



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Evaluación de la Vía de Rank/Rankl en la Regulación  
de las Células Troncales de Cáncer de Páncreas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A :**

**MARÍA DEL CARMEN RICO GALINDO**

**ASESORES :**

**DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN**

**DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Evaluación de la Vía de Rank/RankI en la Regulación de las Células Troncales de Cáncer de Páncreas.

Que presenta la pasante: María del Carmen Rico Galindo

Con número de cuenta: 311596010 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Mayo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mis papás por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por todo su cariño, paciencia y por enseñarme a ser una persona perseverante y perseguir mis sueños. Sin ustedes esto no sería posible. Los amo mucho.

A mis hermanos por todo el apoyo, consejos, risas y toda la ayuda que me han brindado a lo largo de estos 24 años, sin ustedes la vida no sería tan divertida. De manera especial quisiera agradecer a mi hermana Tere cuya presencia en mi vida ha sido muy importante, gracias por todo tu cariño y amor.

A mi Facultad por todas las enseñanzas y conocimientos brindados a lo largo de la carrera, agradezco a mi amiga Monse por brindarme su amistad y compartir conmigo muy buenos momentos, eres genial Monse.

Agradezco a mi tutora la Dra. Karla Vázquez Santillán por todo el apoyo, paciencia, oportunidades y conocimientos que me ha brindado a lo largo de la realización de este trabajo, gracias por la amistad que me has dado y por todos esos momentos divertidos en el laboratorio. Muchísimas gracias Karla.

Agradezco a la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por aceptarme como parte de su equipo de investigación y por apoyarme con la beca "Ayudante de Investigador SNI III". Muchas gracias Dra.

A mis compañeros de laboratorio, Ale, Jorge, Víctor, Rosario y Marce por todos los momentos divertidos que hemos pasado, sin ustedes el trabajo en el laboratorio no sería tan padre. Los quiero.

Por último, quiero agradecer a César por todo el amor y el cariño que siempre me ha dado, gracias por siempre estar pendiente de mí, de apoyarme, darme consejo en los momentos más difíciles y por siempre hacerme sonreír. Sin ti mi vida no sería tan feliz. Te amo mucho.

## CONTENIDO

I. ABREVIATURAS IMPORTANTES .....	2
II. RESUMEN .....	4
III. INTRODUCCIÓN .....	6
III.I DEFINICIÓN DE CÁNCER .....	6
III.II DEFINICIÓN DE CÁNCER DE PÁNCREAS .....	10
III.III CÉLULAS TRONCALES DEL CÁNCER .....	13
III.IV VÍA DE SEÑALIZACION NF-kB .....	17
III.V VÍA DE RANK/RANKL/OPG .....	20
IV. JUSTIFICACIÓN .....	23
V. HIPÓTESIS .....	23
VI. OBJETIVO GENERAL .....	24
VII. OBJETIVOS PARTICULARES .....	24
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Cultivo Celular .....	24
Extracción de RNA .....	25
RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR) .....	25
Citometría de Flujo .....	26
Generación de línea estable BXPC-3/sh-RANK .....	27
Ensayos de Migración .....	28
Ensayos de Proliferación .....	28
Análisis Bioinformáticos .....	28
Análisis Estadístico .....	29
IX. RESULTADOS .....	30
X. DISCUSIÓN .....	41
XI. CONCLUSIÓN .....	45
XII. REFERENCIAS .....	47

## **I. ABREVIATURAS IMPORTANTES**

<b>ALDH</b>	Aldehído Deshidrogenasa
<b>CD24</b>	Grupo de diferenciación 24
<b>CD44</b>	Grupo de diferenciación 44
<b>CTC</b>	Células Troncales del Cáncer
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EMT</b>	Transición Epitelio Mesénquima
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>NF-kB</b>	Factor Nuclear kB
<b>OCT4</b>	Factor de transcripción de unión a octámero 4
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
<b>RANK</b>	Receptor Activador del Factor Nuclear kB
<b>RANKL</b>	Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear kB
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>SFB</b>	Suero fetal Bovino
<b>TM</b>	Temperatura de Fusión

<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>CDKN2A</b>	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
<b>AML</b>	Leucemia Mieloide Aguda

## II. RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de páncreas representa un problema de salud importante debido a su baja sobrevida y su alta letalidad. Adicionalmente, el cáncer de páncreas es caracterizado por una alta tolerancia a los tratamientos convencionales como quimioterapia, radioterapia y terapia molecular dirigida. Por lo que resulta importante la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que puedan mejorar las condiciones de los pacientes y la sobrevida en general.

Estudios recientes han demostrado la existencia de una subpoblación de células conocidas como células troncales del cáncer, las cuales tienen características similares a las células troncales adultas como capacidad de autorrenovación, la habilidad de diferenciarse y una alta capacidad clonogénica. Adicionalmente a estas células troncales del cáncer se le han atribuido capacidades de iniciación, progresión, recurrencia y resistencia tumoral. Esta subpoblación tumoral es regulada mediante diferentes vías de señalización, una de las más importantes es la vía de NF- $\kappa$ B. La triada molecular que involucra al receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK), el ligando de RANK (RANKL) y osteoprotegerina (OPG) es un sistema que se ha visto implicado en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, que se encuentra acoplada a la vía de NF- $\kappa$ B. Se ha determinado que la inhibición de la vía de RANK reduce drásticamente la población troncal del cáncer mediante la activación de mecanismos de diferenciación celular. Por esta razón resulta importante investigar el papel de la vía de RANK en cáncer de páncreas. **Objetivo:** El presente trabajo analiza la expresión de la vía de RANK en 3 líneas celulares de adenocarcinoma ductal de páncreas y evalúa el efecto de la inhibición de RANK en la población troncal. **Metodología:** Para caracterizar la vía de RANK en cáncer de páncreas se determinó la expresión de RANK/RANKL/OPG en 3 líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático mediante PCR en tiempo real.



Para caracterizar la población troncal en cada línea celular se determinó el número de CTC (CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>) y la actividad de ALDH de las 3 líneas celulares mediante citometría de flujo.

Se analizó la expresión de RANK/RANKL/OPG en diferentes tipos de cáncer mediante un análisis bioinformático en la plataforma cBioPortal. La influencia de la expresión de RANK/RANKL/OPG en la supervivencia de pacientes se determinó mediante curvas de Kaplan-Meier. Para evaluar el efecto de la inhibición de RANK se determinaron los factores de pluripotencia (ALDH1A3, ALDH8A1, NANOG, OCT4 y SOX2) mediante PCR en tiempo real, se llevaron a cabo ensayos de migración con cámaras Transwell, ensayos de proliferación con el método MTS y determinación de la población troncal mediante citometría del flujo. **Resultados:** Se determinó que BXPC-3 es la línea celular con mayor expresión de RANK y menor expresión de OPG. Se estableció que BXPC-3 es la línea celular con mayor número de celular troncales CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup> y que HPAF-II es la línea celular con mayor actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). El adenocarcinoma pancreático posee una mayor expresión de RANK y RANKL en comparación con el resto de los tipos de cáncer, así mismo, una mayor expresión de estas moléculas conlleva menor probabilidad de supervivencia y RANK/RANKL se encuentran sobre expresados en tejido tumoral en comparación con tejido normal. La inhibición de RANK reduce la capacidad de migración, la proliferación celular, así como el número de CTC CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup> en células BXPC-3. Sin embargo, la inhibición de RANK provocó un aumento en la expresión de una de las isoformas de la enzima ALDH. **Conclusiones:** El presente trabajo demuestra la participación que tiene la vía de RANK en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas, así como su valor pronóstico en datos de pacientes. Por otra parte, demuestra el papel de esta vía como posible blanco terapéutico dirigido contra la población troncal en cáncer de páncreas.

### III. INTRODUCCIÓN

#### III.I DEFINICIÓN DE CÁNCER

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por un proceso de crecimiento y diseminación celular incontrolada. Esta enfermedad puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. [1]

El cáncer posee una serie de propiedades presentes en la mayoría de las neoplasias denominadas “*Hallmarks del Cáncer*” descritos por Douglas Hanahan y Robert Weinberg. Estas constituyen capacidades biológicas que se van adquiriendo durante el desarrollo de los tumores. [2]

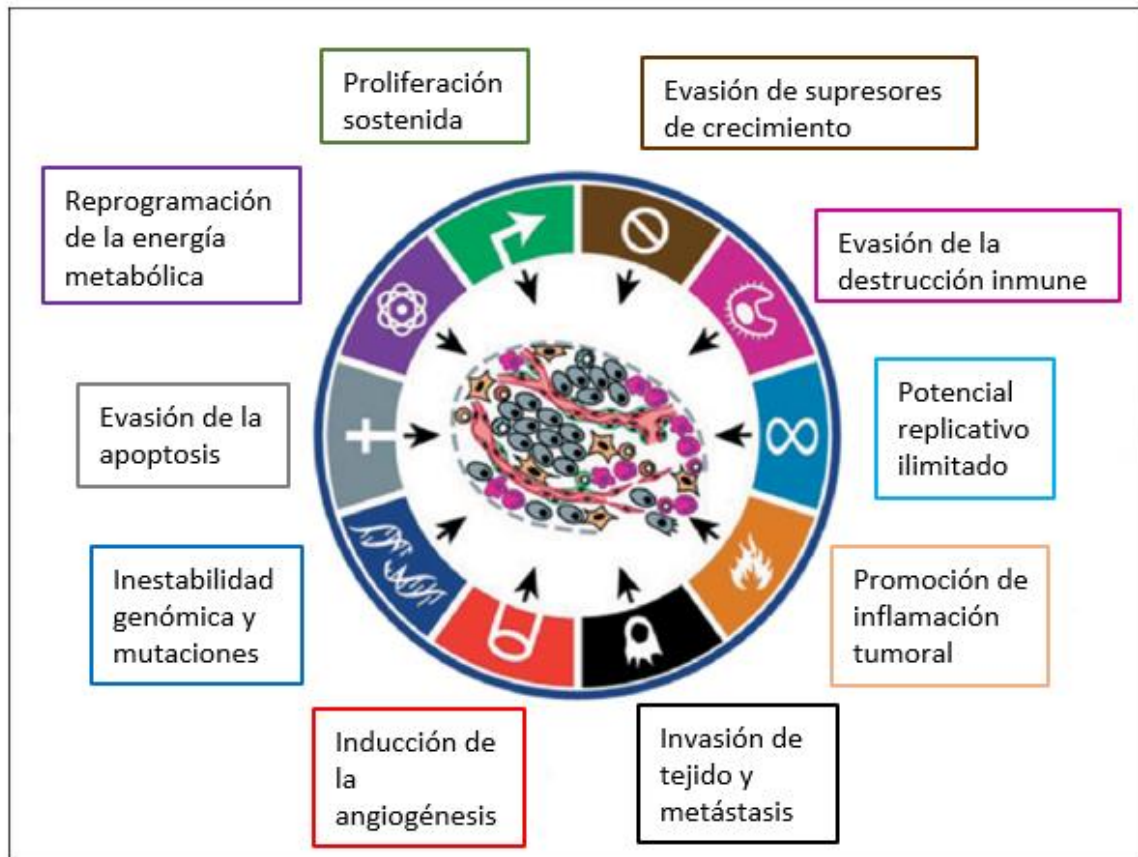
Ellos proponen 10 *Hallmarks* o características distintivas, las cuales son:

- Proliferación Sostenida: En el tejido normal la proliferación celular es altamente regulada y sólo se lleva a cabo cuando el tejido lo requiere, manteniendo así la homeostasis de éste. Sin embargo, las células cancerosas son capaces de alterar estos mecanismos obteniendo de distintas formas factores de crecimiento que le permiten proliferar de manera irregular y descontrolada. [3]
- Evasión de supresores de crecimiento: Los tejidos poseen factores capaces de reprimir la proliferación y mantener en un estado quiescente ( $G_0$ ) o en un estado post-mitótico a las células normales del tejido, manteniendo así la homeostasis de este. Sin embargo, cuando las células se vuelven insensibles a estos factores de inhibición permanecen en un estado de alta proliferación alterando así la función del tejido. [3]

- Evasión de la apoptosis: La capacidad que tienen las células de aumentar su número no solo depende de la proliferación, sino que también participa el desgaste celular, el cual es determinado por la muerte celular programada (apoptosis). Las células cancerosas son capaces de burlar la apoptosis mediante daño en los genes sensores que desencadenan este proceso. [3]
- Potencial replicativo ilimitado: De acuerdo con los trabajos realizados por Hayflick las células poseen la capacidad de dividirse un número determinado de veces que va de las 60-70 divisiones, una vez pasado este número, las células entran en un estado de crisis caracterizado por desarreglos cariotípicos como aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales que llevan a una muerte celular masiva. Las células cancerosas han desarrollado la capacidad de superar el límite de Hayflick llegando a inmortalizarse. [3],[4]
- Inducción de la angiogénesis: El oxígeno y los nutrientes proporcionados por el sistema vascular son indispensables para la supervivencia celular. Es por eso que las células cancerígenas en potencial desarrollo deben asegurar el suministro de esos nutrientes para su crecimiento y desarrollo, por lo que han adquirido la capacidad de aumentar la expresión génica de factores inductores de angiogénesis como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). [3]
- Invasión de tejido y metástasis: Una de las principales causas de muerte entre los pacientes con cáncer es la metástasis, la cual es referida como la invasión de células cancerosas a otros tejidos mediante el desprendimiento de células del tumor primario que forman nuevas colonias donde la competencia por los nutrientes es menor. [3]
- Inestabilidad genómica y mutaciones: La adquisición de los *hallmarks* antes mencionados se deben principalmente a la acumulación de mutaciones en el

material genético de las células cancerígenas. Estos cambios en el genoma les confieren a las células tumorales una posición como células dominantes en el tejido. [3]

- Reprogramación de la energía metabólica: La proliferación crónica y descontrolada que representa la esencia de las enfermedades neoplásicas no solo involucra un descontrol en la proliferación celular, sino que también requiere un ajuste en el metabolismo celular para proporcionar la energía suficiente para la división celular. Por lo que las células tumorales han modificado su metabolismo para llevar a cabo la glucólisis anaerobia aun en presencia de oxígeno, con lo cual son capaces de sobrevivir a condiciones de hipoxia. [2]
- Evasión de la destrucción inmune: Muchos estudios se han realizado para tratar de comprender el papel del sistema inmune en el desarrollo del cáncer, llegando a establecer que el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar a las células cancerosas incipientes. Sin embargo, una pequeña fracción de células cancerígenas logra burlar al sistema inmune dando origen al cáncer. [2]
- Promoción de inflamación tumoral: Recientes estudios han evidenciado la presencia de células del sistema inmune infiltrando el tejido adyacente, tanto de la respuesta innata como de la respuesta adquirida, las cuales se creían que actuaban como primera respuesta contra la formación del tumor. Sin embargo, se ha visto que la constante inflamación contribuye al microambiente tumoral proporcionando moléculas como factores de crecimiento, señales de supervivencia, factores pro-angiogénicos, enzimas que modifican la matriz extracelular y señales inductoras de Transición Epitelio Mesénquima (EMT) permitiendo el desarrollo tumoral. [2]



**Figura 1.** Los *Hallmarks* del cáncer son un conjunto de características que adquieren las células cancerosas durante la progresión de la enfermedad y les permiten proliferar y sobrevivir. Imagen modificada obtenida de (Hanahan, D. Weinberg, R: 2011) [2]

Actualmente el cáncer representa un problema de salud muy grande a nivel mundial. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estima que uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres en todo el mundo desarrollarán cáncer a lo largo de su vida, y que uno de cada ocho hombres y una de cada once mujeres morirá por esta enfermedad. Comparado con las últimas estadísticas mundiales realizadas en 2018 el cáncer actualmente ha aumentado a 18,1 millones de casos y 9,6 millones de muertes por esta enfermedad. Un número de factores parecen estar impulsando este aumento, en particular una población global en creciente envejecimiento y un aumento en la exposición a factores de riesgo de cáncer relacionados con el desarrollo social y económico. [5]

En México el cáncer es la tercera causa de muerte después de enfermedades cardíacas y diabetes. En 2018 se reportaron 190 667 nuevos casos, alcanzando una tasa de mortalidad del 61.1. Los tipos de cáncer con mayor número de muertes en el país son: pulmón, cáncer gástrico, hígado, próstata, cáncer de mama, y cáncer cervicouterino. [5],[6]

### III.II DEFINICIÓN DE CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas se ha convertido en una de las enfermedades más fatales en los últimos años. El pronóstico de supervivencia a 5 años estimado por el Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) es del 4 %, siendo el más bajo de todos los tipos de cáncer. [7] La mayoría de los casos diagnosticados corresponden a adenocarcinomas ductales (95%), seguidos de tumores del tejido exocrino, y una pequeña proporción de neoplasias provenientes de las células endocrinas. [8] Se estima que este año se producirán 41,780 muertes (21,450 hombres y 20,330 mujeres) a causa de esta enfermedad, si las tasas de incidencia y mortalidad no mejoran se estima que será el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia en la siguiente década. [9] A nivel mundial el cáncer de páncreas es el noveno tipo de cáncer más frecuente en mujeres y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en hombres y mujeres [10], en México, ocupa el quinto lugar en frecuencia de neoplasias malignas en hombre y el séptimo en mujeres. [8]

El cáncer de páncreas está asociado con un pronóstico muy bajo debido a varias razones. Usualmente es diagnosticado en estadios muy avanzados, esto debido a que generalmente está relacionado con síntomas no específicos o en algunos casos es asintomático, la falta de marcadores específicos de tumor y la dificultad de detectar anomalías tempranas en el órgano por imagenología debido a su posición anatómica. [11] Adicionalmente, el cáncer de páncreas es caracterizado por una alta tolerancia a los tratamientos convencionales como quimioterapia, radioterapia y terapia molecular dirigida. Finalmente, este tipo de

cáncer posee múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas aunado a un complejo microambiente tumoral. [12]

La edad es el principal determinante del cáncer de páncreas. La mayoría de los pacientes son diagnosticados a más de 50 años, con una incidencia máxima en la séptima y octava década de vida. En términos de factores de riesgo prevenibles, el tabaquismo es el más importante y el más estudiado. Los fumadores tienen de 2-3 veces más probabilidad de desarrollar cáncer de páncreas que los no fumadores. La proporción de casos atribuibles al consumo de tabaco se ha estimado en 15 a 30% en varias poblaciones. El uso de productos de tabaco sin humo también puede aumentar el riesgo. [13]

La obesidad y la baja actividad física también están vinculadas al cáncer de páncreas. Algunos factores nutricionales y dietéticos, como el alto consumo de grasas (saturadas), el bajo consumo de verduras y frutas y el consumo de carnes rojas procesadas, también están asociados a este tipo de cáncer. [14]

El consumo excesivo de alcohol podría estar relacionado con la pancreatitis crónica, que aumenta el riesgo de cáncer pancreático en más de diez veces, con poca diferencia en el riesgo atribuible entre las formas alcohólicas y no alcohólicas de pancreatitis. La diabetes mellitus es un factor de riesgo para la enfermedad y una consecuencia del cáncer de páncreas en etapa temprana; la diabetes mellitus a largo plazo duplica aproximadamente el riesgo del cáncer pancreático. La diabetes mellitus también puede ser causada por el cáncer pancreático (diabetes mellitus tipo 3c) y, en consecuencia, la diabetes mellitus de inicio reciente puede ser la primera pista para el diagnóstico del cáncer pancreático en pacientes ancianos. [15]

El cáncer es una enfermedad genética causada por la acumulación de mutaciones somáticas en oncogenes y en genes supresores de tumor. [10] Existen 4 genes que se encuentran mutados en cáncer de páncreas (un oncogén y tres genes supresores de tumor), los cuales lideran la progresión de la enfermedad. KRAS, el cual codifica una pequeña GTPasa que media la señalización río abajo de diferentes receptores de factores de crecimiento, se encuentra con alteraciones somáticas en más del 90% de los tumores. [16] CDKN2A, el cual codifica un regulador esencial del ciclo celular, es el supresor de tumor más frecuentemente alterado, con pérdida de función en más del 90% de los adenocarcinomas ductales. [16] Mutaciones somáticas en el gen supresor de tumor TP53 también son frecuentes, la proteína codificada por este gen tiene un papel clave en la respuesta al estrés celular y está mutado en una gran variedad de tipos tumorales. [16] El gen supresor de tumor SMAD4 lleva a cabo la señalización río abajo del receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), el cual se encuentra inactivo en un 50% de los tumores. [16]

El cáncer de páncreas presenta cascadas de señalización autócrinas y parácrinas aberrantes, las cuales promueven la proliferación, migración, invasión y metástasis de células cancerosas. Algunas moléculas tales como, el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFS) y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y sus respectivos receptores activan múltiples cascadas de señalización que promueven la capacidad de migración e invasión. Estas vías de señalización son activadas en conjunto con señales anti apoptóticas y de supervivencia como la vía de AKT, STAT3 Y NF-kB. [17] Genes como WNT, SHH y NOTCH, que normalmente se encuentran activados en el proceso embrionario, son activados en algunos tipos de cáncer de páncreas. [18]



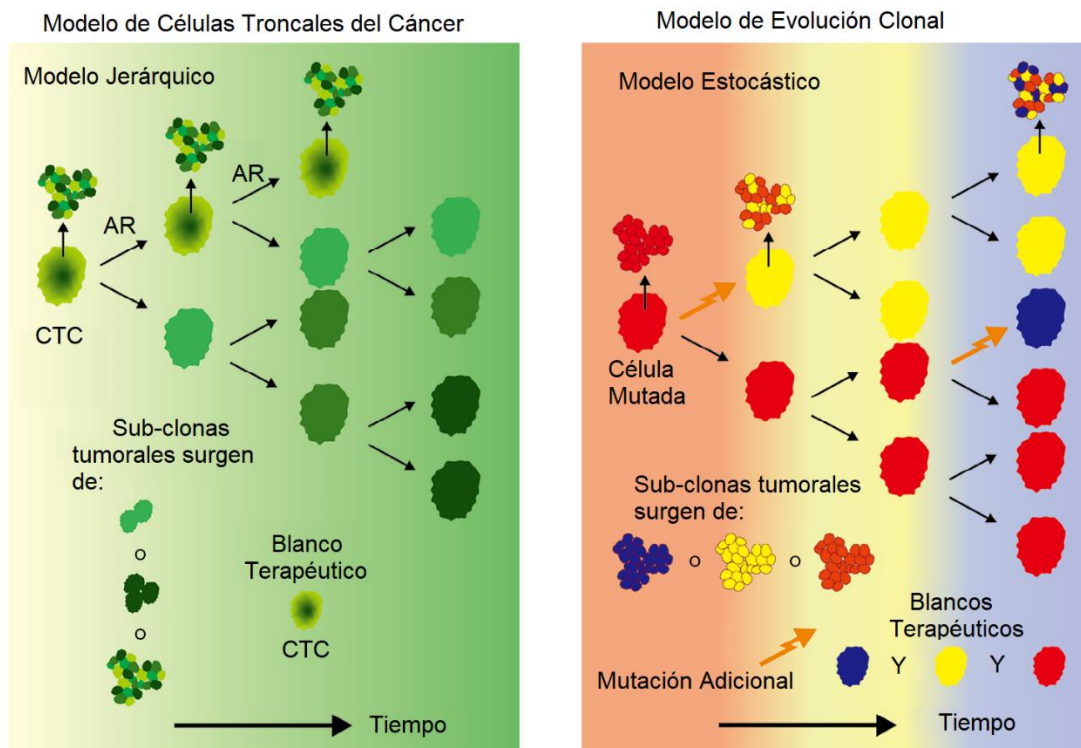
La señalización en el cáncer de páncreas es compleja, con múltiples nodos y entrecruzamientos aberrantes en las vías de señalización. Uno de estos nodos aberrantes se caracteriza por una mayor actividad de HGFR y EGFR, los cuales incrementan la expresión de neuropilina 1, CD44 e integrina 1 $\beta$ , que se agrava con la capacidad que tiene HGFR de formar heterodímeros con EGRF. [19] Estas alteraciones ocurren al estar mutados los genes de KRAS y CDKN2A. De igual forma el cáncer de páncreas posee anomalías metabólicas y una insensibilidad a las vías inhibitorias del crecimiento. La pérdida de restricciones de crecimiento negativas se ejemplifica mejor mediante la señalización aberrante de TGF $\beta$ , que se produce como consecuencia del aumento de la expresión de las isoformas de TGF $\beta$ . [20] Aunque TGF $\beta$  es un supresor de tumores fisiológico, promueve la progresión tumoral en el cáncer de páncreas y muchos otros tumores sólidos al ejercer efectos parácrinos dentro del microambiente tumoral que conducen a un mayor crecimiento y metástasis. TGF $\beta$  también puede inducir directamente la proliferación de células de cáncer pancreático por activación de la señalización no canónica a través de la fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), fosforilación de la proteína quinasa Src (SRC), AKT y al regular la expresión de WNT7B a través de mecanismos canónicos dependientes de SMAD4. [20]

### III.III CÉLULAS TRONCALES DEL CÁNCER

Una de las características que definen a los diferentes tumores es la heterogeneidad fenotípica y funcional que poseen. Existen muchos factores que contribuyen a esta heterogeneidad entre estos se encuentran las mutaciones genéticas, los cambios epigenéticos, interacciones con el microambiente y la presencia o ausencia de una jerarquía celular. [21] Los mecanismos celulares que regulan la heterogeneidad en el tumor son de gran interés en el campo de la biología del cáncer. Actualmente existen dos modelos que

intentan explicar la heterogeneidad tumoral, el modelo evolutivo clonal y el modelo de células troncales del cáncer. [22]

El modelo de evolución clonal postula que algunas células van adquiriendo una serie de mutaciones genéticas y epigenéticas, si dichos cambios confieren una ventaja selectiva, permitirán que las clonas individuales de las células cancerosas compitan con otras clonas. Adicionalmente este modelo plantea que cualquier célula tumoral tiene capacidad tumorigénica. [23] Por otra parte, se encuentra el modelo de células troncales del cáncer, el cual propone la existencia de una subpoblación tumoral con características similares a las células troncales adultas, potencial de diferenciación y la capacidad de autorrenovarse (por división simétrica o asimétrica). [21],[24]



**Figura 2.** Modelos de crecimiento tumoral. El modelo de células troncales de cáncer sugiere la existencia de una jerarquía celular en la cual una subpoblación tumoral es capaz de dar lugar al tumor, mantenerlo y formar las diferentes poblaciones tumorales. El modelo de evolución clonal plantea que el tumor es el resultado de la acumulación de mutaciones en una célula. No existe una jerarquía en este modelo y las subpoblaciones resultantes tiene diferente potencial proliferativo. Imagen obtenida y modificada de (Weiskirchen, R: 2016) [24]

Las células troncales del cáncer (CTC) son una subpoblación pequeña del tumor con la capacidad de auto renovarse, la habilidad de “diferenciarse” en subtipos celulares dando lugar a la heterogeneidad propia del tumor y de tener una alta capacidad proliferativa. [25] De igual forma, estas células son capaces de regenerar un tumor al ser trasplantadas en modelos biológicos y poseen un papel importante en la metástasis. [26] Adicionalmente se ha observado que las CTC son resistentes a los tratamientos antineoplásicos convencionales incluyendo quimio y radioterapia debido a que poseen diferentes mecanismos como activación de vías antiapoptóticas, expulsión de medicamentos a través de los transportadores ABC y mecanismos de reparación del DNA más eficientes. [27]

La primera evidencia moderna del papel de las células troncales en el cáncer se originó en 1994 de un estudio realizado en leucemia mieloide aguda (AML), en el cual se identificó una población de células capaces de establecer leucemia en ratones inmunodeprimidos a través de trasplantar células de pacientes con AML. Las células iniciadoras de tumor poseían marcadores específicos de superficie (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>). [28] Posteriormente Bonnet y colaboradores en 1997 realizaron un estudio en leucemia analizando diferentes poblaciones celulares tumorales en términos de proliferación y diferenciación encontrando una población con propiedades troncales. [29]

Actualmente ha sido posible la identificación de CTC en diferentes neoplasias incluyendo hematopoyéticas, hígado, ovario, próstata, cerebro, mama, colorrectal y páncreas. [30] Las células troncales a menudo se identifican a partir de cánceres humanos o líneas celulares utilizando marcadores de superficie como CD44, CD24, CD34, antígeno epitelial específico (ESA) y CD133. [31] Clásicamente, estas células se aislan mediante técnicas como citometría de flujo y posteriormente se implantan en ratones inmunocomprometidos. La recapitulación de la neoplasia es considerada como la validación para estas características

troncales. [32] El modelo *in vitro* más utilizado para el crecimiento de células troncales del cáncer es la formación de esferas tumorales en un entorno de baja adherencia. [32]

En cáncer de páncreas los marcadores clave para la identificación de la población troncal son CD133, ALDH y la triple combinación de CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, ESA<sup>+</sup>. [33] Investigadores de la Universidad de Michigan identificaron la combinación de marcadores de superficie CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, ESA<sup>+</sup> como indicativo de troncalidad en las células de cáncer de páncreas. Estos investigadores utilizaron la técnica de separación celular mediante fluorescencia activada (FACS) para identificar células que expresan las proteínas CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, ESA<sup>+</sup> en tumores primarios, estas células fueron implantadas en ratones inmunocomprometidos, resultando en la formación de tumores, mientras que, células carentes de estos marcadores fueron incapaces de formar tumores. Adicionalmente, encontraron que las células con los marcadores antes mencionados poseían la capacidad de formar esferas en un ambiente de baja adherencia. [34]

En 2007, Hermann informó que CD133 era un marcador de células troncales pancreáticas. Los investigadores aislaron células CD133<sup>+</sup> y CD133<sup>-</sup> mediante separación por perlas magnéticas y las injertaron en ratones inmunocomprometidos. Un gran número de células CD133<sup>-</sup> no indujo la formación de tumores; sin embargo, se encontró que un número limitado de células CD133<sup>+</sup> son capaces de formar tumores y pueden recapitular la heterogeneidad de los tumores donde fueron obtenidas. [35]

La enzima ALDH también ha sido implicada como un marcador de células troncales en cáncer de páncreas. Kim descubrió que las células ALDH<sup>+</sup> de tumores pancreáticos humanos tienen una capacidad clonogénica más alta que las células ALDH<sup>-</sup>. [36]

Las células troncales del cáncer se han visto implicadas en la carcinogénesis, prognosis y resistencia a las terapias convencionales como quimioterapia y radioterapia, por lo que las convierte en blancos terapéuticos atractivos. Las células troncales cancerosas probablemente están reguladas por vías de señalización similares a las células madre normales, como la vía de Hedgehog, Notch, Wnt, BMI-1 y PTEN. [37] Adicionalmente, estudios recientes han vinculado a la vía de NF- $\kappa$ B en el mantenimiento del fenotipo troncal en diversos tipos de cáncer. [38]

### III.IV VÍA DE SEÑALIZACIÓN NF- $\kappa$ B

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es una familia de factores de transcripción involucrado en un gran número de procesos biológicos incluyendo la respuesta inmune, supervivencia celular, respuesta al estrés y maduración de varios tipos celulares. El sistema de señalización NF- $\kappa$ B consiste en heterodímeros/homodímeros (RelA, RelB, cRel, p50 y p52) del dominio de homología Rel (RHD), el cual media la dimerización, la unión al DNA, la interacción con I $\kappa$ B y la translocación nuclear. La generación de todos los monómeros está regulada transcripcionalmente, adicionalmente, los monómeros p50 y p52 son generados a partir del procesamiento de sus proteínas precursoras p105 y p100. Por lo tanto, diferentes complejos diméricos de NF- $\kappa$ B se expresan específicamente dependiendo del tipo celular y el estímulo; algunos dímeros fisiológicamente importantes son RelA: p50, cRel: p50 y RelB: p52. [39]

Las proteínas diméricas de NF- $\kappa$ B, al ser factores de transcripción necesitan entrar al núcleo y unirse al DNA para desarrollar su función. En la mayoría de los tipos celulares en estado de reposo, NF- $\kappa$ B se encuentra inactivo y retenido en el citoplasma. Estas proteínas se encuentran unidas a un inhibidor específico llamado I $\kappa$ -B, que puede unirse al RHD de NF- $\kappa$ B e interferir con la secuencia de localización nuclear (NLS). Estas proteínas inhibitoras,

que incluyen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\gamma$ , contienen 6–7 repeticiones de anquirina que median la unión al RHD. Estas repeticiones también están presentes en los extremos C-terminales de los precursores NF- $\kappa$ B2/p100 y NF- $\kappa$ B1/p105, que también funcionan como I $\kappa$ Bs y retienen las proteínas Rel, en el citoplasma. Para activar la vía de señalización, es necesaria la separación de la proteína NF- $\kappa$ B de sus inhibidores. Hay dos vías principales de señalización que conducen a la disociación del inhibidor de la proteína I $\kappa$ -B y de NF- $\kappa$ B permitiendo la translocación de los dímeros de NF- $\kappa$ B del citoplasma al núcleo. [40]

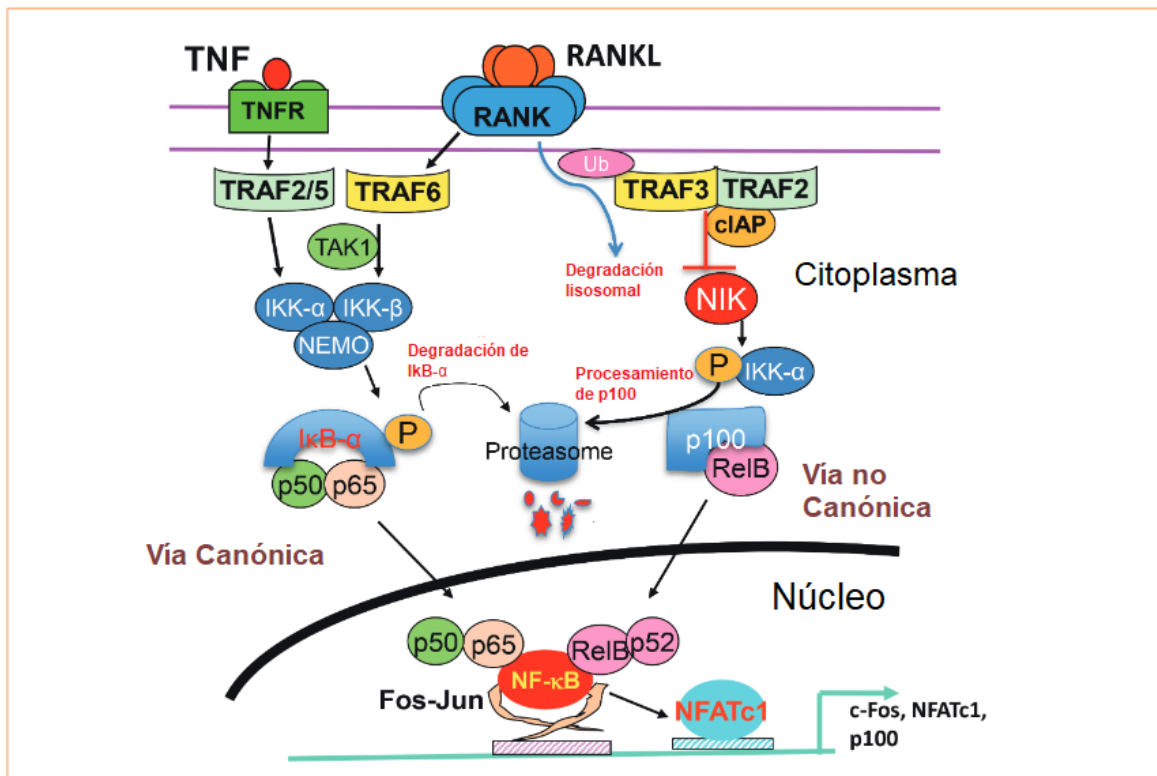
#### Vía Canónica

La vía canónica o clásica comienza por el receptor transmembranal de citocinas proinflamatorias, el receptor de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), así como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y el receptor de células T / B. Estos receptores se unen con sus respectivos ligandos y transfieren la señal a través de la membrana celular, activando al complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK). La forma más común de este complejo consiste en un heterodímero de subunidades catalíticas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y una subunidad reguladora IKK también denominada NEMO. El complejo IKK activado cataliza la fosforilación de I $\kappa$ Bs (en sitios equivalentes a Ser32 y Ser36 de I $\kappa$ B $\alpha$ ), la poliubiquitinación (en sitios equivalentes a Lys21 y Lys22 de I $\kappa$ B $\alpha$ ) y la subsiguiente degradación de I $\kappa$ B por el Proteasoma 26S. Los dímeros NF- $\kappa$ B se translocan al núcleo y se unen al DNA activando la transcripción de genes específicos. [39],[41]

#### Vía no canónica

Otra vía de activación de NF- $\kappa$ B es la vía no canónica o alternativa. Esta vía es independiente de IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ , pero depende de dímeros IKK $\alpha$ . Una vez activada la vía se fosforila la proteína NIK, que a su vez fosforila a los homodímeros IKK $\alpha$ . Los homodímeros IKK $\alpha$  fosforilan los sitios C-terminal de p100 provocando así la degradación parcial de p100

a p52. Sin embargo, la ubiquitinación dependiente de la fosforilación de p100 solo resulta en la degradación de sus fracciones C-terminales inhibitorias. Una vez que el extremo C-terminal es degradado, se libera la porción N-terminal de NF- $\kappa$ B (el polipéptido p52 que contiene el RHD). Como el RHD de p100 se asocia más comúnmente con RelB, la activación de esta ruta "alternativa" da como resultado la translocación nuclear de los dímeros p52-RelB. El dímero finalmente se une al DNA y activa la transcripción génica. [39],[41], [42]



**Figura 3. Vía canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B.** Activación de la vía de NF- $\kappa$ B por RANK y TNFR. En la vía canónica los dímeros de NF- $\kappa$ B se encuentran unidos a su inhibidor I $\kappa$ B, el cual es fosforilado y degradado al activarse la señal mediante diferentes receptores. La degradación del inhibidor permite que los dímeros transloquen al núcleo y desencadenen la transcripción génica. En la vía no canónica, una de las proteínas de NF- $\kappa$ B es parcialmente degradada para activar al dímero y poder desencadenar la transcripción génica. Imagen obtenida y modificada de (Boyce, B. Xing, L:2007) [53]

La activación de NF- $\kappa$ B es un evento bien regulado. En las células normales, NF- $\kappa$ B se activa solo después de los estímulos apropiados, y regula la transcripción de sus genes

blanco. Posteriormente, los mecanismos reguladores devuelven a NF- $\kappa$ B a su estado inactivo. La activación de NF- $\kappa$ B es, por lo tanto, un proceso inducible y transitorio. En las células tumorales, diferentes tipos de alteraciones moleculares pueden dar como resultado una regulación deficiente de la activación de NF- $\kappa$ B. En tal caso, NF- $\kappa$ B deja de ser inducida y se activa constitutivamente. Esto conduce a la expresión desregulada de genes bajo el control de NF- $\kappa$ B. Entre ellos, hay genes implicados en la regulación de la apoptosis, el control del ciclo celular, la angiogénesis, metástasis, resistencia a quimioterapias y el mantenimiento de las células troncales del cáncer. Dado que las alteraciones en todos estos procesos participan en el desarrollo y la progresión del cáncer, existe un vínculo claro entre la vía de NF- $\kappa$ B y la carcinogénesis. [43]

### III.V VÍA DE RANK/RANKL/OPG

La super-familia del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) está compuesta por más de 40 miembros y está asociada con un número similar de receptores solubles o membranales. RANKL es uno de los miembros de la super-familia TNF- $\alpha$  y se une a su receptor RANK, miembro de la super-familia de receptores TNF. [44] La interacción entre RANK y RANKL desencadenan señales de transducción específicas que son controladas por el receptor soluble OPG. [45]

RANK (TNFRSF11A) pertenece a la super-familia de receptores TNF y es una proteína transmembranal de tipo I. Este receptor posee una gran región citoplasmática en su dominio C-terminal y un dominio extracelular N-terminal con cuatro motivos ricos en cisteína. Su último dominio está involucrado en la interacción con RANKL. [46] Como otros miembros de esta super-familia, la región C-terminal carece de actividad enzimática intrínseca por lo que su función como transductor de señales la ejerce mediante el reclutamiento de varias



proteínas adaptadoras. [47] Esta proteína se ha detectado en muchos tejidos como el timo, glándulas mamarias, hígado, próstata, pero más significativamente en hueso. [48]

RANKL (TNFSF11) es una proteína de membrana tipo II homotrimérica sin péptido señal y que existe en tres isoformas debido al splicing alternativo del mismo gen. RANKL puede encontrarse de forma soluble debido a la ruptura de RANKL membranosa causada por varias enzimas metaloproteasas como MMP-7, MMP-14 o ADAM-10.[48] RANKL es expresado en una amplia variedad de tejidos como cerebro, piel, intestino, músculo esquelético, riñón, hígado, pulmón y tejido mamario, pero se expresa más en el tejido óseo, los órganos linfoides y el sistema vascular. El control de la remodelación ósea es la función predominante de RANKL. El papel de RANKL no se restringe al tejido óseo, sino que también desempeña un papel importante en el sistema inmunológico, aumentando la capacidad de las células dendríticas para estimular la proliferación de células T. [49]

OPG (TNFRSF11B) es un receptor soluble que actúa como inhibidor natural de la vía de RANK/RANKL, ya que posee la capacidad de unirse a RANKL impidiendo su unión con RANK. Esta proteína solo se encuentra en forma soluble y se conforma de una región N-terminal con 2 dominios ricos en cisteínas, a través de las cuales se une a RANKL y una región C-terminal que permite la formación de dímeros de OPG. Esta proteína es expresada en una variedad de tejidos como son el hueso, pulmón, corazón, riñón, hígado, bazo, timo, próstata, ovario, glándula adrenal, testículos y médula ósea. [50]

Se ha observado que la tríada molecular que involucra el sistema RANK / RANKL / OPG influye en diversos procesos fisiológicos y patológicos en todo el cuerpo. Estos incluyen modelado y remodelación de huesos, desarrollo de glándulas mamarias, desarrollo y migración de células tumorales y modulación de la inmunidad adaptativa. [51] El papel de

este sistema de señalización ha sido bien enfatizado en el hueso donde la señalización RANKL/RANK media la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea a través de la señalización parácrina entre osteoblastos y osteoclastos. OPG producido por osteoblastos y células estromales actúa como un receptor señuelo soluble para RANKL evitando la diferenciación y activación de los osteoclastos al interferir con esta vía. [52] RANK también se expresa de manera constitutiva en tejidos epiteliales mamarios, donde RANKL funciona a través de RANK para proporcionar señales proliferativas y de supervivencia promoviendo las etapas finales del desarrollo de la glándula mamaria lactante. También se ha demostrado que participa en la señalización de termorregulación en mujeres posiblemente a través de la vía COX2-PGE2/EP3R, la calcificación vascular y la aterosclerosis mediante la comunicación cruzada con el sistema renina-angiotensina. [51] Adicionalmente esta vía de señalización se encuentra acoplada a la vía de NF- $\kappa$ B, pudiendo activar tanto la vía canónica como la no canónica, desencadenando la transcripción de genes que participan en la tumorigénesis. [53]

Actualmente existen estudios en los cuales se vincula esta vía de señalización en el mantenimiento de la población troncal en cáncer. En un estudio realizado por Yoldi y colaboradores encontraron que la inhibición de la vía de RANK reduce drásticamente la población troncal del cáncer mediante la activación de mecanismos de diferenciación celular, de igual forma se observó un descenso en la iniciación tumoral y presentación de metástasis y una mayor sensibilidad a la quimioterapia. [54] De igual forma, Palafox y su equipo de trabajo determinaron que altos niveles de RANK en la línea celular MCF10A induce cambios asociados a las células troncales como reconstitución de las glándulas mamarias, transición epitelio mesénquima (EMT), aumento de la migración y crecimiento independiente del anclaje. [55]

A pesar de comprobar el papel que juega esta vía de señalización en diferentes tipos de cáncer, principalmente en cáncer de mama, no existen trabajos que vislumbren la participación de la vía de señalización de RANK/RANKL en cáncer de páncreas.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de páncreas es el tipo de cáncer más agresivo, con una supervivencia a 5 años menor al 4% por lo que representa un grave problema de salud, de igual forma los tratamientos que actualmente se utilizan no logran combatir la enfermedad de manera eficiente. Se sabe que las células troncales del cáncer son las responsables de la progresión, mantenimiento y metástasis del cáncer, por lo que la elaboración de terapias dirigidas a estas células, combinadas con los antineoplásicos convencionales, podrían proporcionar mayores beneficios a las personas con cáncer.

La vía de RANK participa en el desarrollo tumoral de diferentes tipos de cáncer y se ha demostrado su participación en el mantenimiento de la población troncal en cáncer de mama, por lo que su inhibición resulta un blanco terapéutico atractivo para lograr la eliminación de la población troncal del cáncer, y así mejorar la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, a la fecha no se conoce la participación de esta vía en cáncer de páncreas por lo que resulta importante vislumbrar su participación en la población troncal del mismo.

#### **V. HIPÓTESIS**

La vía de RANK/RANKL está implicada en la regulación de la población de células troncales de varios tipos de tumores, por tanto, la inhibición de RANK podría afectar el número y función de las células troncales de cáncer de páncreas.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión de RANK/RANKL/OPG en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas y evaluar el efecto de la inhibición de RANK en la regulación de la población troncal.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Evaluar la expresión de RANK, RANKL y OPG en líneas celulares de cáncer de páncreas mediante PCR en tiempo real.
- 2.- Determinar la presencia de CD44, CD24, EPCAM y actividad de ALDH en líneas celulares de cáncer de páncreas mediante citometría del flujo.
- 3.- Evaluar la expresión de RANK/RANKL y OPG en diferentes tipos de cáncer mediante herramientas bioinformáticas.
- 4.- Evaluar el efecto del silenciamiento de RANK en la expresión de marcadores de pluripotencia, capacidad de migración, proliferación, así como en el fenotipo troncal de CTC de páncreas y la expresión de los marcadores CD44, CD24, EPCAM.

## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivo Celular**

Se trabajo con tres líneas celulares de adenocarcinoma pancreático BXPC-3, CFPAC-I y HPAF-II obtenidas del ATCC las cuales fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Cat. # 10-040-CMR), IDMEM (Cat. # EH87012602) y EMEM (Cat. # ATCC 30-2003) enriquecido con

10% de Suero Fetal Bovino (SFB) respectivamente (Cat. # 26140-079). Las células se mantuvieron en crecimiento a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>.

### Extracción de RNA

El RNA total se obtuvo mediante el método de TRIzol Reagent (Cat. # 15596026) siguiendo las especificaciones de proveedor. Las células fueron raspadas de la placa y recolectadas en PBS, posteriormente se centrifugaron 1 min a 2000 rpm para obtener un botón. Las células fueron resuspendidas en 500 µl de TRIzol seguido de la adición de 100 µl de cloroformo, este lisado fue centrifugado a 10 000 rpm por 15 min a 4 °C. Al término de la centrifugación se obtuvo la fase superior y se agregó la misma cantidad de isopropanol y se dejó reposar de 30 min a 1 hora a -20 °C. Transcurrido el tiempo las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 30 min a 4 °C. El botón resultante fue lavado dos veces con etanol al 70% en agua DEPC (dietilpirocarbonato) y centrifugado a 7000 rpm por 5 min a 4 °C. Al término de los lavados se dejó secar el botón de cada muestra y una vez seco se adicionaron 25 µl de agua MiliQ. La concentración y calidad de RNA se determinaron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

### RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR)

Un total de 1-2 µg de RNA fueron tratados con el kit de DNasa (RQ1 RNasa-Free DNase, Cat. # M6101) y retro-transcritos haciendo uso de los kits SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Cat. # 11754050) y High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Cat. # 4368813). La qPCR se llevó a cabo utilizando 7 µl de SYBR Select Master Mix (Cat. #4472908) en los termocicladores 7900HT (Cat. # 4329001) o en QuantStudio 7 Flex real-time PCR instruments (Cat. # 4485701). La expresión relativa fue determinada con el método de  $2\Delta\Delta CT$ . Los primers utilizados para la qPCR se encuentran en la tabla 1. Estos primers fueron diseñados en el Laboratorio de Epigenética del INMEGEN.

Gen	Secuencia Sentido (5'-3')	Secuencia Anti sentido (3'-5')	TM
RANK	ATCTGGGACGGTGCTGTAA	CCACAGGGCAGACATACACT	60 °C
RANKL	TATGCCAACATTTGCTTTTCG	GGTGCTTCCTCCTTTTCATCA	56 °C
OPG	GGAACCCCAGAGCGAAATACA	ACCTGAAGAATGCCTCCTCACAC	57 °C
PPIA	ATGCTGGACCCAACACAAAT	CCACAAACCGTTTCACTTTCT	60 °C
NANOG	AGGCAAACAACCCACTTCTG	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	56 °C
OCT4	ACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAAC	CTGAATAACTTCCCAAATAGAACCC	56 °C
SOX2	GGACAGTTACGCGCACATGA	AGCCGTTTCATGTAGGTCTGC	56 °C
ALDH8A1	CAGGCTACTTTATGCTTCCCAC	GCTCTTTCAATCACCTCCTCTT	56 °C
ALDH1A3	GCATACCGTGGAAGGGCG	GCTCTCTGGGCTATTGATTCTGTC	56 °C

Tabla 1. Secuencia de Primers y temperaturas de fusión <sup>TM</sup> de los genes evaluados por qPCR

### Citometría de Flujo

Para la determinación de la población troncal un total de  $5 \times 10^5$  células fueron resuspendidas en PBS suplementado con SFB al 1% y se incubaron con los anticuerpos CD44-Fitc (Cat. # 555478), CD24-PE (Cat. # 555428) y EpCAM-APC (Cat. # 347200) durante 20 min a 4°C. Para el control de isotipo se ocuparon los anticuerpos Fitc-IgG1 (Cat. # 130-092-213) y APC-IgG1 (Cat. # 130-092-214) y la compensación se llevó a cabo con perlas de captura. Las células fueron analizadas en el citómetro FACSaria y los resultados fueron analizados en el programa FlowJo Software Package.

La determinación de la actividad de la enzima ALDH fue realizada con el kit Aldeflour Assay kit (Cat. # 01700) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron incubadas por 30 min a 37°C con el reactivo ALDEFLOUR (muestras positivas) y con el inhibidor DEAB (controles negativos). Las muestras fueron cuantificadas en el citómetro

FACSaria y los resultados obtenidos fueron analizados y comparados con su respectivo control en el programa FlowJo Software Package

### Generación de línea estable BXPC-3/sh-RANK

Se diseñaron un par de siRNAs contra RANK en la plataforma RNAi Target Sequence Selector y con ayuda de las plataformas BLAST, E-RNAi y RNAfold WebServer se evaluó la especificidad, la eficiencia y las estructuras secundarias respectivamente. Los siRNAs fueron alineados y ligados al vector pSIREN. Este vector fue clonado en bacterias *E.coli* *XL-Blue* con el kit TransformAid Bacterial Transformation Kit (Cat. # K2710) . Una vez crecidas las bacterias seleccionadas con ampicilina, se eligieron 5 clones y se cultivaron para la extracción del plásmido con el kit Miniprep QIAprep Spin kit (Cat. # 27106). Para evaluar una correcta clonación se realizó una digestión enzimática con la enzima de restricción Mlu-I. Una vez comprobada la clonación se procedió a realizar un cultivo de bacterias transformadas en 250 ml de medio LB-Broth (Cat.# 101871341) y ampicilina [100µg/ml] llevándose a cabo la extracción del plásmido con ayuda del kit HiSpeed Plasmid Midi Kit (Cat. # 12643).

Las transfecciones de la línea BXPC-3 se llevaron a cabo con el protocolo Xfect Transfection Reagent Protocol-AT-A-Glance (PT5003-2) siguiendo las recomendaciones del fabricante, transfectando 4 µg de vector pSIREN-siRANK y pSIREN-Luc, para el control. Pasadas 48 horas las células fueron seleccionadas con puromicina [500ng/µl]. Esta concentración se obtuvo de la realización de una curva de antibiótico de 0-1100 ng/µl aumentando 100 ng/µl en cada caso, obteniéndose que 500 ng/µl es la concentración de muerte celular masiva a los 7 días.

## Ensayos de Migración

Se contaron 20,000 células y se colocaron en cámaras de Transwell de 6.5 mm y poro 0.8 µm en 300 µl de medio RPMI-1640 sin suplementar con SFB, colocadas en placas de 24 pozos con 600µl de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, se dejaron incubando durante 24 horas a 37 °C. Las células que migraron fueron fijadas con paraformaldehídos y posteriormente teñidas con cristal violeta para su posterior análisis.

## Ensayos de Proliferación

Se cultivaron 5,000 células en placas de 96 pozos con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, el análisis se llevó a cabo a los tiempos 0,24,48,72 y 96 hrs. El ensayo de MTS se realizó con el reactivo CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Cat. # G400) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados fueron cuantificados en el espectrofotómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a una longitud de onda de 596 nm.

## Análisis Bioinformáticos

Se obtuvieron los datos de expresión de RANK, RANKL y OPG de todos los tipos de cáncer disponibles en la plataforma cBioPortal correspondientes a la base de datos de The Cancer Genome Atlas (TCGA), estos datos fueron graficados y analizados en el programa GraphPad Prism 6. Adicionalmente se obtuvieron curvas de Kaplan-Meier de RANK, RANKL y OPG de adenocarcinoma pancreático en la plataforma Kaplan-Meier Plotter. Finalmente se llevó a cabo una búsqueda de los datos de expresión de RANK, RANKL y OPG en tejido normal pancreático y adenocarcinoma pancreático en GEO dataset del NCBI.

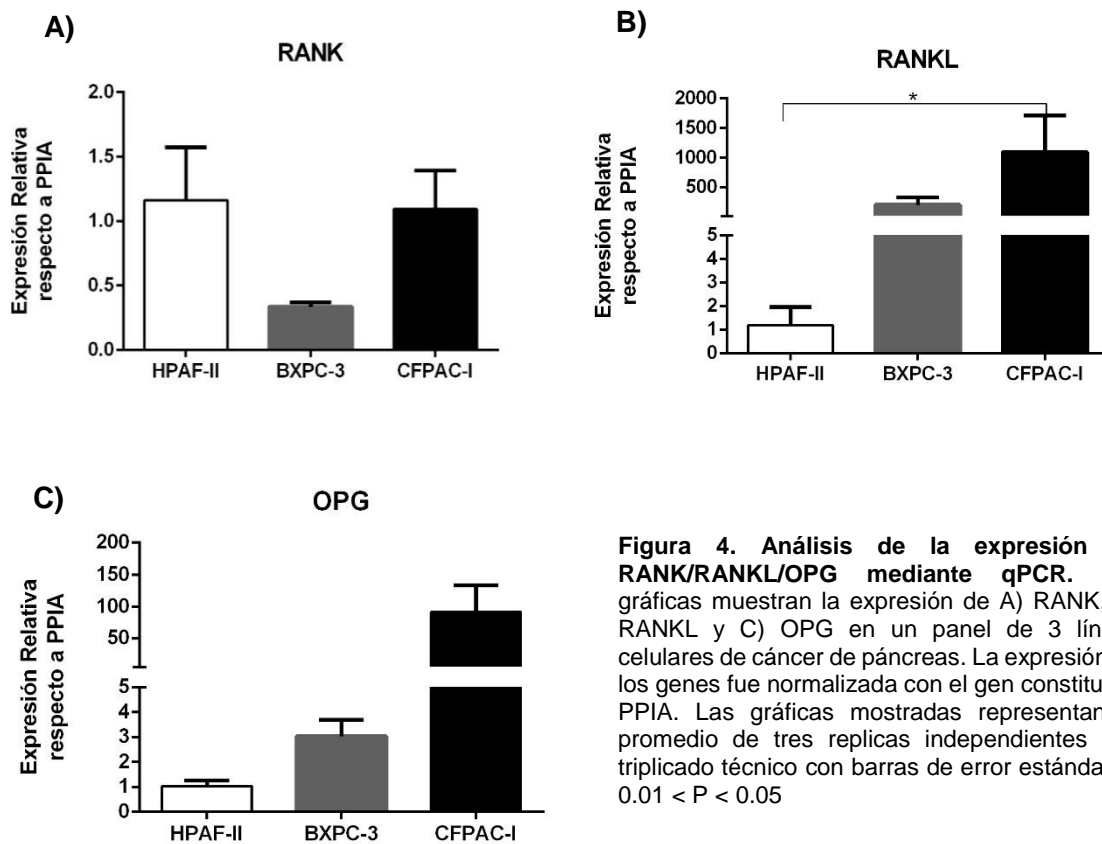


## Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado biológico. Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6. La significancia estadística se obtuvo mediante las pruebas estadísticas ANOVA y T de Student. Un  $p$  value  $< 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Las gráficas reportadas están acompañadas por barras de desviación estándar.

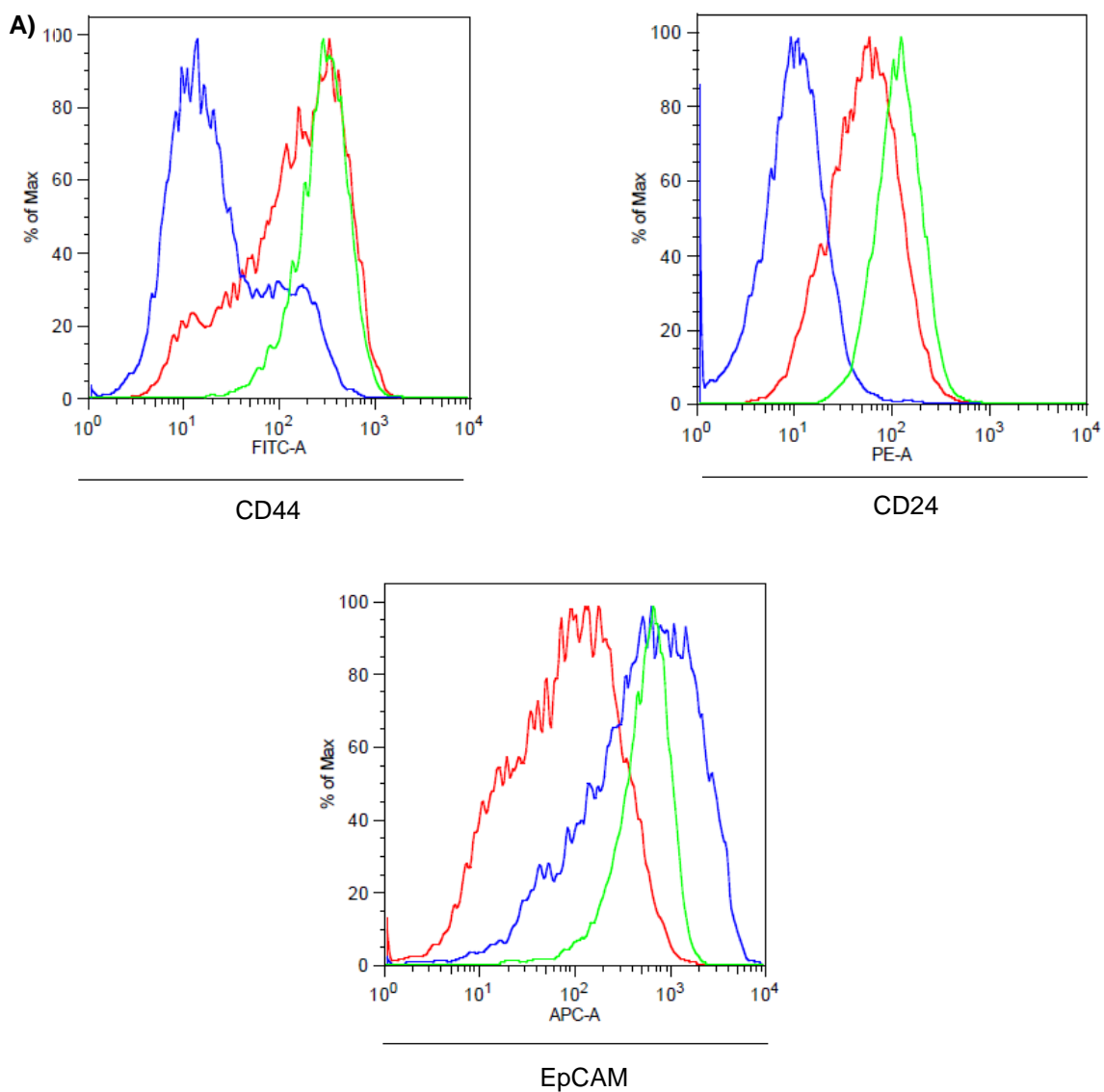
## IX. RESULTADOS

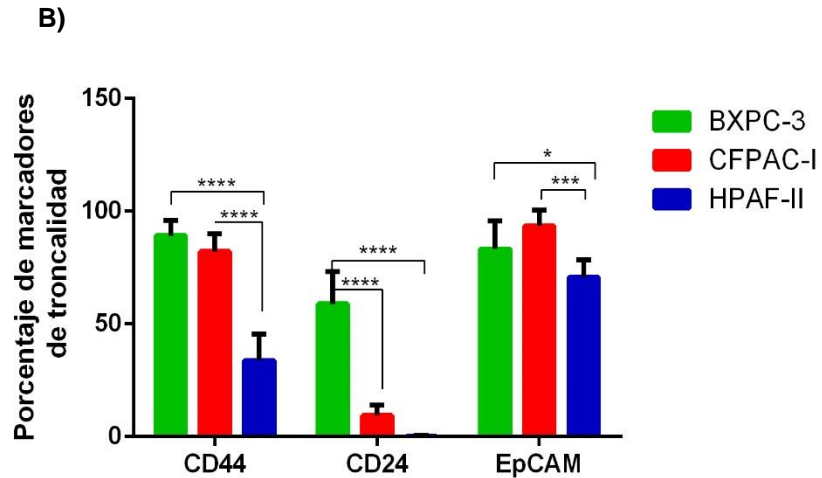
Estudios recientes vinculan la participación de la vía de señalización de RANK/RANKL con el mantenimiento de la población troncal en cáncer de mama. [54], [55] Sin embargo no se ha explorado de qué manera participa esta vía en el cáncer de páncreas. De esta forma se hizo la determinación de la expresión de los componentes de esta vía (RANK/RANKL y OPG) mediante PCR en tiempo real en las líneas celulares BXPC-3, CFPAC-I y HPAF-II, encontrando que la expresión de RANK es mayor en las líneas celulares HPAF-II y CFPAC-I, sin embargo, no hay cambios significativos entre las 3 líneas. Con respecto a RANKL hubo una mayor expresión en la línea celular CFPAC-I, de igual forma OPG posee una mayor expresión en la línea celular CFPAC-I como se observa en la figura 4.



**Figura 4. Análisis de la expresión de RANK/RANKL/OPG mediante qPCR.** Las gráficas muestran la expresión de A) RANK, B) RANKL y C) OPG en un panel de 3 líneas celulares de cáncer de páncreas. La expresión de los genes fue normalizada con el gen constitutivo PPIA. Las gráficas mostradas representan el promedio de tres replicas independientes con triplicado técnico con barras de error estándar. \*,  $0.01 < P < 0.05$

En cáncer de páncreas los marcadores clave para la identificación de la población troncal son CD133, ALDH y la triple combinación de CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, ESA<sup>+</sup>. [33] Por esta razón se decidió analizar la expresión de los marcadores CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup> en las líneas celulares antes mencionadas. El marcador mayormente expresado por las 3 líneas celulares corresponde a EpCAM y el menos abundante corresponde a CD24, como se muestra en la figura 5.

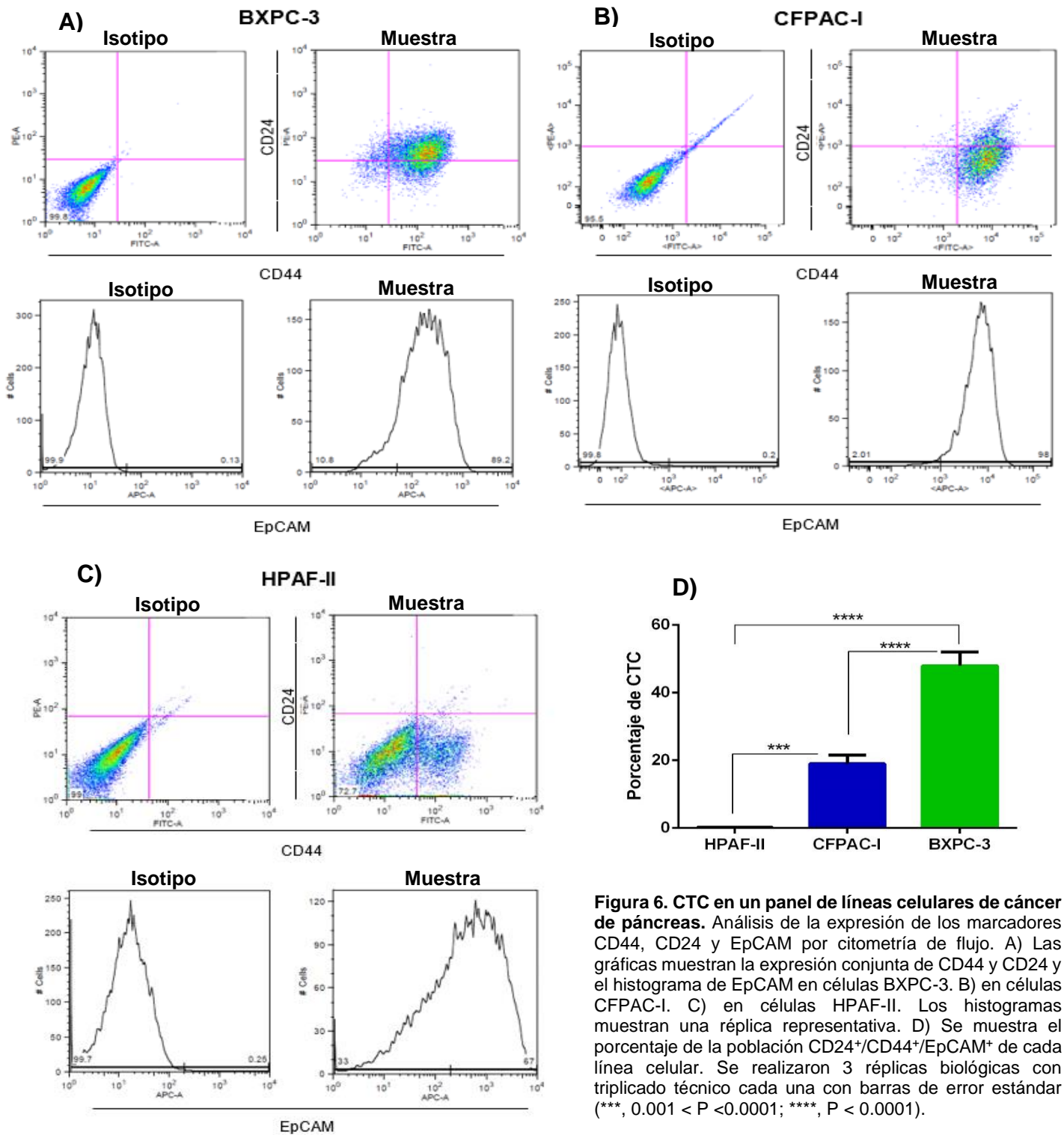




**Figura 5. Expresión de marcadores de troncalidad en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas.** A) Se muestran histogramas de la expresión de los marcadores CD24, CD44 y EpCAM en las líneas celulares BXPC-3, CFPAC-II y HPAF-II. Representación gráfica de una réplica independiente. B) Se muestra el porcentaje celular positivo para cada marcador de troncalidad en cada una de las líneas celulares, las gráficas representan el promedio de 3 réplicas biológicas con triplicados técnicos cada una con barras de error estándar (\*,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*\*,  $0.001 < P < 0.0001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ).

Las CTC son una subpoblación pequeña del tumor con la capacidad de auto renovación, la habilidad de diferenciarse en progenie fenotípicamente diversa dando lugar a la heterogeneidad tumoral y una alta proliferación. [25]

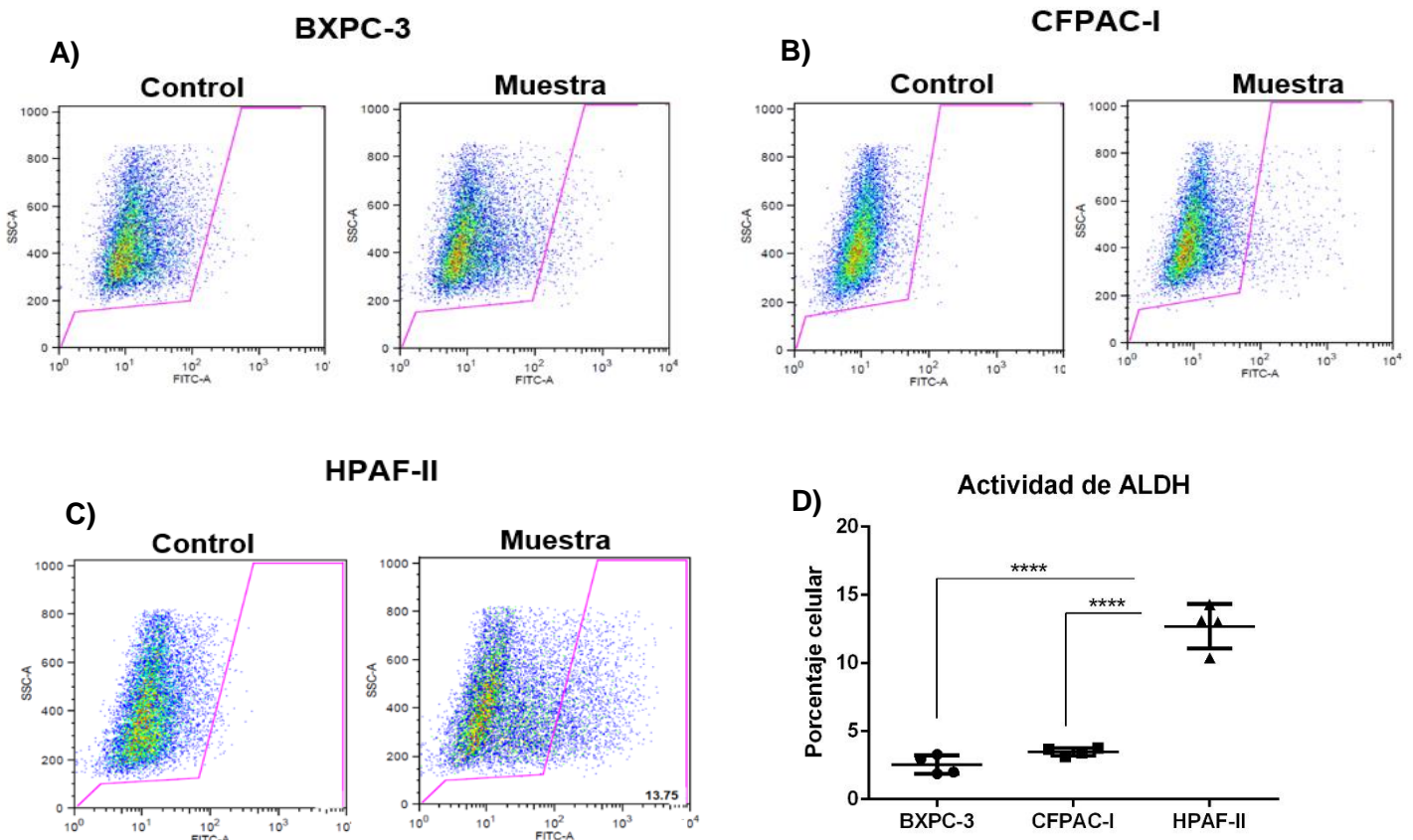
La línea celular BXPC-3 es la línea celular con mayor porcentaje de células positivas para estos tres marcadores (47.9%), seguido de CFPAC-I (18.9%) y por último HPAF-II (0.2%) Estos resultados sugieren que BXPC-3 presenta una capacidad mayor de auto renovarse, una mayor proliferación y una habilidad mayor de diferenciarse.



**Figura 6. CTC en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas.** Análisis de la expresión de los marcadores CD44, CD24 y EpCAM por citometría de flujo. A) Las gráficas muestran la expresión conjunta de CD44 y CD24 y el histograma de EpCAM en células BXPC-3. B) en células CFPAC-I. C) en células HPAF-II. Los histogramas muestran una réplica representativa. D) Se muestra el porcentaje de la población CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/EpCAM<sup>+</sup> de cada línea celular. Se realizaron 3 réplicas biológicas con triplicado técnico cada una con barras de error estándar (\*\*\*, 0.001 < P < 0.0001; \*\*\*\*, P < 0.0001).

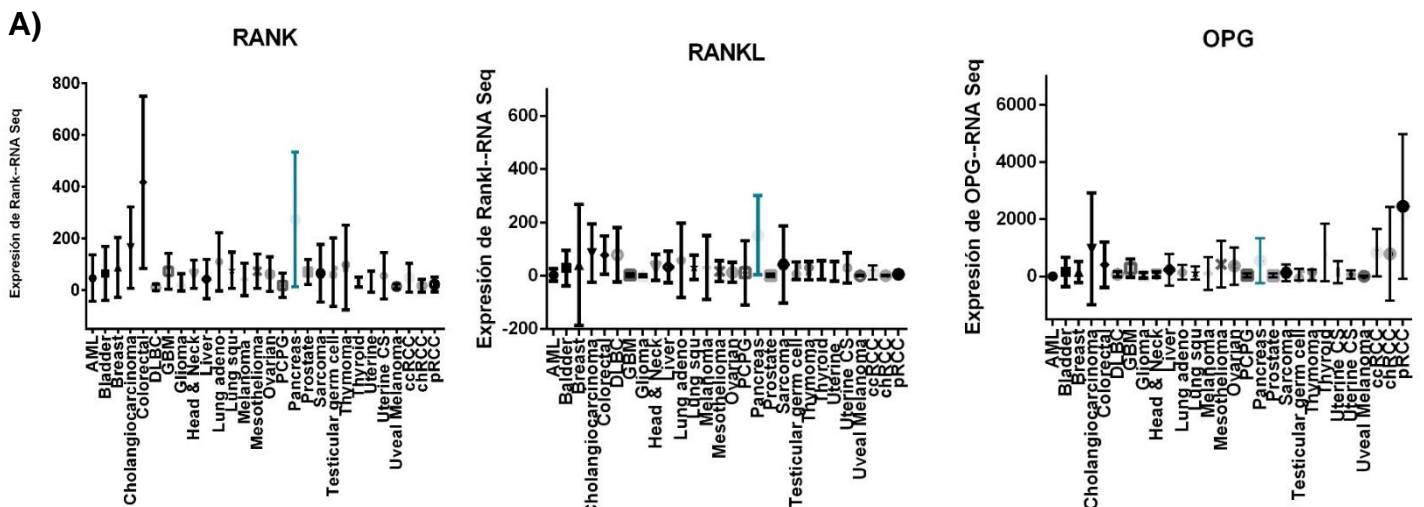
La actividad de la enzima ALDH también es considerada como un factor determinante de la población troncal en el cáncer de páncreas. Mediante el uso del kit ALDEFLOUR es posible determinar el porcentaje celular con actividad positiva para esta enzima, este kit posee un reactivo fluorescente no tóxico, BODIPY-aminoacetaldehído (BAAA) capaz de difundir en las células viables. En presencia de ALDH, BAAA es convertido en BODIPY-aminoacetato (BAA), el cual es retenido en las células. La acumulación de BAA es proporcional a la actividad de ALDH en la célula, la cual es cuantificada con ayuda de un citómetro de flujo.

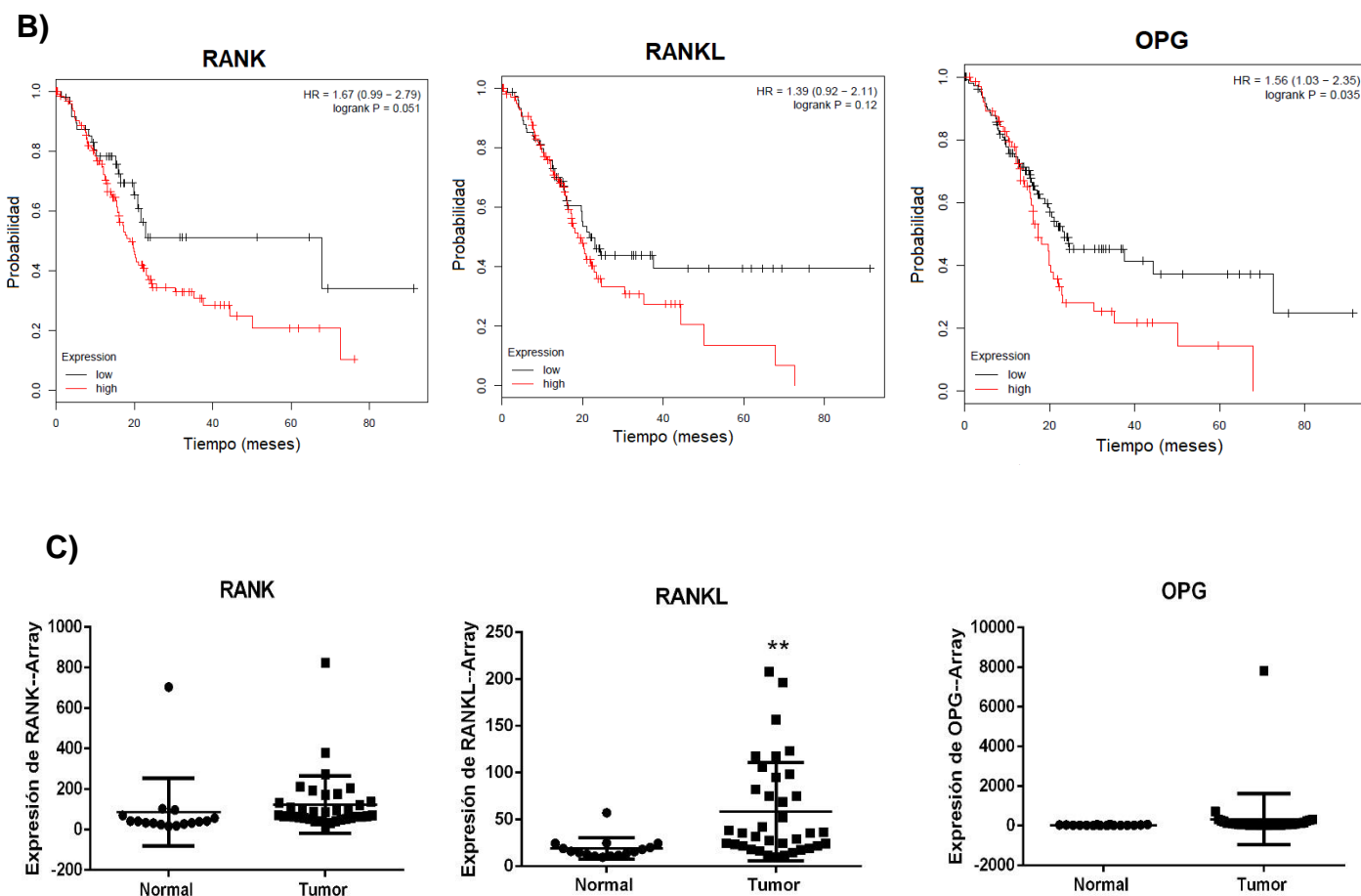
La línea celular con mayor actividad de ALDH fue HPAF-II con un porcentaje del 12.7%, seguida de la línea celular CFPAC-I con un porcentaje del 3.4% y por último la línea BXP-3 con un porcentaje del 2.5% (Figura 7). Contrario a lo obtenido con los tres marcadores conjuntos CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>. Esto sugiere que la actividad de ALDH es inversamente proporcional al porcentaje de CTC.



**Figura 7. Determinación de la actividad de la enzima ALDH mediante citometría de flujo en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas.** A) Se muestra el porcentaje celular que posee una actividad positiva de la enzima ALDH en comparación con el control en la línea celular BXPC-e. B) En la línea celular CFPAC-I. C) En la línea celular HPAF-II. Representaciones graficas de una réplica independiente. D) Se observa el promedio del porcentaje celular con actividad de la enzima ALDH en cada línea celular, se realizaron 2 réplicas biológicas con duplicados técnicos cada una \*\*\*\*, P < 0.0001

Con el objeto de conocer de qué manera está involucrada la vía de RANK en datos de pacientes se llevó a cabo un análisis en la plataforma cBioPortal, obteniéndose los datos de expresión de RANK/RANKL/OPG de datos The Cancer Genom Atlas (TCGA) de todos los tipos de cáncer disponibles en la plataforma. Con estos datos pudimos observar que la expresión de RANK en cáncer de páncreas ocupa el segundo lugar y RANKL posee el primer lugar en comparación con los demás tipos de cáncer. Así mismo se determinó si la expresión de RANK/RANKL/OPG afectan la supervivencia en cáncer de páncreas, este análisis se realizó en la plataforma Kaplan-Meier Plotter. La sobreexpresión de los 3 componentes de la vía conlleva una menor sobrevida para los pacientes que padecen esta enfermedad. Por otra parte, se comparó la expresión de los componentes de la vía de RANK en tejido sano y adenocarcinoma pancreático, obteniéndose una mayor expresión de RANK y RANKL en las muestras de tumor en comparación con tejido normal, sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de OPG. Estos resultados sugieren que la vía de RANK posee una participación en la progresión del cáncer de páncreas





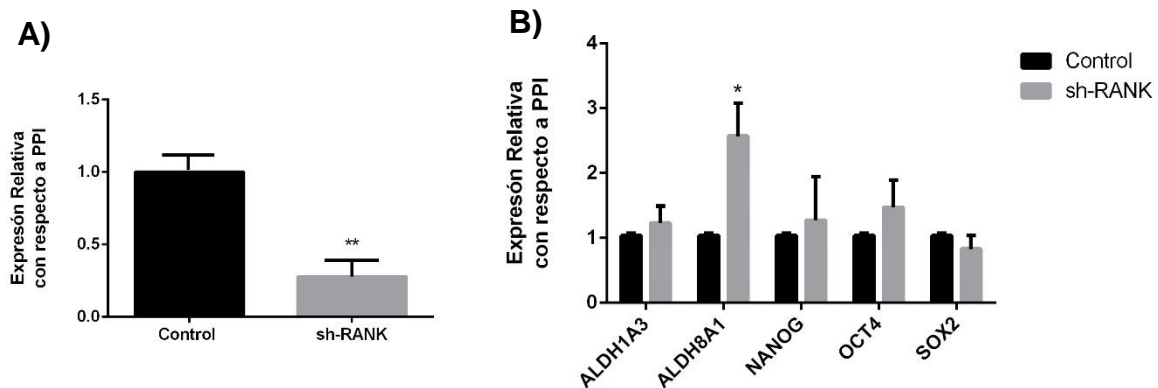
**Figura 8. Expresión de la vía RANK/RANKL en distintos tipos de cáncer y valor pronóstico de la vía en cáncer de páncreas.** A) Se muestra la expresión de RANK, RANKL y OPG en diferentes tipos de cáncer resaltando en azul el cáncer de páncreas. B) Se muestran las curvas de Kaplan Mayer de RANK, RANKL y OPG en adenocarcinoma pancreático. C) Se muestra la expresión de RANK, RANKL y OPG en tejido normal vs tumor.

Con el objeto de determinar de qué manera participa la vía de RANK en la población troncal de cáncer de páncreas, se llevó a cabo la inhibición de RANK con un siRNA, obteniéndose un 80% de inhibición como se observa en la figura 9.

Una característica de las células troncales del cáncer es la sobreexpresión de factores asociados a pluripotencia, los cuales permiten que esta subpoblación tumoral pueda auto renovarse y mantenerse indiferenciada. [56] Para comprender de qué manera participa la vía de RANK en el mantenimiento de la población troncal se determinó la expresión de

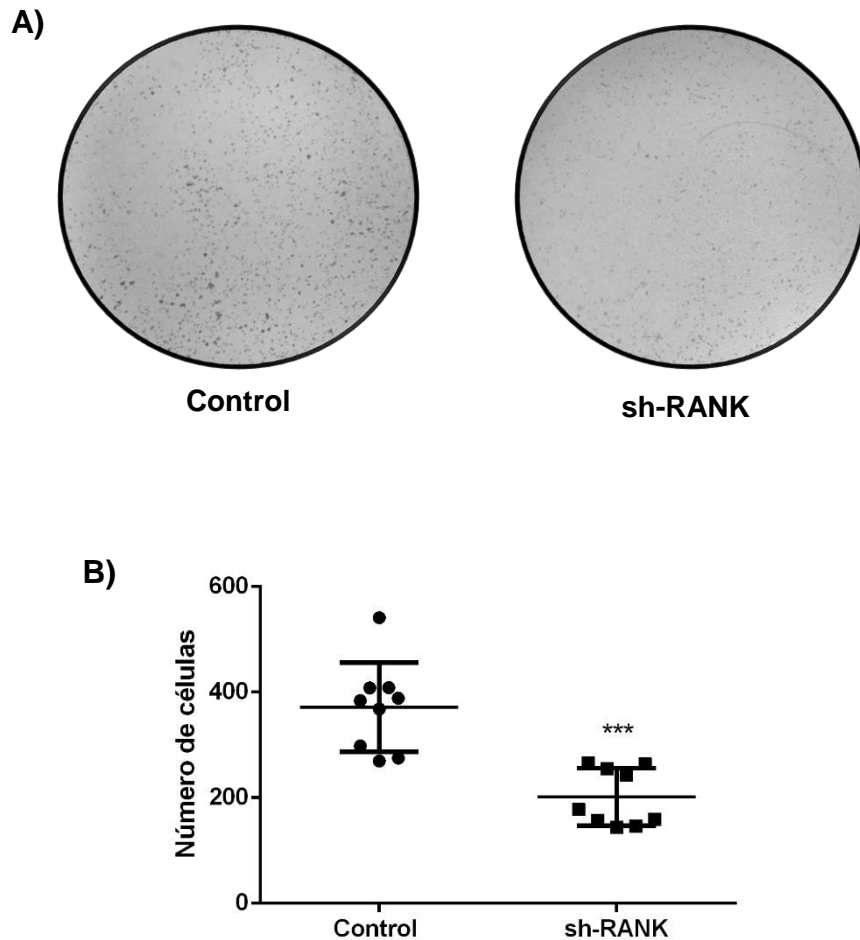


algunos factores de pluripotencia al inhibir a RANK, encontrando que la inhibición de RANK no disminuye la expresión de los marcadores de troncalidad o por el contrario, observamos que la inhibición de RANK provoca un aumento en la expresión de ALDH8A1. Esto podría sugerir que estos factores no son los más adecuados para evaluar la pluripotencia en el silenciamiento de RANK.



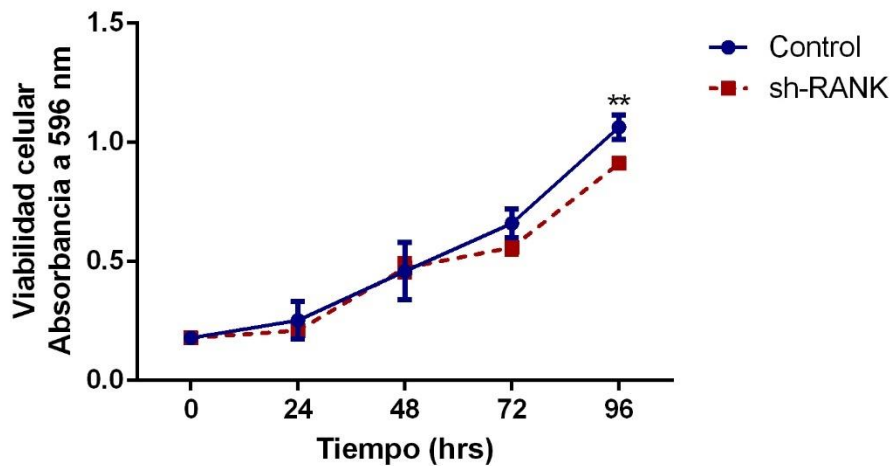
**Figura 9. Inhibición de RANK y efecto de la inhibición de RANK en la expresión de factores de pluripotencia.** A) Se muestra la expresión de RANK en la línea BXPC-3 transfectada con los plásmidos pSIREN-RANK2 (muestra) y pSIREN-Luc (control), se realizaron 3 réplicas biológicas con triplicados técnicos \*\*,  $0.001 < P < 0.01$ . B) Se muestra un panel de factores de pluripotencia expresados en las muestras control y en las muestras con RANK inhibido. La expresión de los genes fue normalizada con el gen constitutivo PPIA. Las gráficas mostradas representan el promedio de tres replicas independientes con triplicado técnico con barras de error estándar. \*,  $0.01 < P < 0.05$ .

Las células troncales del cáncer tienen una capacidad de migración mayor al resto de las células que conforman el tumor. [57] Es por esta razón el determinar la capacidad de migración resulta de gran utilidad para evaluar el comportamiento celular tumoral. En este trabajo se llevaron a cabo ensayos de migración en cámaras Transwell por 24 hrs determinando que la inhibición de RANK disminuye la capacidad de migración.



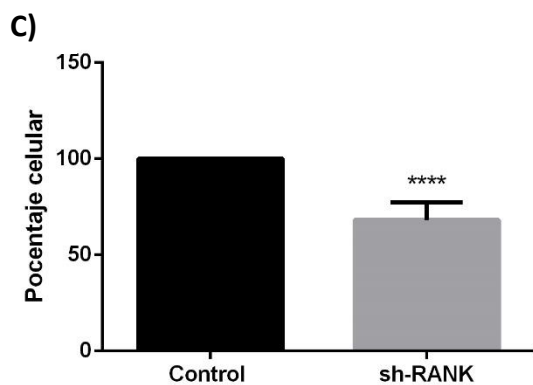
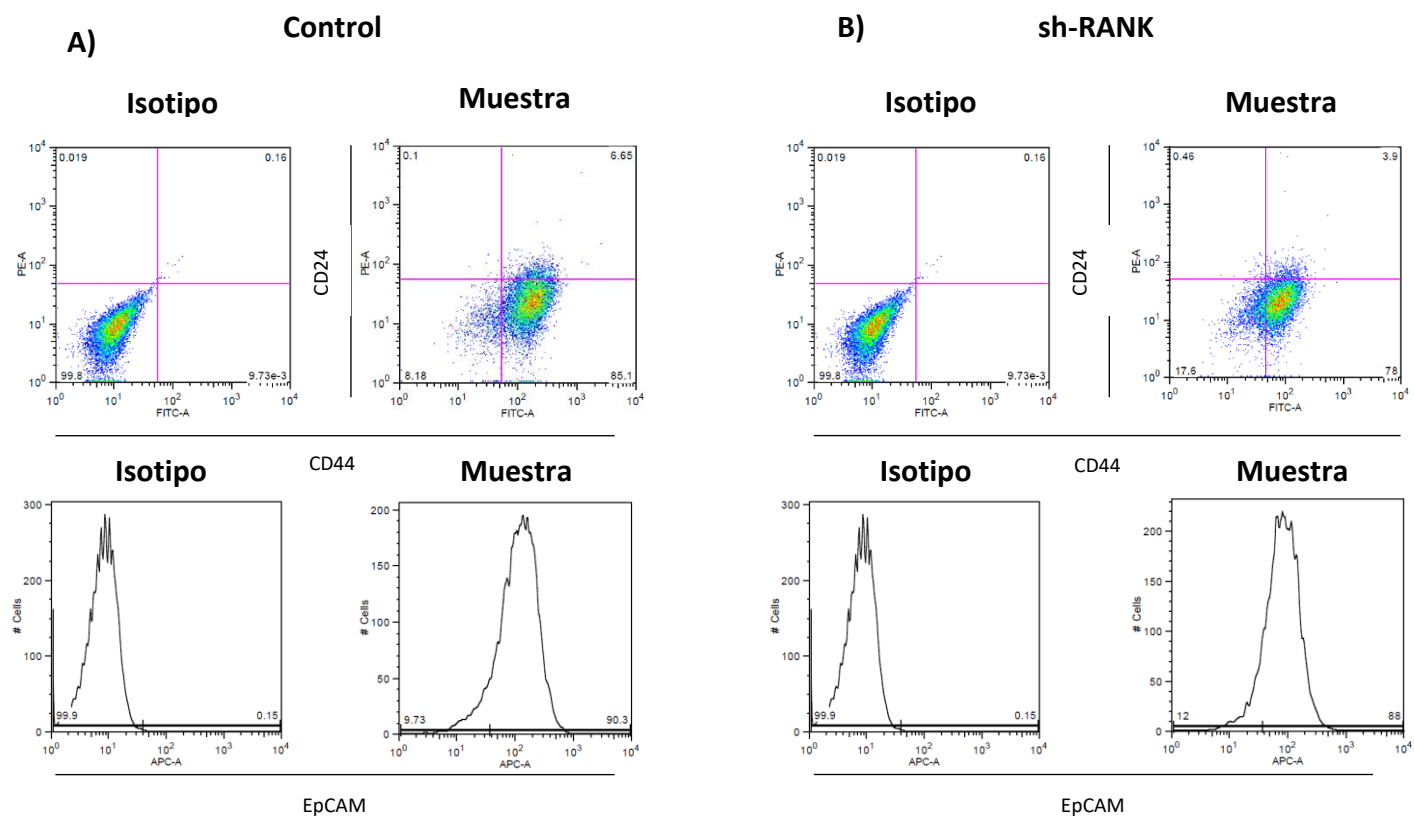
**Figura 10. La capacidad de migración de las células disminuye al inhibir RANK.** A) Se muestran imágenes representativas de las células de la línea celular BXPC-3 que migraron en la condición control y en las células con RANK inhibido teñidas con cristal violeta. B) Se muestra el número de células que migraron en las cámaras de Transwell a las 24 hrs en ambas condiciones, se llevaron a cabo 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una con barras de error estándar **\*\*\***,  $0.0001 < P < 0.001$

Con el objeto de determinar de qué manera afecta la inhibición de RANK la proliferación celular, se realizaron ensayos de MTS. Este método se basa en la conversión celular de una sal de tetrazolio en formazán, el cual es posible de analizar mediante espectrofotometría, por lo que la absorbancia detectada es directamente proporcional al número de células viables. De los datos obtenidos de estos ensayos podemos observar que la inhibición de RANK provoca una disminución en la proliferación celular a las 96 hrs, sin embargo, no se observan cambios significativos en tiempos previos (Figura 11).



**Figura 11. La proliferación celular se ve afectada al inhibir RANK.** Viabilidad celular relativa de BXPC-3 control y BXPC-3 al inhibir RANK. La lectura de la absorbancia se realizó a 596 nm. La grafica muestra el promedio de tres replicas biológicas con tres replicas técnicas cada una \*\*, 0.001 < P < 0.01

Las CTC del cáncer de páncreas se caracterizan por presentar los marcadores de superficie CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>. [33] Para evaluar el efecto de la inhibición de RANK en la población troncal BXPC-3 se determinaron las proteínas CD24, CD44 y EpCAM mediante citometría de flujo. De manera interesante, la inhibición de RANK mediante siRNA's redujo la población troncal en aproximadamente 32 % (Figura 12). Estos resultados sugieren que la vía de RANK posee una participación importante en el mantenimiento de la población troncal en el cáncer de páncreas.



**Figura 12. La inhibición de RANK disminuye la población de células CD44+, CD24+, EpCAM+.** Análisis de la expresión de los marcadores CD44, CD24 y EpCAM por citometría de flujo. A) Las gráficas muestran la expresión conjunta de CD44 y CD24 y el histograma de EpCAM en células BXPC-3 control. B) en células con RANK inhibido. C) Se muestra el porcentaje de la población CD24+/CD44+/EpCAM+ en células BXPC-3 transfectada con los plásmidos pSIREN-RANK2 (sh-RANK) y pSIREN-Luc (control). Los histogramas muestran una réplica representativa. Se realizaron 2 réplicas biológicas con 5 réplicas técnicas en total con barras de error estándar (\*\*\*, 0.001 < P < 0.0001; \*\*\*\*, P < 0.0001).

## **X. DISCUSIÓN**

La expresión de los componentes de la vía de RANK no solo se observa en procesos fisiológicos normales, ya que varios estudios han demostrado su expresión en diferentes neoplasias como cáncer de mama, de próstata, de pulmón, linfoma, melanoma, entre otros, por lo que se tiene la idea de que esta vía de señalización tiene un papel clave en el proceso oncogénico. [58] Sin embargo, no existen estudios en los que se describa la participación de esta vía de señalización en cáncer de páncreas. En este trabajo se realizó la determinación de RANK, RANKL y OPG en 3 diferentes líneas celulares de adenocarcinoma pancreático observando que BXPC-3 es la línea celular que podría tener una mayor activación de la vía de señalización debido a que es la línea celular con mayor expresión de RANKL y menor de OPG. Sin embargo, se requieren más experimentos para corroborar esta hipótesis.

BXPC-3 es una línea celular que no posee mutaciones en el gen KRAS en comparación con las otras 2 líneas que si poseen mutaciones en este gen.[59], [60] Así mismo esta línea celular es proveniente de un paciente sin metástasis, en comparación con CFPAC-I reportada con metástasis a hígado y HPAF-II reportada con metástasis a diafragma, hígado y nódulos linfáticos. [61]

Estudios recientes sugieren que tumores sólidos, incluyendo adenocarcinoma pancreático se encuentran organizados de manera jerárquica por una subpoblación de células troncales del cáncer, las cuales son responsables del crecimiento tumoral, metástasis y resistencia a las terapias antineoplásicas. [62] Así mismo, la vía de RANK se ha visto implicada en el mantenimiento de la población troncal en diferentes neoplasias como cáncer de mama, carcinoma escamoso de cuello y cabeza; y cáncer endometrial. [58] Li y colaboradores

identificaron una subpoblación (CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>) en adenocarcinoma pancreático con un alto potencial tumorigénico, capacidad de auto-renovación, con potencial de diferenciación celular y la capacidad de recapitular el tumor en modelos *in vivo*. [63] En este estudio se determinó el porcentaje de células troncales del cáncer (CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>) en 3 líneas celulares de adenocarcinoma pancreático observándose una mayor cantidad de CTC en la línea BXPC-3, lo cual coincide con ser la línea con la vía de RANK activa, por lo que la expresión de RANK podría estar directamente relacionada con la población troncal. Así mismo se ha reportado que esta línea celular posee un alto contenido de estos marcadores de troncalidad [62], por lo que nuestros resultados coinciden con lo ya reportado con respecto a esta línea celular.

La enzima ALDH también ha sido implicada como un marcador de células troncales en cáncer de páncreas. Kim descubrió que las células ALDH<sup>+</sup> de tumores pancreáticos humanos tienen una capacidad clonogénica más alta que las células ALDH<sup>-</sup>. [36] Para complementar el análisis de la población troncal en diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas se determinó la actividad de ALDH en cada una de ellas encontrando una menor actividad en la línea BXPC-3 y una mayor actividad en HPAF-II. Esto indica que la actividad de ALDH es inversamente proporcional a la cantidad de células troncales (CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>). Adicionalmente existen estudios contradictorios con respecto a la expresión de este marcador y la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas. [64]

La vía de RANK se encuentra sobre expresada en tumores de mama, próstata, endometrio, cérvix, estómago, esófago, tiroides y vejiga correlacionándose con un mal pronóstico para los pacientes, ya que esta vía se ve asociada con una mayor progresión, metástasis y resistencia a fármacos. [65] En cáncer de páncreas no se conoce la relación de esta vía y el pronóstico en pacientes, por lo que la información obtenida en este análisis proporciona datos relevantes con respecto al factor pronóstico de esta vía ya que se determinó que

RANK y RANKL se encuentran sobre expresados principalmente en tumores en comparación con tejido sano. Así mismo, a mayor expresión de RANK y RANKL menor es la probabilidad de supervivencia en pacientes con adenocarcinoma pancreático, por lo que el análisis presentado en este trabajo coincide con lo ya estudiado en otras neoplasias. Adicionalmente se llevó a cabo un análisis comparando la expresión de RANK, RANKL y OPG en diferentes tipos de cáncer, siendo el cáncer de páncreas el tipo con mayor expresión de RANK y RANKL por lo que esta vía resulta ser un potencial blanco terapéutico para cáncer de páncreas, aunado a los antecedentes y estudios realizados en otras neoplasias.

En el presente trabajo se realizó la inhibición de la vía de RANK mediante RNAs de interferencia logrando disminuir la población troncal del cáncer de páncreas en un 32% (CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>) demostrando que esta vía posee una participación en el mantenimiento de la población troncal en cáncer de páncreas. Yoldi y colaboradores encontraron que la inhibición de la vía de RANK mediante la proteína recombinante RANK-Fc reduce drásticamente la población troncal del cáncer de mama a través de la activación de mecanismos de diferenciación celular [54]. Corroborando nuestros resultados, un estudio realizado por Chu y colaboradores demostraron la disminución de la población troncal de cáncer de próstata mediante la inhibición de la vía de RANK a través de un anticuerpo monoclonal que reconoce a RANKL. [66]

Estudios realizados por Chu y colaboradores demuestran la disminución de la expresión de algunos marcadores de pluripotencia como OCT4 y NANOG al inhibir la vía de RANK[66]. Los mecanismos por los cuales la vía de RANK regula la expresión de estos marcadores es desconocida, sin embargo, se sabe que la interacción entre RANK y RANKL desencadena la activación de la vía de NF- $\kappa$ B. [53] Adicionalmente Liu *et al* y Vázquez *et*

al demostraron que los genes de pluripotencia NANOG, SOX2 y algunas isoformas de la enzima ALDH son reguladas por la vía de NF- $\kappa$ B. [38], [67] El análisis presentado en este trabajo mostró que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de los factores de pluripotencia NANOG, SOX2, OCT4 y ALDH1A3 al inhibir RANK, sin embargo la expresión de ALDH8A1 se ve aumentada por lo que se reitera la relación inversamente proporcional entre la actividad de ALDH y la población troncal en cáncer de páncreas.

Evidencias recientes sugieren que los eventos biológicos que ocurren durante el establecimiento de la metástasis son similares al proceso de desarrollo embrionario. Durante la embriogénesis las células son capaces de moverse por el interior del embrión y viajar largas distancias y establecer nuevos puntos para la formación de órganos y tejidos. Durante la metástasis, las células cancerosas pueden invadir tejidos utilizando el sistema linfático y circulatorio para viajar largas distancias y establecer nuevos tumores. [57] La activación de la transición epitelio mesénquima juega un papel fundamental para la migración celular y el establecimiento de la metástasis. [68] Actualmente se sabe que la vía de RANK promueve la metástasis a hueso en cáncer de mama y de próstata, además de inducir el proceso de transición epitelio mesénquima. [55], [58] En el presente trabajo se demostró que el potencial migratorio celular se ve reducido significativamente al ser inhibida la vía de RANK por lo que los procesos por los que se ve regulada la migración celular en cáncer de mama y próstata parecen ser los mismos en cáncer de páncreas. Sin embargo, se necesitarían realizar más experimentos para corroborar esta hipótesis.

Finalmente, la inhibición de RANK disminuye la proliferación celular a las 96 hrs por lo que la vía de RANK pudiera estar participando en los mecanismos que regulan este fenómeno en las células tumorales en cáncer de páncreas. Un estudio realizado por Brantley y colaboradores demostró que la sobre activación de la vía de NF- $\kappa$ B promueve la proliferación de células malignas en el epitelio mamario en ratones [69], por lo que la



disminución de la proliferación en cáncer de páncreas podría deberse a una baja activación de la vía de NF-kB debido a la inhibición de RANK. [53]

## **XI. CONCLUSIÓN**

En este trabajo se realizó una caracterización de la vía de RANK en 3 líneas celulares de cáncer de páncreas, así mismo se realizó la determinación de la población troncal y la actividad de ALDH en cada una de las líneas celulares. Adicionalmente se evaluó la participación de la vía de RANK en las CTC de páncreas, determinando que es una vía importante para la migración celular, la proliferación y el mantenimiento de la población troncal.

En este trabajo se determinó que BXPC-3 es la línea celular de adenocarcinoma pancreático con mayor expresión de RANKL y una menor expresión de OPG. Así mismo, BXPC-3 es la línea con mayor número de células troncales CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup> y HPAF-II es la línea celular con mayor actividad de ALDH, por lo que se observó que la actividad de ALDH es inversamente proporcional al número de células troncales.

Por otra parte, se estableció que el adenocarcinoma pancreático es el tipo de cáncer con mayor expresión de RANK y RANKL. Así mismo RANK y RANKL se encuentran sobre expresados en tejido tumoral en comparación con tejido normal y que una mayor expresión de estos componentes conlleva menor probabilidad de supervivencia en los pacientes con cáncer de páncreas.

Finalmente, se determinó que la inhibición de RANK reduce la capacidad migratoria, la proliferación celular a las 96 hrs, así como la población troncal CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup> en células BXPC-3. Sin embargo, la inhibición de RANK provocó un aumento en la expresión

de una de las isoformas de la enzima ALDH corroborando la relación antes mencionada entre la población troncal y la actividad de esta enzima.

El presente trabajo muestra la participación que tiene la vía de RANK en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas, así como su valor pronóstico en datos de pacientes. Por otra parte, demuestra el papel de esta vía como posible blanco terapéutico dirigido contra la población troncal en cáncer de páncreas.

## XII. REFERENCIAS

- [1] World Health Organization *et al.*, "WHO | Cancer," *Ann. Oncol.*, 2014.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [3] D. Hanahan, *et al.*, "The Hallmarks of Cancer" *Cell*. vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [4] L. Hayflick, "Mortality and immortality at the cellular level. A review," *Biochemistry*, vol. 62, pp.1180-1190, 1997.
- [5] WHO, "Globocan 2018 - Home," *Globocan 2018*. 2018.
- [6] A. Mohar-Betancourt, *et al.*, "Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies," *J. Glob. Oncol.*, vol. 3, no. 6, pp. 740–748, 2017.
- [7] C. Lu, *et al.*, "Screening for pancreatic cancer in familial high-risk individuals: A systematic review," *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 28, pp. 8678–8686, 2015.
- [8] J. Kleeff, *et al.*, "Pancreatic cancer," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 2, no. 04, pp. 1–23, 2016.
- [9] L. Rahib, *et al.*, "Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030 : The Unexpected Burden of Thyroid , Liver , and Pancreas Cancers in the United States," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 11, pp. 2913-2921, 2014.
- [10] H. Ying *et al.*, "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma," *Genes Dev.*, vol. 30, no. 4, pp. 355–385, 2016.
- [11] R. L. Siegel, *et al.*, "Cancer Statistics , 2015," vol. 65, no. 1, pp. 5–29, 2015.
- [12] J. He *et al.*, "2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution : trends over three decades," *HBP* vol. 16, no. 1, pp. 83–90, 2014.
- [13] C. Bosetti *et al.*, "Cigarette smoking and pancreatic cancer: An analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PANC4)," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1880-1888, 2012.
- [14] S. C. Larsson and A. Wolk, "Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: Meta-analysis of prospective studies," *Br. J. Cancer*, vol. 106, no. 3, pp. 603-607, 2012.
- [15] S. T. Chari *et al.*, "Pancreatic Cancer-Associated Diabetes Mellitus: Prevalence and Temporal Association With Diagnosis of Cancer," *Gastroenterology*, vol. 134, no. 1, pp. 95-101, 2008.
- [16] L. D. Wood and R. H. Hruban, "Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms," *Cancer Journal*, vol. 18, no. 6, pp. 492-501, 2012.
- [17] S. Jones *et al.*, "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses," *Science*, vol. 321, no. 5897, pp. 1801-1806, 2008.
- [18] M. Pasca di Magliano *et al.*, "Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma," *PLoS One*, vol. 2, no. 11, pp. e1155, 2007.
- [19] J. Tanizaki, *et al.*, "Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification," *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 6, pp. 807-813, 2011.
- [20] A. Jesse Gore, *et al.*, "Pancreatic cancer-Associated retinoblastoma 1 dysfunction enables TGF- $\beta$  to promote proliferation," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 1, pp. 338-352, 2014.
- [21] J. E. Visvader and G. J. Lindeman, "Cancer stem cells: Current status and evolving complexities," *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 717–728, 2012.
- [22] L. L. Campbell and K. Polyak, "Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution?," *Cell Cycle*. vol. 6, no. 19, pp. 2332-2338, 2007.
- [23] M. Shackleton, *et al.*, "Essay Heterogeneity in Cancer : Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution," *Cell*. vol. 138, no. 5, pp. 822–829, 2009.
- [24] R. Weiskirchen, "Intratumor heterogeneity, variability and plasticity: questioning the current concepts in classification and treatment of hepatocellular carcinoma,"

- Hepatobiliary Surg. Nutr.*, vol. 5, no. 2, pp. 183-187, 2016.
- [25] L. Han, *et al.*, "Cancer stem cells : therapeutic implications and perspectives in cancer therapy," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 3, no. 2, pp. 65–75, 2013.
- [26] J. M. Rosen and C. T. Jordan, "NIH Public Access," *Science.*, vol. 324, no. 5935, pp. 1670–1673, 2010.
- [27] P. A. Sotiropoulou, *et al.*, "Chemical approaches to targeting drug resistance in cancer stem cells," *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 10, pp. 1547–1562, 2014.
- [28] T. Lapidot *et al.*, "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice," *Nature*, vol. 367, no. 6464, pp. 645-648, 1994.
- [29] D. Bonnet and J. E. Dick, "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell," *Nat. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 730-737, 1997.
- [30] M. E. Ciurea *et al.*, "Cancer stem cells: Biological functions and therapeutically targeting," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 8169–8185, 2014.
- [31] J. Xia *et al.*, "Targeting pancreatic cancer stem cells for cancer therapy," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. vol. 1826, no. 2, pp. 385-399, 2012.
- [32] E. H. Huang *et al.*, "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 8, pp. 3382-3389, 2009.
- [33] Z. A. Rasheed and W. Matsui, "Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. vol. 27, no. 2, pp. 15-18, 2012.
- [34] T. L. Fitzgerald and J. A. Mccubrey, "Advances in Biological Regulation Pancreatic cancer stem cells : Association with cell surface markers , prognosis , resistance , metastasis and treatment," *Adv. Biol. Regul.*, vol. 56, pp. 45–50, 2014.
- [35] P. C. Hermann *et al.*, "Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 313–323, 2007.
- [36] M. P. Kim *et al.*, "ALDH Activity Selectively Defines an Enhanced Tumor- Initiating Cell Population Relative to CD133 Expression in Human Pancreatic Adenocarcinoma," vol. 6, no. 6, pp. 1–11, 2011.
- [37] E. V. Abel *et al.*, "The notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, pp. e91983, 2014.
- [38] K. Vazquez-Santillan, *et al.*, "NF- $\kappa$ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target?," *Cell. Oncol.*, vol. 38, no. 5, pp. 327–339, 2015.
- [39] V. F. S. Shih, *et al.*, "A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling," *Cell Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 86–102, 2011.
- [40] A. Oeckinghaus and S. Ghosh, "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. vol. 1, no. 4, pp. e000034, 2009.
- [41] G. Bonizzi and M. Karin, "The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity," *Trends in Immunology*. vol. 25, no. 6, pp. 280-288, 2004.
- [42] P. J. Jost and J. Ruland, "Review in translational hematology Aberrant NF-  $\kappa$ B signaling in lymphoma : mechanisms , consequences , and therapeutic implications," *Blood*, vol. 109, no. 7, pp. 2700–2708, 2015.
- [43] X. Dolcet, *et al.*, "NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer," *Virchows Arch.*, vol. 446, no. 5, pp. 475–482, 2005.
- [44] Y. Wittrant *et al.*, "RANKL/RANK/OPG: New therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. vol. 1704, no. 2, pp. 49-57, 2004.
- [45] D. L. Lacey *et al.*, "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast

- differentiation and activation," *Cell*, vol. 93, no. 2, pp. 165-176, 1998.
- [46] S. Theoleyre, *et al.*, "The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 15, no. 6, pp. 457-475, 2004.
- [47] J. Y. Chung, *et al.*, "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction," *J. Cell Sci.*, vol. 12, no. 18, pp. 2821-2830, 2002.
- [48] F. Arai *et al.*, "Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor kb (Rank) Receptors," *J. Exp. Med.*, vol. 190, no. 12, pp. 1741-1754, 1999.
- [49] Y.-Y. Kong and J.M. Penninger, "Molecular control of bone remodeling and osteoporosis," *Exp. Gerontol.*, vol. 35, no. 8, pp. 947-956, 2000.
- [50] C. A. Smith, *et al.*, "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death," *Cell*, vol. 76, no. 6, pp. 959-962, 1994.
- [51] M. L. Cheng and L. Fong, "Effects of RANKL-Targeted Therapy in Immunity and Cancer," *Front. Oncol.*, vol. 3, pp. 1-8, 2014.
- [52] J. E. Fata *et al.*, "The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development," *Cell*, vol. 103, no. 1, pp. 41-50, 2000.
- [53] B. F. Boyce and L. Xing, "The RANKL / RANK / OPG Pathway," *Epidemiol. Pathophysiol. Accessory*, vol. 5, pp. 98-104, 2007.
- [54] G. Yoldi *et al.*, "RANK signaling blockade reduces breast cancer recurrence by inducing tumor cell differentiation," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 19, pp. 5857–5869, 2016.
- [55] M. Palafox *et al.*, "RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 11, pp. 2879–2888, 2012.
- [56] A. Liu, *et al.*, "Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference," *Clin. J. Cancer*, vol. 32, no. 9, pp. 483–487, 2013.
- [57] M. López-lázaro, "The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site . Rethinking metastasis .," vol. 2, no. 5, 2015.
- [58] N. Renema, *et al.*, "RANK-RANKL signalling in cancer," *Biosci. Rep.*, vol. 36, no. 4, pp. e00366–e00366, 2016.
- [59] A. Bairoch, "The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource," *J. Biomol. Tech.*, vol. 29, no. 2, pp. 25-38, 2018.
- [60] G. Berrozpe, *et al.*, "Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer," vol. 191, pp. 185–191, 1994.
- [61] N. Takebe, *et al.*, "REvIEWS notch , and Hedgehog pathways," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 8, no. 2, pp. 97–106, 2010.
- [62] H. J. Wei, *et al.*, "Expression of CD44, CD24 and ESA in pancreatic adenocarcinoma cell lines varies with local microenvironment," *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 10, no. 4, pp. 428–434, 2011.
- [63] C. Li *et al.*, "Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells," *Am. Assoc. Cancer Res. Journals*, vol. 67, no. 3, pp. 1030–1038, 2007.
- [64] J. Fredebohm *et al.*, "Establishment and Characterization of a Highly Tumourigenic and Cancer Stem Cell Enriched Pancreatic Cancer Cell Line as a Well Defined Model System," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, 2012.
- [65] P. A. Van Dam *et al.*, "Critical Reviews in Oncology / Hematology RANK / RANKL signaling inhibition may improve the effectiveness of checkpoint blockade in cancer treatment," vol. 133, no. 11, pp. 85–91, 2019.
- [66] G. C. Y. Chu *et al.*, "RANK-and c-Met-mediated signal network promotes prostate cancer metastatic colonization," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 21, no. 2, pp. 311-326,

2014.

- [67] M. Liu *et al.*, "The canonical NF- $\kappa$ B pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 24, pp. 10464-10473, 2010.
- [68] J. Lim and J. P. Thiery, "Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development," *Development*, vol. 139, no. 19, pp. 3471-3486, 2012.
- [69] F. E. Yull *et al.*, "Nuclear Factor- B (NF- B) Regulates Proliferation and Branching in Mouse Mammary Epithelium," *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 1445–1455, 2013.