo alelo. Con la inactivación genética de p53 se pierde la regulación tanto de la proliferación celular así como de la muerte celular programada (apoptosis) en respuesta al daño en el ADN.^{17.}

SMAD4: El gen SMAD4 se localiza en el cromosoma 18q. Las mutaciones inactivantes en el gen SMAD4 (anteriormente conocido como DPC4), se encuentran en aproximadamente 60% de los cánceres de páncreas.

En 30% de los tumores la inactivación se debe a una delección homocigota, en otro 30% de los casos hay una mutación intragénica acoplada con pérdida de la función del segundo alelo. El producto de este gen la proteína SMAD4 funciona en la transmisión intracelular de señales del receptor TGF- β de la membrana al núcleo celular. Las mutaciones en otros componentes de la vía de señalización de TGF- β como SMAD3 TGFbR1 y TGFR2 también se han reportado en el CAP. Subrayando la importancia de esta vía de señalización en el desarrollo del CAP.

La inactivación de SMAD4 en el CAP es importante por las siguientes razones:

Se ha desarrollado una inmuno-tinción para la proteína SMAD4 que correlaciona fuertemente con el estatus del gen SMAD4. Es decir, la presencia o ausencia de positividad para la proteína SMAD4 puede ser usada con fines de diagnóstico ó como adyuvante en la interpretación de muestras de tejido de difícil interpretación como en el caso de un carcinoma de origen primario desconocido, en cuyo caso la ausencia de positividad (inactivación de SMAD4) podría señalar que el origen del tumor primario fuera un CAP como primera posibilidad ó por el contrario si un paciente tiene CAP conocido y posteriormente desarrolla adenocarcinoma en el pulmón con positividad para SMAD4 (expresión de SMAD4 intacta) se podría deducir que el tumor del pulmón es un primario diferente.

Cabe señalar que aunque se necesitan mayores estudios, los datos preliminares sugieren que el estatus en el gen SMAD4 puede ser útil para la estratificar y pronosticar a los pacientes con CAP así como para la toma de decisiones.

Cabe mencionar que los cánceres de páncreas con pérdida de la expresión del SMAD4 tienen altas tasas de metástasis a distancia y pobre pronóstico.^{105, 22.}

Mutaciones germinales y en genes de reparación del ADN

Aunque al parecer la mayoría de los cánceres de páncreas tienen un origen esporádico, aproximadamente 5% de los tumores malignos de páncreas se presentan en pacientes con historia familiar de CAP, de hecho se sabe que en los pacientes con dos familiares de primer grado con CAP el riesgo de desarrollar CAP se incrementa 18 veces. En pacientes con 3 o más familiares afectados, el riesgo se incrementa 57 veces. Estos datos fuertemente apoyan la noción de CAP familiar es una entidad real. Además se ha demostrado que un subgrupo de familiares con el síndrome familiar atípico de mola maligna-melanoma (FAMM), tienen un incremento de 20 veces el riesgo de desarrollar CAP sin que el riesgo relativo de otras formas de cáncer se incremente sustancialmente. De forma similar los pacientes con riesgo de cáncer de mama como resultado de anomalías genéticas heredadas en BCRA2 tienen riesgo de CAP alrededor de 10 veces mayor que la población general. También otros síndromes familiares se han asociado con un incremento en el riesgo de CAP, incluyendo el síndrome de

cáncer hereditario no polipósico y el síndrome de ataxia telangiectasia. Además el síndrome de pancreatitis hereditaria causado por la mutación en el gen de tripsinógeno se asocia con 40 a 70% de riesgo de CAP.¹³

BCRA2: El gen BCRA2 se ubica en el cromosoma 13 y está inactivado en menos del 10% de los cánceres de páncreas. Su inactivación casi siempre por mutaciones de línea germinal (heredado) acompañado de una pérdida somática del segundo alelo. Las mutaciones germinales en BCRA2 (responsables del cáncer hereditario de mama y de ovario) se asocian con un incremento en el riesgo de CAP y representan una de las más importantes causas de agregación familiar de CAP, encontrándose en cerca del 17% de los pacientes con CAP familiar. El producto del gen (proteína de BRCA2) participa en la vía de señalización de la anemia de Fanconi y juega un papel importante en la reparación del daño por entrecruzamiento del ADN y se ha sugerido que esta función del BRCA2 puede ser explotada de forma terapéutica. De hecho los estudios in Vitro sugieren que los cánceres de páncreas con el BRCA2 genéticamente inactivado son significativamente más susceptibles a agentes que causan entrecruzamiento del ADN abriéndose la posibilidad de que los pacientes con CAP que muestren inactivación del BRCA2 podrían ser más susceptibles a agentes como la mitomicina y el cisplatino, lo cual ya está siendo investigado de forma prospectiva.^{1, 17, 106.}

PALB2: El gen PALB2 localizado en el cromosoma 16P codifica la proteína de unión a BCRA2 y al parecer las mutaciones germinales en PALB2 no incrementen el riesgo de cáncer de mama sin embargo la mutación truncante de línea germinal de PALB2 se ha identificado hasta en el 3% de los individuos con CAP familiar.^{1, 17}

STK11: El gen STK11 se localiza en el cromosoma 19 y codifica para una cinasa de serina y treonina que regula la polaridad celular y funciona como un gen supresor de tumores. Las mutaciones en línea germinal en el gen STK11 se asocian con el síndrome de Peutz-Jeghers, un desorden autosómico dominante en el que los individuos afectados desarrollan pólipos, hamartomas gastrointestinales, máculas pigmentadas en los labios y en la mucosa bucal así como una variedad de tumores malignos gastrointestinales. Los pacientes que padecen este síndrome tienen un riesgo muy incrementado de desarrollar CAP siendo este de 36% a lo largo de la vida. Además las mutaciones somáticas en STK11 se han observado en una pequeña fracción de los CAP (4%) particularmente los que crecen en asociación con un IPMN (neoplasia mucinosa papilar intraductal).^{1, 107, 108.}

Genes de reparación del ADN: Los genes hMLH1 y el hMSH2 son bien conocidos por su importante participación en la patogénesis del cáncer colorrectal, particularmente en el síndrome de Lynch y en el síndrome hereditario de cáncer colorrectal no polipósico (*hereditary non polyposis colorrectal cancer, HNPCC*). Los pacientes con HNPCC tienen mutaciones heredadas de línea germinal en los genes de reparación del ADN y tienen un riesgo elevado de varios cánceres

incluyendo el CAP en el cual se encuentra la mutación en estos genes en aproximadamente el 4% de los casos.¹³

Otros genes considerados de baja frecuencia en el CAP: Un número de otros genes han sido identificados que se encuentran raramente mutados en el CAP y generalmente tienen menos importancia que K-ras, p16/CDKN2A, p53 y SMAD4. Entre los genes mutados con baja frecuencia se encuentra EP300, SMARCA4, CDH1, EPHA3, FBXW7, MLL3, DPP6, BAI3, GPR133, GUCY1A2, PRKCG, y TGF beta R2.²⁵

Alteraciones debidas a Metilación: Además a la inactivación mutacional, la expresión de numerosos genes en el CAP puede ser silenciada por un método epigenético de silenciamiento de genes conocido como metilación aberrante en los promotores. Entre los genes que pueden ser silenciados de esta forma en el CAP se encuentran: UCHL1, NPTX2, SARP2, CLDN5, LHX1, WNT7A, FOXE1, TJP2, CDH3, ST14 y p16/CDKN2A.¹⁰⁹

ADN mitocondrial: Con más frecuencia las mutaciones están dirigidas al ADN nuclear, no obstante el ADN mitocondrial puede también estar somáticamente mutado en el CAP, sin embargo no es claro si alguna de estas mutaciones puede jugar un papel en la tumorigénesis pancreática. Algunos estudios sugieren que las mutaciones en el ADN mitocondrial puede ser explotadas para el desarrollo de pruebas de detección temprana.

Debido a que las células contienen miles de mitocondrias, una mutación clonal en el ADN mitocondrial por lo tanto sería fácil detectar.

Micro ARN: Los micro ARN (miARN) son segmentos cortos no codificantes del ARN que regulan la expresión de otros genes. Aparentemente un número de miARNs están diferencialmente expresados tanto en el CAP así como en las lesiones precursoras que dan origen al CAP. Por ejemplo miR-34A se encuentra frecuentemente suprimido en el CAP y aparentemente juega un papel en la expresión de p53.

CAP en la era post genómica

En la actualidad hay pocas opciones de tratamiento para los pacientes con CAP, por lo que se necesitan con urgencia nuevos conocimientos en la patogénesis de esta enfermedad considerada como letal. Recientemente para atender a este objetivo se realizó un análisis completo de 24 CAP. Se buscaron deleciones homocigotas y amplificaciones en el ADN del tumor, por medio del uso de microarreglos los cuales contenían pruebas para 10 a la 6 polimorfismo de un solo nucleótido. Encontramos que los CAP tienen alrededor de 63 alteraciones genéticas, siendo la mayoría de estas mutaciones puntuales. Estas alteraciones delimitan un núcleo básico de 12 vías de señalización y procesos celulares genéticamente alterados.¹¹⁰

En otras palabras en este trabajo se intentó identificar genes adicionales que podrían orientar las futuras investigaciones sobre esta enfermedad, tomando en consideración que los cánceres humanos son primordialmente enfermedades genéticas.

Primero se identificaron las secuencias de exones codificadores de proteínas de 20,735 genes y estas se utilizaron para diseñar los primers para 219 229 amplicones para cubrir estas regiones. Estos amplicones incluyeron 94.5% de las secuencias blanco y arrojaron datos de secuencias de 98.5% de las bases blancos dentro de estos amplicones. Los 208 311 amplicones exitosamente secuenciados dieron datos de mutaciones en 23 219 transcritos representando 20 661 genes.²⁷

El ADN de 24 CAP avanzados fue amplificado por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y posteriormente secuenciado. Los 24 tumores fueron pasados a modelos in Vitro como líneas o como xenotrasplantes en ratones desnudos para remover la contaminación por células no neoplásicas, facilitando la detección de mutaciones.²⁷

Los exones que contienen secuencias variantes fueron reamplificadas y resecuenciadas del ADN tumoral así como del normal del mismo paciente para confirmar la mutación y asegurar que la mutación fuera somática (que no estaba presente en las células normales).²⁷

Los resultados de esta investigación mostraron lo siguiente: De las 1562 mutaciones somáticas detectadas con esta estrategia 25.5% fueron silentes, 62.4% fueron de sentido equivocado, 3.8% fueron sin sentido, 5.0% fueron pequeñas inserciones ó deleciones, 3.3 % fueron en sitios de corte o dentro de sitios de empalme y regiones no traducidas.²⁷

El espectro de mutaciones somáticas es similar en el cáncer de colorrectal, cerebro y páncreas, pero difiere significativamente en el cáncer de mama, lo que sugiere que las células epiteliales de la mama están expuestas a diferentes tipos de carcinógenos o que usan diferentes sistemas de reparación. Dado que es esperable que las células de colon estén expuestas a carcinógenos de la dieta en mayor medida que las células cerebrales o pancreáticas, una posible interpretación de estos resultados es que los componentes de la dieta no son directamente responsables de la mayoría de las mutaciones que se encuentran en el cáncer en los humanos.²⁷

De los 20, 661 genes analizados por secuenciación, 1,327 tuvieron al menos una mutación y 148 tenían dos o más. El tipo de mutación puede dar información útil para la evaluación de su papel en la enfermedad.

Las mutaciones sin sentido, fuera del marco de las inserciones, las deleciones y los cambios en el sitio de corte, generalmente producen la inactivación de los productos proteínicos.

Para evaluar las mutaciones con sentido equivocado e utilizó un sistema de computo. De las 924 mutaciones con sentido equivocado 160 (17.3%) se predijo que podrían contribuir a la tumorigénesis. También se generaron modelos estructurales de 404 de las mutaciones con sentido equivocado identificadas en este estudio. En cada caso el modelo se baso en cristalografía por rayos x o espectroscopia por RMN de las proteínas normales o su homologo cercano relacionado.

El análisis mostró que 55 de las 404 mutaciones se localizaron cerca de un dominio de interfase o de del sitio de unión al ligando por lo cual es probablemente que tengan alguna alteración en su función. El número promedio de mutaciones somáticas en el CAP, es considerablemente menor que en el cáncer de mama o en el cáncer colorrectal ($p = <0.001$) a pesar de que fueron secuenciados menos genes en estos dos últimos tipos de tumor. Una explicación admisible para esta baja tasa de mutaciones es que las células que inician la tumorigénesis pancreática han pasado por menos divisiones que las de cáncer colorrectal o que las células del cáncer de mama.²⁷ Dado que la mayoría de los genes que codifican proteínas en el genoma humano fueron evaluados en el estudio, los datos proveen de una oportunidad única de investigar grupos de genes que funcionen en procesos y vías de señalización específicos. En primer lugar grupos de genes involucrados en vías de señalización o procesos celulares fueron definidos por medio de bases de datos bien establecidas.

Además se desarrollo un abordaje estadístico que proporcionaba la probabilidad combinada de que un grupo de genes contuvieran alteraciones controladoras. Este análisis identifico 69 juegos de genes que estaban genéticamente alterados en la mayoría de los 24 cánceres examinados. 31 de estos conjuntos podrían estar agrupados en 12 principales vías de señalización y procesos alterados en 67 a 100% de los 24 tipos de canceres analizados y tuvieron una clara relevancia funcional para el desarrollo de neoplasias basado en el análisis descrito anteriormente.²⁷

Expresión diferencial de genes en el CAP

El análisis serial de expresión genética SAGE (Serial análisis of gene expresión), es una herramienta poderosa para el descubrimiento de nuevos marcadores tumorales. La publicación de las colecciones genéticas de tejidos normales y neoplásicos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/> se ha expandido, lo cual aunado al conocimiento más completo del genoma y la disposición de mejores técnicas bio-computacionales, han mejorado sustancialmente la asignación de marcas “tags” para genes humanos.²⁸

Estas mejoras han proveído de una oportunidad para reevaluar de forma global la expresión génica en el CAP utilizando las colecciones SAGE disponibles. Las colecciones SAGE generadas de 6 canceres de páncreas, fueron comparadas con las colecciones SAGE generadas de 11 tejidos pancreáticos no neoplásicos.¹¹¹

Comparado con las colecciones de tejido normal, se identificaron 453 marcas diferencialmente expresados en el CAP, incluyendo 395 que fueron mapeadas en genes conocidos y 58 como marcas no caracterizadas. De las 395 marcas asignadas a genes conocidos, 223 estuvieron sobreexpresadas en el CAP y 172 tuvieron expresión disminuida.

Con el propósito de mapear las 58 marcas no caracterizadas en los genes correspondientes. Se utilizó un recurso recientemente desarrollado conocido como TAGmapper (<http://tagmapper.ibioinformatics.org>) para identificar 16 genes adicionales diferencialmente expresados. La expresión diferencial de 7 genes involucrados en múltiples procesos celulares como transducción de señal (MIC-1), diferenciación (DMBT1 y Neugrin), respuesta inmune (CD74), inflamación (CXCL2), ciclo celular (CEB1) y actividad enzimática (Kallikrein 6), fue confirmada con inmunohistoquímica de microarreglos tisulares (Kallikrein 6, CD74 y DMBT1) o por RT-PCR (CEB1, Neugrin, MIC1 y CXCL2).²⁸

En los últimos años múltiples plataformas como el análisis serial de expresión genética (marcas SAGE, microarreglos de oligonucleótidos y los microarreglos de cDNA) se han utilizado para identificar genes diferencialmente expresados en los cánceres de páncreas. Estos genes diferencialmente expresados han probado ser marcadores diagnósticos útiles y en algunos casos potenciales blancos terapéuticos.²⁸

Por ejemplo los antígenos de células madre de cáncer de próstata y mesotelina fueron identificados como sobre expresados en el CAP por medio de análisis serial de expresión génica. Posteriormente se demostró que el inmunomarcaje de estas dos proteínas es de utilidad en la interpretación de biopsias de páncreas con diagnóstico incierto. De forma similar la osteopontina fue identificada sobreexpresada en el CAP usando microarreglos de oligonucleótidos y se ha mostrado que los niveles séricos de osteopontina tienen una sensibilidad del 80% y del 97% para el diagnóstico de CAP.²⁸

SAGE es una tecnología que puede ser utilizada para identificar perfiles de expresión genética global en un tejido. Un gran número de colecciones SAGE están disponibles en línea para el público en general permitiendo obtener un perfil completo y cuantitativo de la expresión genética en una variedad de tejidos y estados patológicos. Hasta junio de 2004 la base de datos online SAGE incluía 250 colecciones humanas y 4 570 000 tags (marcas), la asignación del tag al gen, es un paso crítico en el análisis de los datos SAGE, sin embargo aún con las mejoras continuas en las bases de datos SAGE en línea, muchos de los SAGE tags aún no son asignados a los genes. La asignación equívoca de tags a genes supone un reto importante debido a que los tags están restringidos a 10 nucleótidos pueden empalmarse con genes equivocados debido a una identidad coincidente en la secuencia.²⁸

Suplemento 2

DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Introducción

La detección y la cirugía tempranas son la mejor oportunidad de curación de los pacientes, sin embargo los síntomas son vagos y ocurren tardíamente cuando el cáncer ya es irresecable y no hay opciones terapéuticas. Esto se debe en parte a que las manifestaciones clínicas aparecen tardíamente y no son específicas. Dichas manifestaciones se relacionan con la compresión y o invasión de estructuras adyacentes al páncreas (conducto biliar común, duodeno, estomago, colon) y por lo tanto son indicativos de estadio avanzado. A estos factores se suma la falta de precisión en los métodos para identificar esta neoplasia ya que en la actualidad no existe algún estudio serológico o bioquímico que haga o excluya el diagnóstico de cáncer de páncreas en etapa temprana.¹¹²

Signos y síntomas

La sospecha de cáncer de páncreas se origina por la presencia de síntomas, siendo las más comunes dolor abdominal (90%), la pérdida de peso (70%) y la ictericia (90%). La presentación de los síntomas depende de la localización del tumor dentro de la glándula así como de la etapa de la enfermedad. La mayoría de los tumores se desarrollan en la cabeza del páncreas y causan colestasis

obstructiva. La combinación de dolor e ictericia se presenta en el 50% de los pacientes con una lesión localmente irresecable. Algunas alteraciones se consideran tempranas como la presencia de esteatorrea y el descontrol glucémico de hecho el CAP debe ser considerado dentro de los diagnósticos diferenciales ante una diabetes de reciente inicio.¹¹³

Marcadores tumorales

Existen varios potenciales marcadores tumorales serológicos, para el diagnóstico, la estratificación, el pronóstico y el monitoreo del CAP. La determinación en suero del CA 19-9 representa el marcador convencional y de mayor uso en CAP; cuando este marcador se utiliza bajo un valor de corte de 40 U/mL, el 74% de los pacientes con CAP tendrán niveles elevados de este. Desafortunadamente la mayoría de estos pacientes, tendrán tumores fuera del lecho pancreático, por lo que es de poca utilidad en tumores pequeños, además este marcador puede no expresarse en alrededor de 10 % de la población, independientemente de la existencia o tamaño tumoral. Por otro lado, los pacientes con tipo de sangre A ó B son incapaces de sintetizar CA 19-9 y tienen niveles indetectables aún en estados avanzados de la enfermedad. Aunque la determinación de CA 19-9 es de utilidad en pacientes con CAP conocido, el uso de este marcador como herramienta de tamizaje ha dado resultados decepcionantes.¹¹⁴

Estudios de imagen

La evaluación de un paciente en quien se sospecha la presencia de CAP se enfoca en la localización, estadiage de la enfermedad, y valoración de la resecabilidad. La tomografía computada multicorte (TAC) con administración intravenosa de material de contraste es el procedimiento de imagen de elección para la evaluación inicial. Esta permite la visualización del tumor primario en relación a la arteria mesenterica superior, la vena mesenterica, la vena porta y la relación del tumor con otros tejidos. La TAC es el método más usado para diagnosticar y evaluar la resecabilidad del CAP; la sensibilidad reportada para este estudio es de 65-90% con una especificidad de 90%, sin embargo la resolución para lesiones pequeñas es baja por lo que resulta poco útil para vigilar pacientes con alto riesgo o hacer el diagnóstico diferencial con pancreatitis crónica.¹¹⁵

Algunos pacientes requieren estudios adicionales. El ultrasonido endoscópico, es útil en pacientes en quienes se sospecha CAP y en los cuales no se identifica la lesión por TAC.¹¹⁶ Además es el estudio de elección para la toma de tejido para estudio histológico. Finalmente, debido a pobre desempeño de las herramientas con las que contamos, el escrutinio generalizado para CAP no se recomienda en la actualidad.

8 ANEXO

PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES BASADAS EN ESTE TRABAJO

9 REFERENCIAS

- ¹ Lau et al. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* (2004) vol. 47 (2) pp. 240-8.
- ² Chan C y col. Neoplasias del Páncreas. *Rev Gastroenterol Mex* (2066) Vol. 71, Supl. 1
- ³ Chu et al. Identification and Screening of Individuals at Increased Risk for Pancreatic Cancer with Emphasis on Known Environmental and Genetic Factors and Hereditary Syndromes. *JOP. J Pancreas (Online)* (2010) vol. 11 (3) pp. 203-212.
- ⁴ Brand. Pancreatic cancer. *Dis Mon* (2004) vol. 50 (10) pp. 545-55
- ⁵ Lowenfels, Maisonneuve. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* (2006) vol. 20 (2) pp. 197-209.
- ⁶ Frelove, Walling. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *American family physician* (2006) vol. 73 (3) pp. 485.
- ⁷ Chan et al. Sweets, sweetened beverages, and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study. *Cancer Causes Control* (2009) vol. 20 (6) pp. 835-846.
- ⁸ Zhang et al. Occupation and Risk of Pancreatic Cancer: A Population-Based Case-Control Study in Iowa. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* (2005) vol. 47 (4) pp. 392-398.
- ⁹ Azar, Lyons. Diabetes, insulin treatment, and cancer risk: what is the evidence?. *F1000 Med Rep* (2009) pp. 1-4.
- ¹⁰ Cowgill, Muscarella. The genetics of pancreatic cancer. *The American Journal of Surgery* (2003) vol. 186 (3) pp. 279-286.
- ¹¹ Decker et al. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* (2010) vol. 6 (4) pp. 246-54.
- ¹² Hruban et al. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* (2007) vol. 36 (4) pp. 831-49.

¹³ Boehm, Nabel. Angiotensin-converting enzyme 2, a new cardiac regulator. *New England Journal of Medicine* (2002) vol. 347 (22) pp. 1795.

¹⁴ Lumbers. Angiotensin and aldosterone. *Regulatory peptides* (1999) vol. 80 (3) pp. 91-100.

¹⁵ Prieto-Carrasquero et al. Collecting Duct Renin: A major player in Angiotensin II-dependent Hypertension. *J Am Soc Hypertens* (2009) vol. 3 (2) pp. 96-104.

¹⁶ Fyhrquist, Saijonmaa. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine* (2008) vol. 264 (3) pp. 224-236.

¹⁷ Andreisa, Neria, Tortorellaa, Aragonab, Rossic, Nussdorfera. Mechanisms transducing the aldosterone secretagogue signal of endothelins in the human adrenal cortex. *Peptides* (2002) vol. 23 pp. 561-566.

¹⁸ András and Hunyady. Control of Aldosterone Secretion: A Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways. *Physiol Rev* (2004) vol. 84 pp.489-539.

¹⁹ Lumbers. Angiotensin and aldosterone. *Regulatory Peptides* (1999) vol. 80 pp. 91-100.

²⁰ Mulrow J. Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regulatory Peptides* (1999) vol. 80 pp. 27-32.

²¹ Dinh et al. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clinical Science* (2001) vol. 100 (5) pp. 481-492.

²² de Gasparo et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* (2000) vol. 52 (3) pp. 415-72.

²³ Atlas. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. (2007) pp. 1-12.

²⁴ Miura et al. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension* (2003) vol. 26 (12) pp. 937.

²⁵ Abdalla. The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. *Journal of Biological Chemistry* (2001) vol. 276 (43) pp. 39721-39726.

²⁶ Wethmar et al. Interactions of ligands at angiotensin II-receptors and imidazoline receptors. *The Japanese Journal of Pharmacology* (2001) vol. 85 (2) pp. 167-174.

-
-
- ²⁷ Cao et al. Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney international* (2000) vol. 58 (6) pp. 2437-2451.
- ²⁸ Siragy. Angiotensin II receptor blockers: review of the binding characteristics. *The American journal of cardiology* (1999) vol. 84 (10) pp. 3-8.
- ²⁹ Thomas, Qian. Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2003) vol. 14 (3) pp. 130-136.
- ³⁰ Thomas, Mendelsohn. Angiotensin receptors: form and function and distribution *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 774-779
- ³¹ George et al. The renin–angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* (2010) vol. 10 (11) pp. 745-759.
- ³² Moreno M. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clinics in Liver Disease* (2008) vol. 12 (4) pp. 825-852.
- ³³ Brewster, Perazella. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *The American journal of medicine* (2004) vol. 116 (4) pp. 263-272.
- ³⁴ Gonzalez et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Med Clin N Am* (2004) vol. 88 (11) pp. 83-97.
- ³⁵ Leung. Novel roles of a local angiotensin-generating system in the carotid body. *The Journal of Physiology* (2006) vol. 575 (1) pp. 4-4.
- ³⁶ Miyazaki y Takai. Tissue Angiotensin II Generating System by Angiotensin-Converting Enzyme and Chymase. *J Pharmacol Sci* (2006) vol. 100 (5) pp. 391-397.
- ³⁷ Danser. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 759-768.
- ³⁸ Sun y Weber. RAS and connective tissue in the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 919-931.
- ³⁹ Re. Tissue renin angiotensin systems. *The Medical clinics of North America* (2004) vol. 88 (1).
- ⁴⁰ Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol.* (1994) vol. 102 (3) pp. 252-61.
-
-

-
-
- ⁴¹ Goyal R, Goyal D, Leitzke A, Gheorghe CP, Longo LD. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. *Reprod Sci.* (2010) vol. 17(3) pp 227-38.
- ⁴² Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep.* (2009) vol.11(2) pp 104-10.
- ⁴³ Atanassova N, Lakova E, Bratchkova Y, Krasteva G, Donchev M. Expression of testicular angiotensin-converting enzyme in adult spontaneously hypertensive rats. *Folia Histochem Cytobiol.* (2009) vol. 47(1) pp 117-22.
- ⁴⁴ Tahmasebi M, Barker S, Puddefoot JR, Vinson GP. Localization of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. *Br J Cancer* (2006) vol. 3 (95)1 pp 67-74.
- ⁴⁵ Vaajanen A, Vapaatalo H. Local Ocular Renin-Angiotensin System A Target for Glaucoma Therapy?. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* (2011) [ahead of print].
- ⁴⁶ Leung. Local renin-angiotensin system in the pancreas: the significance of changes by chronic hypoxia and acute pancreatitis. *JOP. J Pancreas (Online)* (2001) vol. 2 (1) pp. 3-8.
- ⁴⁷ Chan et al. Activation of local renin-angiotensin system by chronic hypoxia in rat pancreas. *Mol Cell Endocrinol* (2000) vol. 160 (1-2) pp. 107-14.
- ⁴⁸ Ip et al. The recovery of some components of the renin angiotensin system in the rat pancreas after chronic exposure to hypoxic condition. *J Mol Endocrinol* (2003) vol. 31 (3) pp. 563-71.
- ⁴⁹ Ip et al. Changes of angiotensin-converting enzyme activity in the pancreas of chronic hypoxia and acute pancreatitis. *The international journal of biochemistry & cell biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 944-54.
- ⁵⁰ Kershaw. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2004) vol. 89 (6) pp. 2548-2556.
- ⁵¹ Bader. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* (2010) vol. 50 pp. 439-465.
- ⁵² Ahmed et al. Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity
-
-

angiotensin II binding site. *Journal of Clinical Investigation* (1995) vol. 96 (2) pp. 848.

⁵³ Dinh et al. Identification, distribution, and expression of angiotensin II receptors in the normal human prostate and benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology* (2001) vol. 142 (3) pp. 1349-56.

⁵⁴ Haznedaroglu y Öztürk. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 867-880.

⁵⁵ Engeli et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?. *The international journal of biochemistry & cell biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 807-825.

⁵⁶ Jones y Woods. Skeletal muscle RAS and exercise performance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 855-866.

⁵⁷ Sugiura N, Hagiwara H, Hirose S. Molecular cloning of porcine soluble angiotensin-binding Prot. *J Biol Chem* (1992) vol. (267) pp18067-18072.

⁵⁸ Tang SS, Rogg H, Schumacher R, Dzau VJ. Characterization of nuclear angiotensin II binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology* (1992) vol. (131) pp 374-380.

⁵⁹ Booz GW, Conrad KM, Hess AL, Singer HA, Baker KM. Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* (1992) vol. (130) pp 3641-3649.

⁶⁰ Erdmann B, Fuxe K, Ganten D. Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Hypertension* (1996) vol. 28 pp 818-824.

⁶¹ Eggena P, Zhu JH, Clegg K, Barrett JD. Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA. *Hypertension* (1993) vol. 22 pp 496-501.

⁶² Brailoiu E, Filipeanu CM, Tica A, Toma CP, de Zeeuw D, Nelemans SA. Contractile effects by intracellular angiotensin II via receptors with a distinct pharmacological profile in rat aorta. *Br J Pharmacol* (1999) vol. 126 pp 1133-1138.

⁶³ Cook JL, Zhang Z, Re RE. In vitro Evidence for an Intracellular site of angiotensin action. *Cir Res* (2001) vol. 89 pp. 1138- 1146.

⁶⁴ Conchon S, Monnot C, Teursch B, Corvol P, Clauser E. Internalization of the rat AT1a and AT1b receptors: pharmacological and functional requirements. *FEBS Lett.* (1994) vol. 349 pp. 365-370.

⁶⁵ Chen R, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Thielen TE, Iijima Y, Huang C, Raymond JR, Ullian ME, Paul RV. A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein. *Am J Physiol Renal Physiol* (2000) vol. 279 pp F440-F448.

⁶⁶ Leung y Carlsson. Tissue renin-angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas. *J Mol Endocrinol* (2001) vol. 26 (3) pp. 155.

⁶⁷ Leung. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *The Journal of Physiology* (2007) vol. 580 (1) pp. 31-37.

⁶⁸ Chappell et al. The renin-angiotensin system and the exocrine pancreas. *JOP. J Pancreas (Online)* (2001) vol. 2 (1) pp. 33-39.

⁶⁹ Leung y Chappell. A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. *The international journal of biochemistry & cell biology* (2003) vol. 35 (6) pp. 838-46.

⁷⁰ Tahmasebi et al. The tissue renin-angiotensin system in human pancreas. *Journal of endocrinology* (1999) vol. 161 (2) pp. 317.

⁷¹ Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* (1998) vol. 18 (9123) pp. 179-84.

⁷² Arafat et al. Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* (2007) vol. 204 (5) pp. 996-1005; discussion 1005-6.

⁷³ Rivera et al. AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *Br J Cancer* (2001) vol. 85 (9) pp. 1396.

⁷⁴ Reddy MK, Baskaran K, Molteni A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme modulate mitosis and gene expression in pancreatic cancer cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* (1995) vol. 210 (3) pp. 221-6.

⁷⁵ Fujimoto et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS letters* (2001) vol. 495 (3) pp. 197-200.

-
-
- ⁷⁶ Omary et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *Journal of Clinical Investigation* (2007) vol. 117 (1) pp. 50-59.
- ⁷⁷ Hama et al. Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation* 1. *Biochemical and biophysical research communications* (2004) vol. 315 (4) pp. 905-911.
- ⁷⁸ Ager et al. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* (2008) vol. 29 (9) pp. 1675-1684.
- ⁷⁹ Ikushima, Miyazono. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* (2010) vol. 10 (6) pp. 415-424.
- ⁸⁰ Hidalgo, Maitra. The hedgehog pathway and pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine* (2009) vol. 361 (21) pp. 2094-2096.
- ⁸¹ Holloway et al. Selective Blockade of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 With an Antibody Against Tumor-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Controls the Growth of Human Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts. *Ann Surg Oncol* (2006) vol. 13 (8) pp. 1145-1155.
- ⁸² Anandanadesan et al. Angiotensin II Induces Vascular Endothelial Growth Factor in Pancreatic Cancer Cells Through an Angiotensin II Type 1 Receptor and ERK1/2 Signaling. *J Gastrointest Surg* (2008) vol. 12 (1) pp. 57-66.
- ⁸³ Burtness. Her signaling in pancreatic cancer. *Expert Opin Biol Ther* (2007) vol. 7 (6) pp. 823-9.
- ⁸⁴ Maehara, Matsumot, Kuba, Mizumoto, Tanaka M and Nakamura T. NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*. (2001) vol. 84(6) pp. 864-873.
- ⁸⁵ Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* (1977) vol. 58 (2) pp 209-14.
- ⁸⁶ Domagk et al. Expression analysis of pancreatic cancer cell lines reveals association of enhanced gene transcription and genomic amplifications at the 8q22.1 and 8q24.22 loci. *Oncol Rep* (2007) vol. 17 (2) pp. 399-407.
- ⁸⁷ Szucs et al. Vectorial bicarbonate transport by Capan-1 cells: a model for human pancreatic ductal secretion. *Cell Physiol Biochem* (2006) vol. 18 (4) pp. 253-64.
-
-

-
-
- ⁸⁸ Cox BE, Word RA, Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* (1996) vol. 81(1) pp 49-58.
- ⁸⁹ Leung PS, Tsai SJ, Wallukat G, Leung TN, Lau TK. The upregulation of angiotensin II receptor AT(1) in human preeclamptic placenta. *Mol Cell Endocrinol.* (2001) vol. 26 (84) pp 95-102.
- ⁹⁰ Stuzmann M, Radziwill R, Komischke K, Klett C and Hackenthal E. Hormonal and pharmacological alteration of angiotensinogen secretion from rat hepatocytes *Molecular Cell Research Volume* (1986) vol. 886, pp 48-56.
- ⁹¹ Holloway SE, Beck AW, Shivakumar L, Shih J, Fleming JB, Brekken RA. Selective blockade of vascular endothelial growth factor receptor 2 with an antibody against tumor-derived vascular endothelial growth factor controls the growth of human pancreatic adenocarcinoma xenografts. *Ann Surg Oncol.* (2006) vol. 13 (8) pp. 1145-55.
- ⁹² Kiron MA, Soffer RL. Purification and properties of a soluble angiotensin II-binding protein from rabbit liver. *J Biol Chem.* (1989) vol. 5 (7) pp. 4138-42.
- ⁹³ Booz GW, Conrad KM, Hess AL, Singer HA, Baker KM. Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* (1992) vol. 130(6) pp. 3641-9.
- ⁹⁴ Kenneth M., Baker, Mitchell, Chernin, Taylor Schreiber, et al. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II induced cardiac hypertrophy. *Regulatory Peptides* (2004) vol. 120 pp. 5-13.
- ⁹⁵ Steckelings UM, Artuc M, Paul M, Stoll M, Henz BM. Angiotensin II stimulates proliferation of primary human keratinocytes via a non-AT1, non-AT2 angiotensin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* (1996) vol. 4 (1) pp. 329-33.
- ⁹⁶ Filipeanu CM, Henning RH, de Zeeuw D, Nelemans A. Intracellular Angiotensin II and cell growth of vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* (2001) vol. 132(7) pp.1590-6.
- ⁹⁷ Filipeanu CM, Brailoiu E, Kok JW, Henning RH, De Zeeuw D, Nelemans SA. Intracellular angiotensin II elicits Ca²⁺ increases in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* (2001) vol. 18 (1) pp 9-18.
- ⁹⁸ Karamyan VT, Arsenault J, Escher E, Speth RC. Preliminary biochemical characterization of the novel, non-AT1, non-AT2 angiotensin binding site from the rat brain. *Endocrine.* (2010) vol. 37(3) pp 442-8.
-
-

⁹⁹ Le Noble FA, Schreurs NH, van Straaten HW, Slaaf DW, Smits JF, Rogg H, Struijker-Boudier HA. Evidence for a novel angiotensin II receptor involved in angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Am J Physiol.* (1993) vol. 264(2) pp. R460-5.

¹⁰⁰ Tuveson et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* (2004) vol. 5 (4) pp. 375-87

¹⁰¹ Ruggeri et al. Molecular pathology of primary and metastatic ductal pancreatic lesions. *Cancer* (1997) vol. 79 (4) pp. 700-716.

¹⁰² MacKenzie. Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *The Lancet Oncology* (2004) vol. 5 (9) pp. 541-549.

¹⁰³ Burris, Rocha-Lima. New Therapeutic Directions for Advanced Pancreatic Cancer: Targeting the Epidermal Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Pathways. *The Oncologist* (2008) vol. 13 (3) pp. 289-298.

¹⁰⁴ Hustinx et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* (2005) vol. 18 (7) pp. 959-963.

¹⁰⁵ Bell. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J. Pathol.* (2010) vol. 220(2) pp. 231-43.

¹⁰⁶ Cascinu et al. Pancreatic cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* (2009) vol. 20 Suppl 4 pp. 37-40.

¹⁰⁷ Toms Augustin. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm: A Clinicopathologic Review. *Surgical Clinics of NA* (2010) vol. 90 (2) pp. 377-398.

¹⁰⁸ Federle y McGrath. Cystic neoplasms of the pancreas. *Gastroenterol Clin North Am* (2007) vol. 36 (2) pp. 365-76.

¹⁰⁹ Sato et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Research* (2003) vol. 63 (13) pp. 3735.

¹¹⁰ Jones et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* (2008) vol. 321 (5897) pp. 1801-6.

¹¹¹ Hustinx et al. Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther* (2004) vol. 3 (12) pp. 1254-61.

¹¹² Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* (2008) vol 3 pp. 157-88.

¹¹³ Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* (2004) vol. 363 pp.1049-57.

¹¹⁴ Berger AC, Garcia M Jr, Hoffman JP, et al. Postresection CA 19-9 predicts overall survival in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant chemoradiation: a prospective validation by RTOG 9704. *J Clin Oncol* (2008) vol. 26 pp.5918-22.

¹¹⁵ Karmazanovsky G, Fedorov V, Kubyshkin V, Kotchatkov A. Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability. *Abdom Imaging* (2005) vol. 30 pp. 488-500.

¹¹⁶ Freelove R, Walling A. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* (2006) vol. 73 pp. 485-92.