



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Exploración del proteoma resistente a la
inhibición de MEK y PI3K en un modelo *in
vitro* de cáncer de páncreas**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Presenta:

César Alain Aguilar Valdés

Director de tesis: Dr. Juan Francisco Martínez Aguilar

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



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

U.N.A.M.
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 CORTÁZAR 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

Exploración del proteoma resistente a la inhibición de MEK y PI3K en un modelo *in vitro* de cáncer de páncreas.

Que presenta el pasante: César Alain Aguilar Valdés

Con número de cuenta: 306065048 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 03 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dr. Juan Francisco Martínez Aguilar	
1er. SUPLENTE	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
2do. SUPLENTE	L.B.D. 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

Gracias a mi madre por su apoyo, sus consejos, por alentarme a concluir mis estudios y cumplir mis metas. Gracias a mis hermanos que son mi motivación y a mi familia por apoyarme en todo momento.

Agradezco especialmente a mis amigos Pedro, Vicente, Juan, Daniela y Zita, porque sin ellos este logro no sería posible. Gracias también a Mextli, por ser una aliada de estudio excepcional y una gran amiga. De igual forma le agradezco a Hilda, César, Antonio e Isaac por acompañarme durante todo este tiempo.

Gracias a mi jefe y amigo, César, por enseñarme la importancia del trabajo y el conocimiento.

Gracias a mi asesor, Juan, por confiar en mi y por todo el apoyo que me ha brindado.

Gracias a todos aquellos que me han mostrado el camino y me brindaron la oportunidad de ser mejor cada día.

**Esta tesis fue realizada en la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) de la
Universidad Nacional Autónoma de México**

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA207517

Índice

Página

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Cáncer de páncreas.....	3
1.2. Bases moleculares del cáncer de páncreas.....	4
1.2.1. KRas mutante en el cáncer de páncreas.....	4
1.2.2. Vías de señalización de KRas.....	5
1.2.2.1. Vía PI3K/Akt.....	5
1.2.2.2. Vía Raf/MEK/ERK.....	5
1.3. STAT3.....	7
1.4. La inhibición de MEK y PI3K para el tratamiento del cáncer de páncreas.....	8
1.5. Ensayos de viabilidad celular.....	9
1.6. Análisis de proteínas.....	11
1.6.1. Ensayo de BCA.....	11
1.6.2. Western Blot.....	13
1.6.3. Proteómica basada en espectrometría de masas.....	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos particulares.....	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1. Cultivo celular.....	19
4.2. Ensayos de viabilidad celular.....	19
4.3. Tratamientos.....	21
4.4. Lisis celular.....	21
4.5. Cuantificación de proteína total.....	21
4.6. Western blot.....	21
4.7. Identificación y cuantificación relativa de los proteomas celulares.....	23
4.7.1. Fraccionamiento por intercambio aniónico.....	23
4.7.2. Fraccionamiento por fase reversa a pH básico.....	24
4.7.3. Análisis mediante Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas.....	25
5. RESULTADOS	27
5.1. Resultados de viabilidad celular.....	27
5.1.1. Viabilidad celular con el inhibidor de MEK (AZD6244).....	27
5.1.2. Viabilidad celular con el inhibidor de PI3K (GDC-0941).....	30
5.1.3. Viabilidad celular con la combinación de los inhibidores AZD6244 y GDC-0941.....	33
5.1.4. Viabilidad de las células PANC-1 con el inhibidor de STAT3 (Stattic).....	35
5.1.5. Viabilidad de las células PANC-1 con el inhibidor de MEK (AZD6244) en combinación con el inhibidor de STAT3 (Stattic).....	37
5.1.6. Viabilidad de las células PANC-1 con el inhibidor de PI3K (GDC-0941) en combinación con el inhibidor de STAT3 (Stattic).....	38
5.2. Resultados del análisis proteómico basado en espectrometría de masas.....	40
5.3. Resultados de viabilidad de las células resistentes PANC-1 con fármacos seleccionados.....	47

5.3.1.	Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco 6-aminonicotinamida (6AN).....	47
5.3.2.	Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco metformina.....	50
5.3.3.	Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco 2-desoxi-D-glucosa (2DG).....	52
5.3.4.	Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco 2DG en combinación con Stattic.....	54
5.4.	Resultados de Western blot.....	56
5.4.1.	Tratamientos con AZD6244 y GDC0-941 de las células MIA PaCa-2 y PANC-1.....	56
5.4.2.	Validación de los resultados obtenidos por espectrometría de masas.....	61
5.4.3.	Expresión relativa de p-Akt y p-ERK basales en MIA PaCa-2 y PANC-1....	62
5.4.4.	Tratamiento de las células PANC-1 con Stattic y 2DG.....	63
6.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
6.1.	Efecto de la inhibición de las cinasas MEK y PI3K sobre la viabilidad de las células MIA PaCa-2 y PANC-1.....	64
6.2.	Regulación de las vías de señalización de MEK y PI3K en las células MIA PaCa-2.....	65
6.3.	Regulación de las vías de señalización de MEK y PI3K en las células PANC-1.....	67
6.4.	Respuesta de la viabilidad de células PANC-1 a la inhibición de STAT3 en combinación con los inhibidores de AZD6244 y GDC-0941.....	68
6.5.	El proteoma resistente.....	68
6.5.1.	G6PD.....	68
6.5.2.	LDHB.....	71
6.5.3.	Complejo 1 de la cadena de transporte de electrones.....	73
6.5.4.	MCT4, transportador de lactato.....	74
6.5.5.	IDH2.....	75
6.5.6.	Respuesta del proteoma resistente al tratamiento con 2DG.....	75
6.5.7.	Akt2.....	77
6.5.8.	Proteínas relacionadas con β -oxidación de ácidos grasos y metabolismo de lípidos.....	79
6.5.9.	Transportadores de la familia ABC.....	81
6.5.10.	Caveolina 1.....	82
6.5.11.	Fosfatasa PP2A.....	84
6.5.12.	Proteína de choque térmico.....	85
7.	CONCLUSIONES	87
8.	REFERENCIAS	89
9.	APÉNDICE	97

ABREVIATURAS

ABCC1	<i>multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)</i>
ABCC4	<i>multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4)</i>
ABCD1	<i>ATP-binding cassette sub-family D member 1</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
ACSL4	<i>long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4</i>
ADP	adenocarcinoma ductal pancreático
Akt	<i>protein kinase B</i>
6AN	6-aminonicotinamida
AZD6244	inhibidor de MEK
Cav-1	<i>caveolin 1</i>
CPT1A	<i>carnitine O-palmitoyltransferase 1A</i>
2DG	2-desoxi-D-glucosa
4E-BP1	<i>eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1</i>
ECH1	<i>Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial</i>
ECI1	<i>enoyl-CoA delta isomerase 1</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ETC	<i>electron transport chain</i>
G6PD	<i>glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>
GDC-0941	inhibidor de PI3K
IDH2	<i>isocitrate dehydrogenase 2</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
LDHB	<i>lactate dehydrogenase B</i>
MCT4	<i>monocarboxylate transporter 4</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NADH/NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido reducido/oxidado
NADPH/NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido/oxidado
OXPPOS	<i>oxidative phosphorylation</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Stattic	inhibidor de STAT3
VPF	vía de las pentosas fosfato

RESUMEN

El adenocarcinoma ductal pancreático es uno de los padecimientos más letales debido a que la cantidad de pacientes que superan los 5 años de vida después del diagnóstico es menor a 7%. En 2018 este padecimiento representó el 2.5% del total de casos de cáncer estimados en México, mientras que el número de muertes asociadas correspondió al 92% de los nuevos casos diagnosticados.

El tratamiento actual contra este padecimiento es principalmente la quimioterapia con agentes citotóxicos como gemcitabina o FOLFIRINOX. Debido a la poca eficacia que estos fármacos ofrecen para incrementar la supervivencia de los pacientes, se ha contemplado a la terapia molecular dirigida como una posible estrategia terapéutica. Esta se basa en la inhibición de cinasas específicas de dos vías de señalización involucradas en el desarrollo y mantenimiento del cáncer de páncreas, la vía PI3K/Akt y la vía Raf/MEK/ERK. Ambas vías desencadenan la activación de un gran número de proteínas relacionadas con respuestas celulares proliferativas y antiapoptóticas. Sin embargo, existen células de cáncer de páncreas capaces de resistir esta inhibición. En este trabajo se estudió a las células MIA PaCa-2 y PANC-1 como un modelo de la resistencia natural a la inhibición de las cinasas MEK y PI3K, investigando la composición de sus proteomas, el efecto de fármacos específicos sobre la viabilidad celular, los cambios en la señalización y los posibles mecanismos moleculares asociados a la resistencia.

Para esta investigación primero se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular utilizando los fármacos AZD6244 y GDC-0941, los cuales inhiben la actividad de las cinasas MEK y PI3K, respectivamente. Estos ensayos permitieron determinar que la viabilidad de las células MIA PaCa-2 es sensible a la inhibición de estas cinasas, mientras que la viabilidad de las células PANC-1 es resistente a la inhibición de MEK y parcialmente resistente a la inhibición de PI3K. La inhibición farmacológica de las vías Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt se corroboró por medio de Western blot, observando la disminución en la fosforilación de los sustratos de MEK y PI3K. También se encontró que el tratamiento con AZD6244 y GDC-0941 genera alteraciones en la fosforilación del factor de transcripción STAT3. Para el estudio de los proteomas se realizó un extensivo fraccionamiento de péptidos, que se analizaron por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Se realizó una cuantificación relativa de 4 808 proteínas y se encontraron 743 proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2.

En comparación con las células MIA PaCa-2, las células resistentes PANC-1 sobreexpresan proteínas relacionadas al metabolismo como G6PD, IDH2, LDHB, proteínas de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones, proteínas implicadas en la β -oxidación de ácidos

grasos y el metabolismo lipídico como ECI1, ECH1, CPT1A, ASCL4 y SCD. También se encontró un aumento en la expresión de los transportadores de membrana ABCG2 y ABCC1, mientras que la fosfatasa PP2A, implicada en la resistencia a la inhibición de MEK, se encontró subexpresada. El análisis bioinformático indicó que estas proteínas representan procesos o funciones moleculares como la respuesta a fármacos, actividad oxidorreductasa y la fosforilación oxidativa, entre otros. Considerando los resultados proteómicos, se evaluó y demostró que la viabilidad de las células PANC-1 es susceptible a la inhibición de la actividad de la enzima G6PD, el complejo I de la cadena de transporte de electrones, el factor de transcripción STAT3 y del metabolismo de glucosa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de páncreas

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) representa aproximadamente el 85% de los casos de cáncer de páncreas. Inicia como lesiones en el epitelio ductal pancreático, denominadas PanIN (*Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*) que desarrollan morfología anormal y un comportamiento proliferativo [1-3]. Además, se ha encontrado que cerca del 90% de los casos con este padecimiento (ADP) tienen una mutación del gen *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma*) [4].

El cáncer de páncreas es una de las neoplasias más letales: la proporción de pacientes que superan los 5 años de vida después del diagnóstico es menor a 7% [2]. La extracción del tumor por cirugía es el único tratamiento curativo, pero en la mayoría de los casos no puede llevarse a cabo dado que solo 15% de los pacientes es elegible. Aún después de la cirugía, solo 15 a 25% de los pacientes tiene una esperanza de vida mayor a 5 años [3].

La mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas son diagnosticados después de los 50 años. Entre los factores de riesgo asociados al cáncer de páncreas se encuentran la poca actividad física, obesidad, tabaquismo, diabetes mellitus de larga evolución y la pancreatitis crónica [3, 5].

Se estima que en el año 2018 se diagnosticaron 458 918 nuevos casos de cáncer de páncreas alrededor del mundo, de los cuales el 50% ocurrió en países desarrollados [6], convirtiéndose así en una de las principales causas de muerte relacionadas al cáncer en estos países [7]. En México se estimaron 4 849 nuevos casos de cáncer de páncreas diagnosticados en 2018, que representan 2.5% del total de casos y lo posicionan en el doceavo lugar en la lista de nuevos diagnósticos de cáncer de ese año en nuestro país. El aspecto más preocupante proviene del número estimado de muertes, que en ese mismo periodo fueron 4 475 y significa una mortalidad de 92% con respecto a los nuevos casos. Tal porcentaje se encuentra solo por debajo de la mortalidad por cáncer de hígado (95%) y de esófago (97%) en México [6].

El tratamiento estándar para el cáncer de páncreas es la quimioterapia con gemcitabina, un fármaco que inhibe la síntesis de ADN pero que solo resulta en una supervivencia media de 5.91 meses, además de producir efectos adversos derivados de su toxicidad. Debido a esto se han probado tratamientos alternos para aumentar la esperanza de vida, por ejemplo, la combinación de gemcitabina con erlotinib, que es un inhibidor de un receptor tirosina-cinasa; sin embargo, los resultados indican solo un incremento mínimo en la supervivencia (6.24 vs. 5.91 meses) [8]. Otros tratamientos emplean una combinación de varios fármacos citotóxicos, denominada FOLFIRINOX, que ofrece mayor supervivencia media (11.1 meses) con respecto a la

administración de gemcitabina pero que también produce más efectos tóxicos, por lo que solo se recomienda en pacientes con un estado aceptable de salud [9].

Debido a estos inconvenientes y la poca eficacia de los tratamientos actuales, se han empezado a estudiar tratamientos como la terapia molecular dirigida, que en el caso del cáncer de páncreas se enfoca principalmente a la inhibición de dos vías de señalización importantes en el desarrollo y mantenimiento de la señal oncogénica, la vía PI3K/Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) y la vía Raf/MEK/ERK (*rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)/mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)*).

1.2. Bases moleculares del cáncer de páncreas

1.2.1. KRas mutante en el cáncer de páncreas

Las mutaciones del gen *KRAS* se han encontrado en más del 90% de los casos de cáncer de páncreas y son responsables de mantener activa a la proteína KRas [4]. La mutación puntual más común ocurre en el codón 12 (exón 2), en la cual tiene lugar un reemplazo de la secuencia GGT (codificante para glicina) por la secuencia GAT (ácido aspártico –G12D– c.35G>A), GTT (valina –G12V– c.35G>T) o CGT (arginina –G12R– c.34G>C), principalmente [10]. El rol fundamental de las mutaciones en el gen *KRAS* para el desarrollo y progreso del cáncer de páncreas es ampliamente reconocido y la evidencia experimental con experimentos utilizando modelos murinos muestra que la inactivación de *KRAS* conduce a una recuperación de las lesiones pancreáticas [11].

El gen *KRAS* codifica la proteína de tipo guanosín trifosfatasa KRas, que interactúa con receptores de factores de crecimiento membranales (e.g. EGFR, *epidermal growth factor receptor*) cuando estos son activados por factores externos y los enlaza con las vías de señalización dentro de la célula [10]. Debido a esta actividad, la proteína KRas está muy relacionada con la homeostasis celular. Tal es su importancia en las células, que estudios genéticos han determinado que al eliminar tres loci de Ras (HRas, NRas y KRas) las células no tienen la capacidad de proliferar [12].

Cuando los receptores tirosina cinasa se activan, la proteína adaptadora Grb2 se une a ellos y recluta a uno de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs por sus siglas en inglés) llamado SOS (*son of sevenless*) el cual interactúa con KRas para mejorar su unión a guanosín trifosfato (GTP) y con ello inducir su activación. En condiciones normales el siguiente paso es la hidrólisis de GTP a guanosín difosfato (GDP), por acción de las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), lo que inactiva a KRas. Sin embargo, cuando la mutación puntual del gen *KRAS* está presente, ocurre una alteración en la proteína KRas que le impide hacer el intercambio

de GTP a GDP [13, 14]. Por ende, se mantienen a su vez activas las vías de señalización como PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK [10] (ver Figura 1).

1.2.2. Vías de señalización de KRas

Las vías de señalización PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK, son parte fundamental de los procesos celulares del crecimiento y la proliferación celular. Cuando estas vías sufren una alteración que mantenga su activación, ocurren cambios en el control de la proliferación y generan una respuesta antiapoptótica que favorece el desarrollo de cáncer [15] (Figura 1).

1.2.2.1. Vía PI3K/Akt

En el cáncer de páncreas, la persistente activación de PI3K se explica por la capacidad de KRas mutante de activar la subunidad catalítica p110 de la cinasa PI3K, que fosforila a PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) para que se convierta en el mensajero secundario conocido como PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*), molécula que induce, mediante la acción de la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítido (Pdk1), la activación de Akt [15, 16]. Cuando la proteína Akt está activa es capaz de favorecer la supervivencia de las células debido a que tiene un efecto inhibitorio de moléculas involucradas en la muerte celular, como la procaspasa-9, FoxO1 y Bad, además de activar a MDM2 (Murine Double Minute 2) que es un regulador negativo del supresor tumoral p53, que tiene la función de detener el ciclo celular al unirse al ADN e impedir la transcripción [17, 18]. La inhibición de las vías proapoptóticas derivada de la activación de Akt sustenta la capacidad de supervivencia y proliferación celular [15].

Otro de los efectos de la activación de PI3K es activar, cascada abajo, a los complejos 1 y 2 de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). El complejo mTORC1 juega un papel importante como supresor de la autofagia, además es un regulador de la síntesis de proteínas y de la producción de lípidos y nucleótidos [19]. Esto es debido a su capacidad de fosforilar dos sustratos importantes. Uno de ellos es S6K (*S6 kinase*), que fosforila a la proteína ribosomal S6 y favorece el crecimiento de la célula. El segundo sustrato es 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1*) [20], que al estar fosforilado se separa del factor eIF4E y permite que se lleve a cabo el proceso de traducción para la síntesis de proteínas [21]. Por su parte, el complejo mTORC2 está implicado en la activación de Akt, que a su vez fosforila una variedad de sustratos relacionados con la supervivencia, proliferación y migración celular [19].

1.2.2.2. Vía Raf/MEK/ERK

KRas también activa otra de las vías centrales en la red de señalización intracelular, la cascada MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Raf/MEK/ERK. En esta cascada de tres niveles, una o más cinasas en cada nivel fosforila y activa componentes del siguiente nivel, hasta que, cascada

abajo, sus componentes fosforilan moléculas reguladoras que inician el proceso fisiológico requerido [22]. En la vía MAPK Raf/MEK/ERK la proteína cinasa Raf es activada por la proteína KRas en la membrana plasmática; Raf fosforila a MEK y esta a su vez fosforila y activa a la proteína cinasa ERK. Tras la activación de esta última proteína, se fosforilan una gran cantidad de sustratos, algunos localizados en el citoplasma y otros en el núcleo. ERK dirige una regulación en el núcleo de factores de transcripción (e.g. c-Myc, Elk-1, AP-1), modula el progreso del ciclo celular (e.g. inducción de Cdk4, cyclin D1) y la proliferación (e.g. fosforilación de FOXO3a, represión de Bim) [22]. FOXO3a por ejemplo, es una proteína capaz de unirse a secuencias específicas del ADN que al ser fosforilada sufre una translocación desde el núcleo al citoplasma [23], alterando la transcripción de proteínas relacionadas en procesos como el desarrollo celular y la resistencia al estrés oxidativo, entre otros [24, 25].

Las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK muestran intercomunicación. Un resultado de la inhibición de la vía PI3K/Akt es la activación de la vía de MEK. Aunque Akt tiene varios sustratos cascada abajo que permiten la proliferación celular, existe evidencia de que Akt es capaz de fosforilar a Raf. Esto se ha comprobado en estudios con inhibidores de PI3K/Akt, donde se observa mayor actividad de Raf, o también en estudios de sustitución por alanina en los residuos de serina que puede fosforilar Akt, lo cual impide la fosforilación de Raf por Akt [26]. Por otro lado, la inhibición de MEK también ha demostrado una activación de Akt, lo que supone una regulación negativa de Akt por la vía Raf/MEK/ERK [13, 27, 28]. Sin embargo, y a pesar de esta regulación negativa entre ambas vías, se ha demostrado que ERK es capaz de fosforilar al supresor tumoral e inhibidor de mTORC1, TSC (*tuberous sclerosis protein*) función que Akt también puede realizar [29]. Otra interacción de los efectores de estas dos vías es la fosforilación de 4E-BP1 por ERK al igual que lo hace mTORC1 [21].

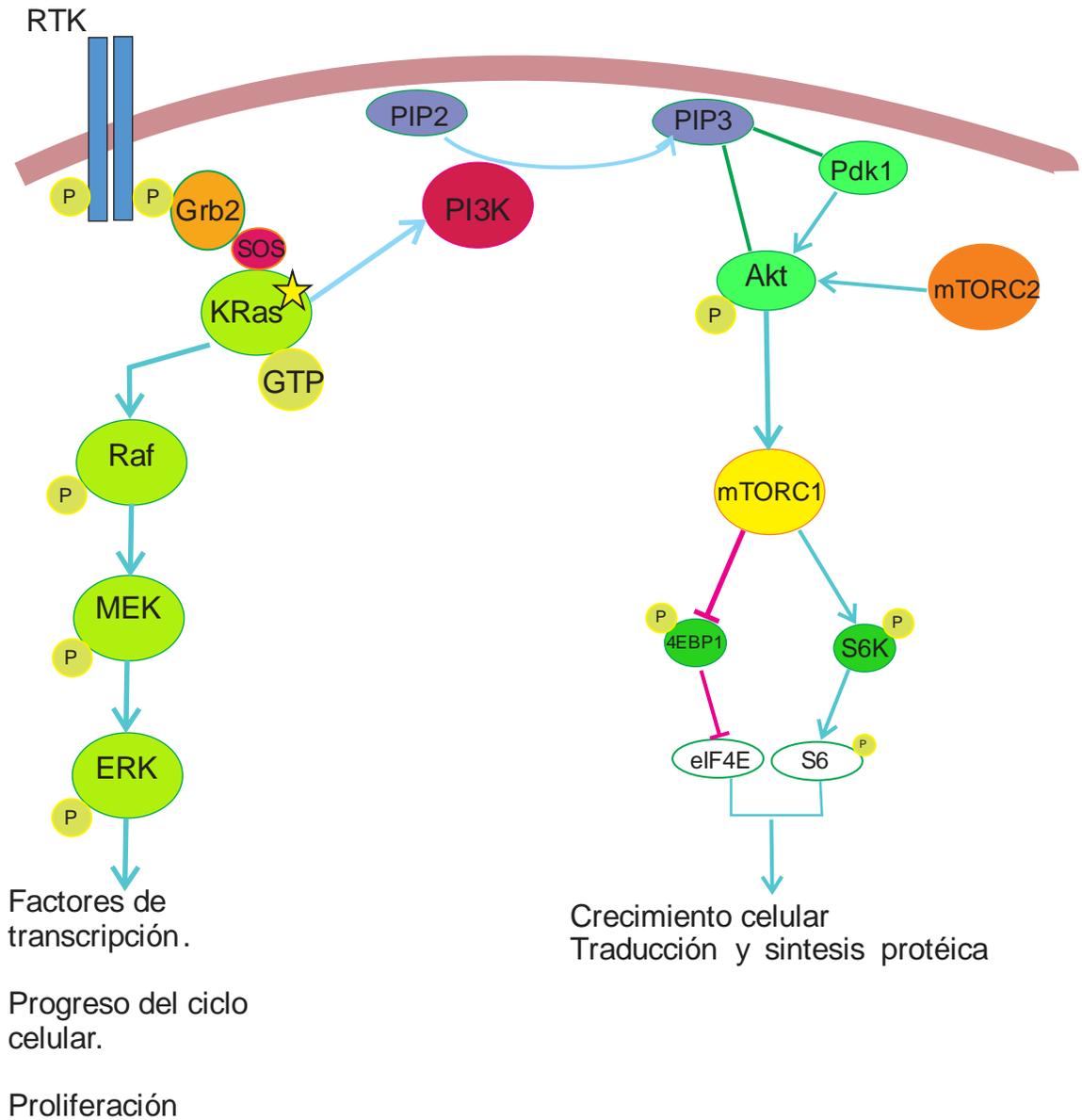


Figura 1. Vías de señalización relacionadas a KRas (PI3K/Akt y Ras/MEK/ERK) y algunos de sus sustratos y funciones como reguladores de la proliferación y supervivencia celular.

1.3. STAT3

Además de las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK activadas por KRas, otra proteína relacionada con el desarrollo de ADP es el transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*), que se encuentra activado en varios tipos de cáncer, incluyendo tumores y líneas celulares de cáncer de páncreas [30]. STAT3 está involucrado en la regulación de varios procesos celulares como la proliferación y la apoptosis, además interviene en el desarrollo y mantenimiento de tumores, angiogénesis y metástasis [30, 31]. Cuando los estímulos extracelulares activan ciertos receptores en la membrana plasmática, se activan

proteínas tirosina cinasa no receptoras que inducen la fosforilación de STAT3, el cual forma un homodímero que se transloca del citoplasma al núcleo y regula la transcripción de genes antiapoptóticos o relacionados con la proliferación celular (e.g. Bcl-XL, MCL1 y ciclina D1) [31-33]. Un aspecto importante de esta proteína en el cáncer de páncreas es su relación con la vía Raf/MEK/ERK y la resistencia a la inhibición de MEK; Nagathihalli *et al.* [34] encontraron que la inhibición de STAT3 causa la fosforilación de ERK por medio de la activación de EGFR y la consecuente activación de la vía Raf/MEK/ERK. En contraparte, la inhibición de MEK causa un incremento en la fosforilación de STAT3, como lo reportan Jain *et al.* [35], Chung *et al.* [36] y Sengupta *et al.* [37], quienes observaron que la cinasa ERK es capaz de inhibir la activación de STAT3. Nagathihalli *et al.* [34] también demostraron que al inhibir STAT3 y MEK al mismo tiempo es posible mejorar la supervivencia de un modelo murino de cáncer de páncreas.

1.4. La inhibición de MEK y PI3K para el tratamiento del cáncer de páncreas

Puesto que KRas mutante estimula las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt, asociadas a la supervivencia y proliferación celular, una estrategia razonable para interrumpir su actividad oncogénica es la inhibición de las cinasas MEK y PI3K. Algunas evaluaciones preclínicas han utilizado los inhibidores de MEK (AZD6244) y PI3K (GDC-0941). GDC-0941 es un fármaco oral que inhibe las 4 isoformas de PI3K y ha mostrado actividad antitumoral en algunas pruebas clínicas. AZD6244 es otro fármaco desarrollado para inhibir selectivamente y de manera ATP-no competitiva a las dos isoformas de MEK, lo que significa que AZD6244 se une a un sitio cercano al de unión con ATP y genera un cambio conformacional que impide la actividad de la enzima y por tanto bloquea la fosforilación de su sustrato ERK 1/2 [13, 38].

Alagesan *et al.* [39] realizaron estudios sobre el efecto de la administración del inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (BKM120/GDC-0941), solos y en combinación, en la supervivencia de ratones genéticamente diseñados para desarrollar cáncer de páncreas, demostrando un aumento en la supervivencia de los ratones tratados con la combinación con respecto al grupo control (131.5 días vs 71 días) así como en la comparación con los tratamientos individuales (AZD6244 90 días, BKM120 100 días). El análisis por resonancia magnética de los tumores de los ratones tratados con la combinación de inhibidores reveló una disminución inicial del tamaño a los siete días de tratamiento, aunque se encontró que la respuesta fue temporal ya que después de otros siete días los tumores volvieron a crecer. Estos resultados se corroboran en otro estudio realizado por Junttila *et al.* [40], que demostró que la combinación de los inhibidores de PI3K y MEK tiene una efectividad mayor comparada con los fármacos individuales para frenar el crecimiento de tumores en modelos murinos. Estos datos se relacionan con estudios previos que indican que las

vías Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt mantienen comunicación y se regulan negativamente [41], revelando la conveniencia de su inhibición conjunta.

No obstante, también se ha observado que algunas células de cáncer de páncreas pueden ser resistentes a los inhibidores GDC0941 y AZD6244. Por ejemplo, se ha visto que ambos inhibidores tienen un alto efecto antiproliferativo sobre las células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 pero solo un efecto menor en las células PANC-1 [42, 43]. Dado que PANC-1 y MIA PaCa-2 poseen un perfil similar de alteraciones genéticas (e.g. mutaciones en *KRAS* y *TP53*) [44], su respuesta diferencial a la inhibición de MEK y PI3K proporciona un modelo natural para estudiar la resistencia a la inhibición de estas cinasas en el cáncer de páncreas. Esta resistencia hace patente la complejidad molecular de este tipo de cáncer y la necesidad de identificar los componentes adicionales del proteoma que mantienen la proliferación celular.

1.5. Ensayos de viabilidad celular

Cuando las células son expuestas a fármacos que afectan su viabilidad y capacidad de proliferación, es necesario conocer cuál es la proporción de células vivas en la muestra con respecto a las células control después de concluir el tratamiento. Para ello existen varios métodos colorimétricos, por ejemplo los métodos por tinción, o los métodos de reducción de sales de tetrazolio. Entre los métodos para determinar la viabilidad de células por tinción se encuentra el de violeta cristal, que se basa en la tinción de las proteínas y ADN y en el hecho de que las células vivas se mantienen adheridas a la superficie de la placa de cultivo mientras que las no vivas se desprenden [45, 46]. De los métodos basados en la reducción de sales de tetrazolio destacan el método de MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] y el de tetrazolio soluble en agua (WST, *water soluble tetrazolium*) del kit comercial CCK-8 [*4-(3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate sodium salt*] [47]. Estos métodos utilizan sales de tetrazolio como reactivo y se basan en la acción reductora de coenzimas como NADH y NADPH, que forman parte del metabolismo celular, para transformar las sales de tetrazolio en compuestos de tipo formazán (Figura 2), produciendo un cambio de color en el medio. La cantidad de formazán formado es directamente proporcional a la cantidad de células vivas que se encuentran en la muestra y se puede estimar por la lectura de absorbancia.

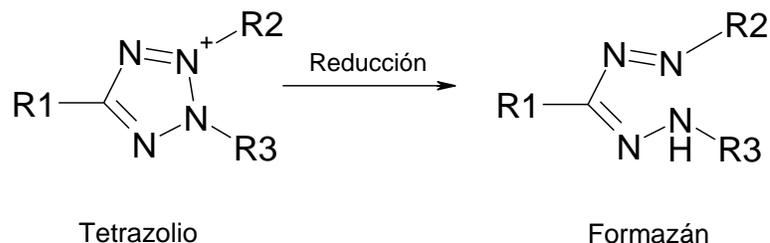


Figura 2. Estructura general de un tetrazolio y su formazán correspondiente. Tomado y modificado de [48]

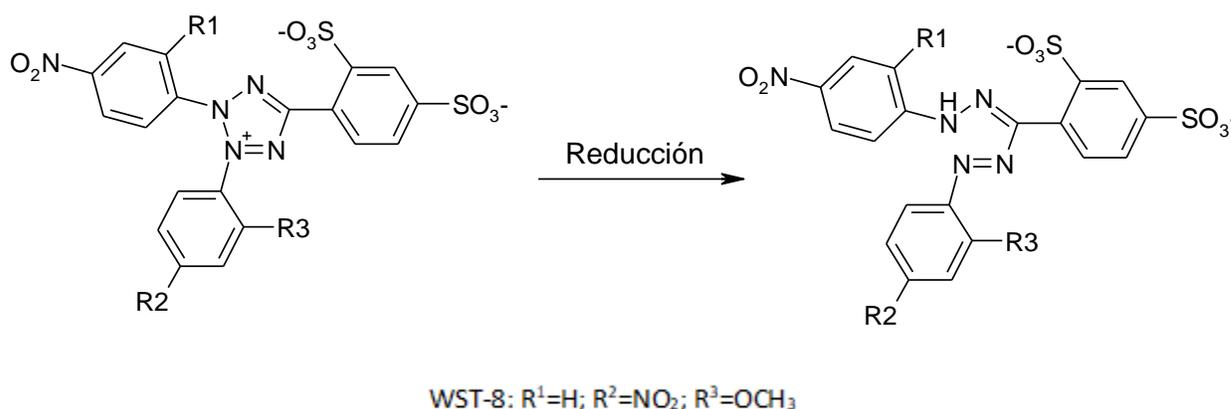


Figura 3. Reacción de reducción de una sal de tetrazolio (WST-8) a un formazán colorido soluble en agua. Tomado y modificado de [47].

En el caso de MTT, la reducción proviene de las deshidrogenasas mitocondriales, formando un formazán púrpura insoluble en agua [48]. Debido a la precipitación, es necesario agregar un solvente orgánico para solubilizar los cristales y realizar la lectura colorimétrica. Por otro lado, el método CCK-8 utiliza una sal de tetrazolio (Figura 3) que se reduce gracias a un mediador de electrones (1-methoxy PMS), generando un formazán de color naranja que sigue siendo soluble en agua. El mediador interactúa con las coenzimas NADH y NADPH generadas por las deshidrogenasas celulares (Figura 4). CCK-8 presenta ventajas sobre MTT, sobre todo por su solubilidad, pues al no generar cristales no se afecta la integridad de las células y se evita el paso de resolubilización del formazán cristalizado. El método de CCK-8 es más sencillo pues solo consta de tres pasos: 1) adición, 2) incubación y 3) lectura de absorbancia [49]

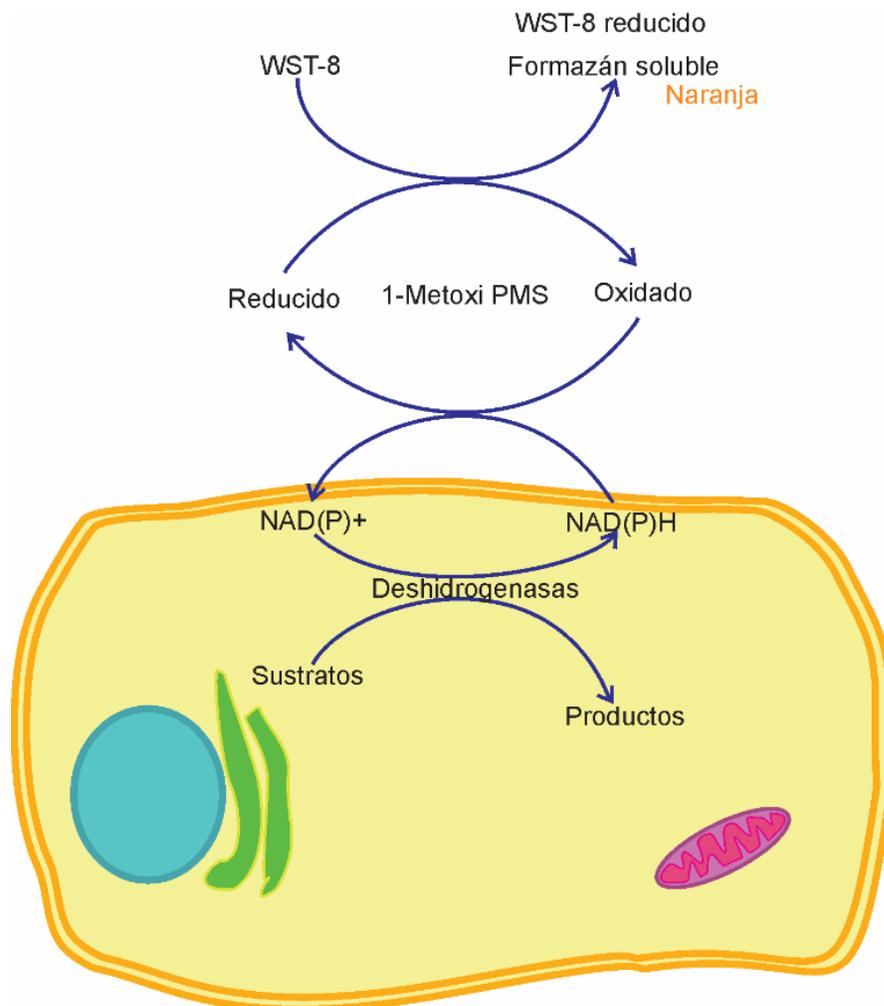


Figura 4. Esquema de las reacciones de oxido-reducción implicadas en la reducción de la sal de tetrazolio presente en el kit CCK-8 (WST-8) para producir el formazán de color naranja. Tomado y modificado de [49].

1.6. Análisis de proteínas

1.6.1. Ensayo de BCA

Existen diversos métodos basados en colorimetría para cuantificar la cantidad total de proteína en una muestra. Los que más se han usado son: el método de Lowry, el método de Bradford y el método de BCA (*bicinchoninic acid* o ácido bicinconínico) [50, 51]. Estos métodos colorimétricos relacionan la intensidad del color formado en cada muestra con la cantidad de proteína que esta contiene, empleando un espectrofotómetro para interpolar la absorbancia de las muestras en una curva de calibración con un estándar de concentración conocida, generalmente albúmina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*) [50]. De los métodos mencionados el que posee más desventajas es el método de Lowry, ya que sufre de interferencias por lípidos y detergentes que

puedan encontrarse en la muestra, además de utilizar reactivos peligrosos como el fosfomolibdato y el fosfotungstato, que deben prepararse de nuevo cada vez que el ensayo se realice [52, 53].

El método del ácido bicinconínico se basa en la conversión del ion Cu^{2+} a Cu^+ en medio alcalino por interacción con las proteínas para formar complejos coordinados entre los átomos de Cu^{2+} y los aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, que lo reducen a Cu^+ [50, 52, 54] (Figura 5). Este método retoma el fundamento de la reacción de Biuret [50, 54] pero mejora la sensibilidad de la reacción al utilizar el ácido bicinconínico, que es soluble en agua y forma específicamente complejos color púrpura con el Cu^+ [54]. Cuando el BCA atrapa el cobre reducido, permite que los aminoácidos de las proteínas formen un nuevo complejo con el Cu^{2+} [54], por lo que la reducción de Cu^{2+} no se detiene. Dado que la reacción no tiene punto final, el tiempo es un factor importante en la intensidad del color que se obtendrá [50].

Es importante tomar en cuenta que algunas sustancias pueden interferir con la intensidad del color al utilizar métodos basados en la reacción de Biuret. Por ejemplo, los agentes reductores favorecen la formación de Cu^+ , lo que aumenta la cantidad del color independientemente de la cantidad de proteínas. Por el contrario, los quelantes de cobre pueden disminuir la intensidad del color debido a que impiden la interacción del BCA con los iones Cu^+ . A diferencia del método de Lowry y de Bradford, el método BCA no presenta interferencia por los detergentes en las concentraciones comúnmente utilizadas en la preparación de muestras de tejido o cultivos celulares [50-52].

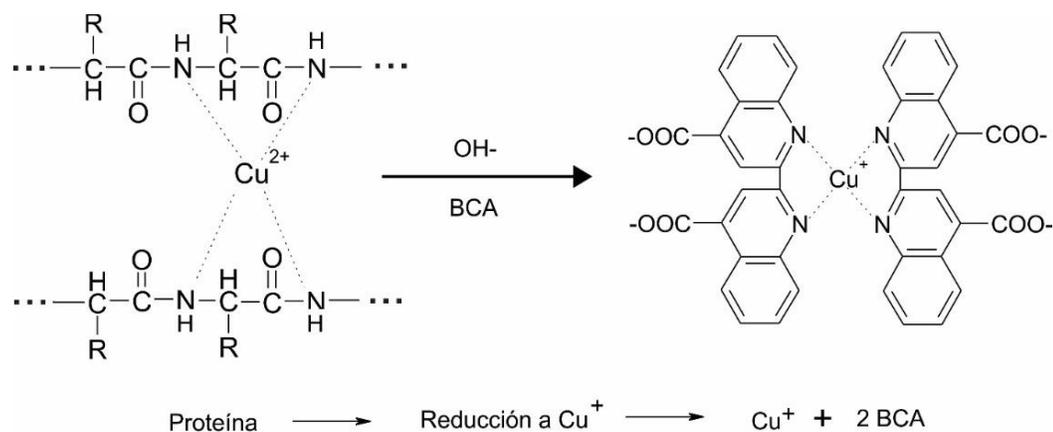


Figura 5. Esquema de formación de complejos coordinados en la cuantificación de proteínas totales por el método de BCA. El complejo formado por el Cu^+ y el BCA es de color púrpura. Tomado y modificado de [52].

1.6.2. Western Blot

Western Blot es una técnica de inmunoafinidad que se utiliza para el estudio analítico de proteínas presentes en muestras biológicas. Se basa en la separación de las proteínas según su tamaño por medio de electroforesis en gel y su posterior transferencia a una membrana donde se mantienen inmóviles para facilitar su detección por medio de la unión de anticuerpos a epítomos específicos en la proteína que se desea estudiar [55].

La técnica consta de 4 etapas fundamentales:

1. Preparación de la muestra
2. Electroforesis en gel
3. Transferencia de proteínas a un soporte sólido (membrana)
4. Inmunodetección

Durante la preparación de la muestra se extraen las proteínas de las células donde se encuentran, siendo necesario el paso de lisis celular por medios químicos, como los buffers de lisis, o medios mecánicos como la agitación o sonicación [55]. Además, se procura mantener la integridad de las proteínas evitando la acción de las proteasas y fosfatasa celulares utilizando los inhibidores correspondientes o bien una combinación de temperatura y detergente [56, 57].

Después de la lisis y la extracción se deben cuantificar las proteínas totales de cada muestra con el fin de cargar la misma cantidad de proteína por muestra en el gel de electroforesis, y poder comparar los resultados entre ellas [55]. Esta cuantificación puede realizarse por colorimetría, por ejemplo, utilizando el método de BCA (punto 1.6.1), donde se interpola la absorbancia de las muestras en una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

Antes de la electroforesis en gel se agregan tres sustancias al extracto proteico cuantificado: glicerol, azul de bromofenol y dodecilsulfato de sodio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*). La primera permite que, al depositar la muestra en el pozo de carga, esta se vaya al fondo evitando su pérdida en el buffer. La segunda permite al investigador monitorear el avance de las proteínas en su recorrido por el gel y detener el corrimiento antes de que estas salgan del mismo [55]. La tercera, SDS, sirve para reorganizar la proteína en su estructura primaria y además recubrirla con cargas negativas que permitirán su migración hacia el ánodo [56].

La electroforesis en gel de poliacrilamida es un método de separación en el que las proteínas se mueven a través de un gel con porosidades, gracias a la carga negativa que les confiere el SDS, la cual interactúa con el campo eléctrico que se induce en el gel. Las proteínas viajan desde el pozo de carga hacia el electrodo positivo y se separan por su tamaño, ya que las proteínas

pequeñas viajan con mayor facilidad por los poros a diferencia de las proteínas más grandes [55, 56]. Además de las muestras, en el gel se cargan proteínas que sirven como marcadores de peso molecular y son una guía para estimar en qué lugar del gel, a lo largo del corrimiento, se encuentra o debería encontrarse la proteína de interés.

El tercer paso, que es la transferencia de las proteínas a una membrana, surge por la necesidad de tener a las proteínas en un soporte menos frágil que los geles, que permita la adición y consecuente unión de los anticuerpos a las proteínas y que además sea de fácil manipulación. Este soporte sólido es una membrana que puede ser de nitrocelulosa o de polifluoruro de vinilideno (PVDF). En este soporte las proteínas se mantienen inmóviles y manejables [56].

Para realizar la transferencia se monta una especie de sándwich donde el gel, en contacto directo con la membrana, se encuentra entre papel filtro (uno del lado de la membrana y otro del lado del gel), que a su vez está en medio de esponjas. Todo esto se coloca entre dos electrodos, procurando mantener la secuencia que hay entre el gel, la membrana y el electrodo positivo, siempre en función de la dirección de la corriente. Es decir, la membrana debe mantener contacto con la cara del gel que esté en dirección al ánodo y nunca en la cara contraria a este, para que las proteínas migren del gel a la membrana [56].

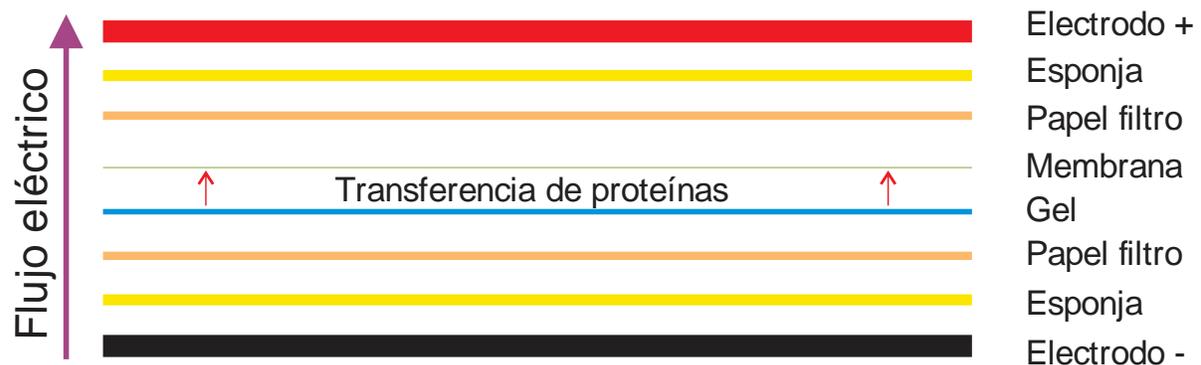


Figura 6. Esquema del orden de los componentes del sistema de transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana. Imagen tomada y modificada de [56].

Para la inmunodetección se utilizan anticuerpos específicos contra la proteína de interés, cuyo epítipo puede pertenecer a una región de la proteína que corresponda a un tipo natural (silvestre), una mutación o una modificación postraduccional (e.g. fosforilación) [55]. En este paso la membrana debe ser tratada con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, bloqueando la membrana con leche descremada o con BSA. Una vez bloqueada se puede añadir el anticuerpo contra la proteína de interés (anticuerpo primario) y dejar que se una a la proteína. Los anticuerpos que no se unen a su epítipo deben ser eliminados por lavados con el fin de evitar lecturas erróneas [56]. Después de esto se añade otro anticuerpo (el anticuerpo secundario), cuyo

propósito es unirse al anticuerpo primario y generar una señal que pueda ser leída. Entre los anticuerpos secundarios más comunes se encuentran aquellos conjugados con una enzima (HRP, *horseradish peroxidase*), que en presencia de un sustrato (peróxido de hidrógeno y luminol) produce una señal quimioluminiscente cuya intensidad permite estimar la expresión relativa de la proteína en distintas muestras [56].

1.6.3. Proteómica basada en espectrometría de masas

Al conjunto total de proteínas presentes en las células, tejidos u organismos se le denomina proteoma. Este constituye el aspecto funcional de la maquinaria molecular de la célula y por tanto su estudio permite conocer los cambios moleculares asociados a diversas enfermedades, incluyendo el cáncer [9, 58].

La proteómica basada en espectrometría de masas de alta resolución es un área dedicada a la identificación y cuantificación a gran escala de las diferencias en los proteomas de sistemas biológicos complejos. El análisis está basado en la separación cromatográfica de péptidos generados por digestión enzimática e inyección de los mismos al espectrómetro de masas para obtener sus patrones de fragmentación, generados por colisión con un gas inerte dentro del espectrómetro. Al registrar los valores de masa de los péptidos y de sus fragmentos se puede inferir la identidad de cada péptido y por tanto de las proteínas [59]. Dada la complejidad de los proteomas celulares, se emplean herramientas bioinformáticas que permiten comparar las listas de masas experimentales con las obtenidas a través de digestión *in silico* de las secuencias de proteínas en bases de datos como UniProtKB/Swiss-Prot. La enzima proteolítica más utilizada es tripsina, debido a su especificidad (hidrólisis en el carboxilo terminal de los aminoácidos lisina y arginina), disponibilidad y costo. La correlación entre los datos experimentales y los de las secuencias de referencia facilita la asignación de identidad a la vez que restringe la búsqueda a las proteínas de la especie en estudio, reduciendo la probabilidad de error [59, 60].

Antes de la digestión se realiza la lisis celular, cuantificación de proteína total, reducción de los puentes disulfuro entre proteínas y alquilación de los tioles libres generados (Figura 7). La sensibilidad del análisis depende del espectrómetro de masas y de la posible reducción de la complejidad de la muestra para poder incrementar la cobertura del proteoma. Para esto último es común recurrir a fraccionamiento del digerido de péptidos mediante cromatografía de intercambio iónico o fase reversa en pH básico, que proporcionan una separación de carácter ortogonal con respecto a la cromatografía de líquidos de fase reversa en pH ácido generalmente acoplada al espectrómetro de masas [61].

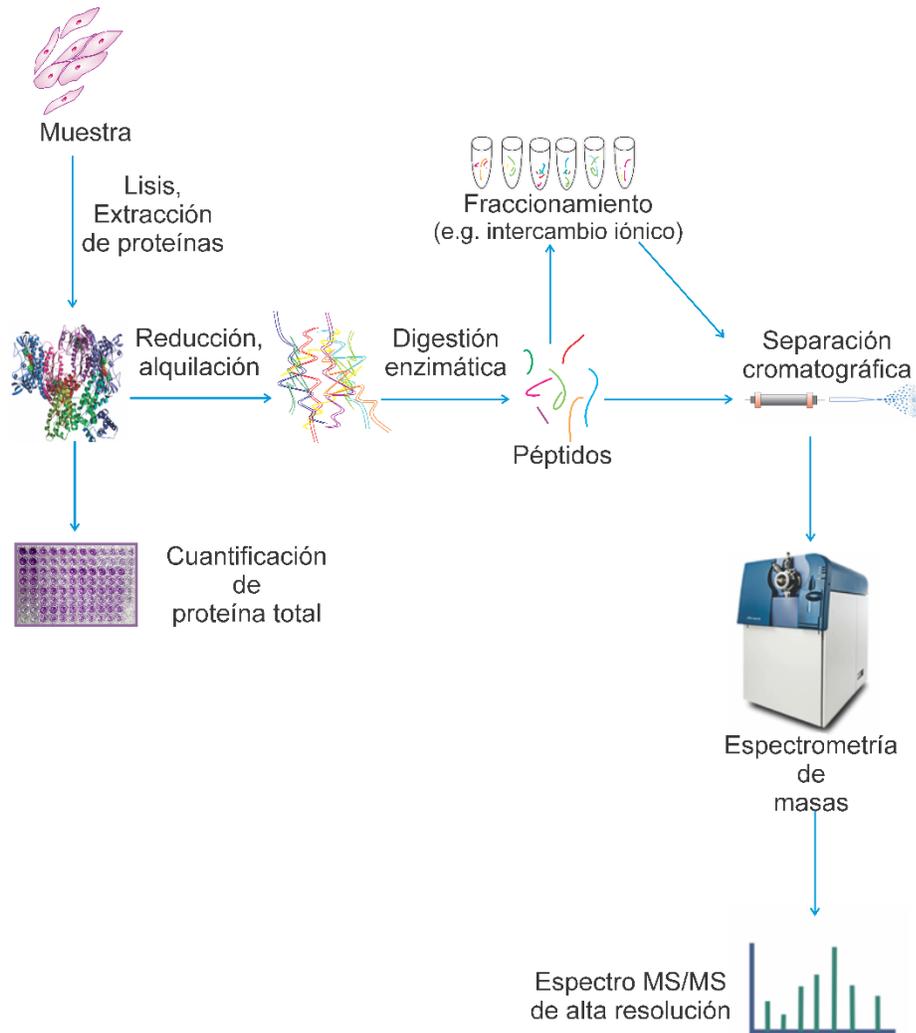


Figura 7. Vista general del protocolo de análisis proteómico basado en espectrometría de masas (modificado de <http://rai.unam.mx>).

La cuantificación relativa de proteínas entre muestras se lleva a cabo con la medición del área de los picos que forman los péptidos al eluir de la columna cromatográfica, o de sus fragmentos. En una modalidad conocida como SWATH (*sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra*), usualmente se construye primero una biblioteca espectral experimental que contiene los datos de las masas de péptidos y sus fragmentos, detectados en las muestras [58, 62]. Los datos cuantitativos se obtienen en un segundo paso considerando únicamente las áreas de los iones fragmento, cuya identidad se reconoce por comparación con la biblioteca espectral. Existen programas informáticos dedicados a extraer la información mencionada considerando parámetros como la unicidad y número de péptidos por proteína, nivel de confianza en su identidad y proporción de error global. Con los datos obtenidos se puede realizar una interpretación funcional que permita entender o plantear nuevas hipótesis sobre las características moleculares de los fenotipos celulares en cuestión [58, 62, 63].

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de páncreas es una de las enfermedades más letales, ya que solo el 7% de los pacientes con este mal superan los 5 años de vida después de ser diagnosticado. Se estima que en 2018 el número de muertes asociadas a este cáncer representó 92% de los nuevos casos diagnosticados en nuestro país. Dada la poca eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos actuales se han propuesto nuevas estrategias como la terapia molecular dirigida, que busca intervenir en componentes moleculares específicos que soportan la actividad oncogénica. En el cáncer de páncreas se ha planteado la inhibición de dos vías de señalización importantes, la vía Raf/MEK/ERK y la vía PI3K/Akt. Sin embargo, existen células de cáncer de páncreas resistentes a esta inhibición. Por tanto, es necesario explorar la composición del proteoma de células de cáncer de páncreas para identificar las proteínas y mecanismos moleculares asociados a la resistencia, lo que a su vez facilitará la determinación de nuevos blancos terapéuticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Conocer las características del proteoma resistente a la inhibición de las cinasas MEK y PI3K en un modelo *in vitro* de cáncer de páncreas.

3.2. Objetivos particulares

- Comprobar el efecto de los inhibidores de MEK (AZD6244) y PI3K (GDC-0941), individuales y en combinación, sobre la viabilidad de las células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y PANC-1 para determinar cuáles son resistentes a dicha inhibición.
- Corroborar la inhibición de la señalización de las cinasas MEK y PI3K por los fármacos AZD6244 y GDC-0941.
- Investigar la composición de los proteomas celulares mediante espectrometría de masas de alta resolución.
- Proponer cuáles son las proteínas y mecanismos moleculares asociados a la resistencia a la inhibición de MEK y PI3K.
- Averiguar si la inhibición de alguna vía o proteína específica del punto anterior permite recuperar el control sobre la proliferación celular.

4. METODOLOGÍA

4.1. Cultivo celular

Las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y MIA PaCa-2, obtenidas a través de ATCC (*American type culture collection*), se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con GlutaMAX, 10% de suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*); 1% de penicilina-estreptomicina y HEPES 10 mM, a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Al medio de cultivo de MIA PaCa-2 también se adicionó suero de caballo al 2.5%, siguiendo las recomendaciones de ATCC. Las células se sembraron en cajas para cultivo celular y se realizaron subcultivos (pases) cuando las células se encontraban aproximadamente al 80% de confluencia. Para estos pases se retiró por completo el medio de cultivo, se utilizó buffer salino de fosfatos (PBS, *phosphate buffered saline*) para lavar las células, se retiró el PBS y se añadió alrededor de 1 mL de tripsina al 0.05% antes de poner las células en incubación a 37 °C / 3 min para despegarlas de la caja. Al término del tiempo de incubación se agregó medio de cultivo nuevo para resuspender las células y de esta resuspensión se tomaron alícuotas para realizar los subcultivos.

4.2. Ensayos de viabilidad celular

Primero se llevó a cabo el conteo de células con hemocitómetro y azul de tripano. Para ello, las células despegadas con tripsina se recuperaron en un tubo estéril para homogeneizarlas y después preparar 80 µL de una dilución 1:1 de azul de tripano y la resuspensión celular. De esta dilución se colocaron 10 µL en cada cámara del hemocitómetro y se contaron las células de los cuatro cuadrantes de las esquinas, por duplicado. El resultado de los cuatro cuadrantes se promedió para calcular el número de células por mililitro presentes en la resuspensión.

Las células contadas se sembraron en placas de 96 pozos (2,200 células/pozo para PANC-1 y 2,000 células/pozo para MIA PaCa-2; 100 µL/pozo en todos los casos). Este número de células por pozo se determinó mediante pruebas preliminares que demostraron que las células control tenían una confluencia aproximada de 80% al término de los experimentos. Las células sembradas se incubaron por 24 h (células PANC-1) o 48 h (MIA PaCa-2) antes de iniciar los tratamientos con inhibidores. El mayor tiempo de incubación pre-tratamiento para las células MIA PaCa-2 se debió a que previamente se había observado que estas células necesitaban más tiempo para adherirse a la microplaca. Las células se trataron con diferentes concentraciones del inhibidor de MEK (AZD6244, APEX BIO) y PI3K (GDC-0941, Selleck Chemicals) de forma individual y en combinación durante 72 h. El intervalo de concentraciones fue establecido tomando en cuenta la generación de curvas de viabilidad con al menos dos puntos

experimentales en cada extremo de las mismas así como una distribución homogénea de los puntos [64]. A las células control se les añadió únicamente medio con el vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO) en concentraciones equivalentes a las utilizadas en los tratamientos correspondientes. Los tratamientos y controles se prepararon por triplicado. Un procedimiento similar se realizó para los tratamientos con otros inhibidores (Stattic, Selleck Chemicals; 2-desoxi-D-glucosa (2DG), MedChemExpress; metformina, APExBIO y 6-aminonicotinamida (6AN), Sigma). Para determinar la viabilidad se empleó el kit de conteo celular CCK-8 (*Dojindo molecular technologies*), que es un método colorimétrico basado en la reducción de una sal de tetrazolio (ver punto 1.5). Este método se llevó a cabo en tres pasos: 1) adición del reactivo (8 μ L/pozo), 2) incubación (2 h a 37 °C) y 3) determinación de absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro xMark de Bio-Rad.

También se determinó la absorbancia de muestras blanco, las cuales contenían únicamente medio de cultivo, inhibidores en las concentraciones utilizadas para los tratamientos y el reactivo CCK-8. El promedio de la absorbancia de estas muestras blanco se restó a la absorbancia de las muestras con células (controles y tratamientos) para eliminar la interferencia que pudiesen tener el medio de cultivo y los inhibidores en las lecturas.

Con los resultados de este procedimiento se determinó el porcentaje de viabilidad y la concentración inhibitoria media (CI50). El primero se obtuvo a partir de los promedios de la absorbancia de los tratamientos (T) y la absorbancia de los controles (C). Estos promedios se utilizaron para calcular el porcentaje de viabilidad con la fórmula $\%Viabilidad = \frac{T}{C} * 100$. El cálculo de CI50 se realizó utilizando el software GraphPad Prism 7, mediante análisis de los datos por regresión no lineal de la curva $\log(\text{concentración de inhibidor})$ vs porcentaje de viabilidad, siguiendo el modelo de curva dosis-respuesta de cuatro parámetros [64] e interpolando el valor de concentración considerando 50% de viabilidad.

El análisis de índice de combinación se realizó por el método de Chou-Talalay [65, 66]. Las pruebas estadísticas de significación para los resultados de los tratamientos con fármacos de concentraciones variables de manera individual y en combinación se realizaron mediante una prueba t no pareada con $\alpha = 0.05$, corregida por comparaciones múltiples utilizando el método de Holm-Sidak. Para las pruebas de significación de los resultados de tratamientos con fármacos individuales en concentración fija comparados con tratamientos de combinación se utilizó una prueba estadística ANOVA seguida de una prueba de Dunnett con un nivel de significación de 0.05. Las pruebas estadísticas se efectuaron con el software GraphPad Prism 7.

4.3. Tratamientos

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo y se les incubó 24 h (PANC-1) o 48 h (MIA PaCa-2), de manera semejante a los ensayos de viabilidad celular. Se les trató con los fármacos en concentraciones correspondientes a las CI50 determinadas con anterioridad durante 1, 24, 48 y 72 h. Al término de este tiempo las células se lavaron con PBS y se adicionó PBS frío (4°C) para recolectarlas utilizando una pala de raspado celular. Las células recolectadas se colocaron en un tubo para centrifugar a 1500 rpm por 4min, se decantó el sobrenadante y las células recolectadas se congelaron a -70 °C hasta su uso.

4.4. Lisis celular

Las células fueron lisadas con un buffer de deoxicolato de sodio al 1% y bicarbonato de trietilamonio 0.1 M durante 5 minutos a 95 °C con agitación en vórtex cada 2.5 min. Al finalizar la lisis se añadió aproximadamente 0.7 µL de benzonasa 10 kU a cada muestra para degradar los ácidos nucleicos y reducir la viscosidad del extracto. Este último se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min para sedimentar los residuos celulares y el sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo. El contenido de proteína total se cuantificó por el método de BCA (ver puntos 1.6.1 y 4.5).

4.5. Cuantificación de proteína total

Para la cuantificación de proteína total se empleó el método BCA. La curva de calibración se preparó con ocho concentraciones de albumina sérica bovina (0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL). Las muestras fueron diluidas con buffer de lisis en una proporción 1:10 y 1:20. Las muestras y los estándares de calibración se colocaron por triplicado y duplicado, respectivamente, en una microplaca de 96 pozos (10 µL/pozo) y se les añadió 200 µL de una mezcla 50:1 de reactivos A (bicarbonato y carbonato de sodio, ácido bicinconírico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M) y B (sulfato de cobre al 4%) del kit comercial *Pierce BCA Protein Assay Kit* de ThermoFisher. La microplaca se incubó por 30 min a 37 °C y se leyó la absorbancia a 562 nm. Se hicieron alícuotas de cada una de las muestras y se guardaron a -70 °C. Las muestras así preparadas y cuantificadas se utilizaron para los análisis por Western blot y proteómica por espectrometría de masas.

4.6. Western blot

El volumen correspondiente a 10 µg de proteína total de cada muestra se preparó adicionando buffer de carga (dodecil sulfato de litio, NuPAGE LDS), ditiotreitól (DTT) y buffer de lisis para llevar a un volumen total de 10 µL. Las muestras se homogeneizaron y se calentaron a 70 °C

durante 10 min antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida Bolt Bis-Tris 4-12%. La electroforesis se realizó con buffer NuPAGE MOPS a 200 V durante aproximadamente 30 min hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el borde inferior del gel. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de tamaño de poro (Bio-Rad) empleando buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8.3; Bio-Rad) a 10 V durante 1 h. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante 5 minutos en agitación.

Posteriormente, la membrana se trató de la siguiente manera:

- El rojo de Ponceau se lavó con buffer Tris salino (TBS, *Tris buffered saline*) durante 5 min en agitación, tres veces.
- La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con BSA al 3% p/v para detección de fosfoproteínas o con leche descremada al 5% p/v para la detección de proteínas totales.
- Se realizaron lavados con TBS adicionado con 0.1% de *Tween* 20 (TBST) durante 5 min en agitación, tres veces.
- La membrana se incubó con el anticuerpo primario de interés diluido en TBST durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos usados se muestran en la Tabla 1. La especie huésped de todos los anticuerpos primarios es conejo. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de la compañía Cell Signaling, excepto anti-LDHB y anti-IDH2, de Proteintech.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para los experimentos de Western Blot

No. catálogo	Anticuerpo	Dilución
4060	p-Akt (Ser473)	1:1400
9101	p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	1:2000
4856	p-S6 (Ser235/Ser236)	1:1750
9451	p-4E-BP1 (Ser65)	1:1400
9145	p-STAT3 (Tyr705)	1:1400
4691	t-Akt	1:1400
4695	t-ERK 1/2	1:1750
2217	t-S6	1:1750
9644	t-4EBP1	1:1750
12640	t-STAT3	1:1400
4267	t-EGFR	1:1400
12263	G6PD	1:1400
14824-1-AP	LDHB	1:2000
15932-1-AP	IDH2	1:1750
4967	Actina	1:1400
7074	Anticuerpo conjugado a HRP, anti-IgG de conejo (anticuerpo secundario)	1:20000

- Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces por 5 min con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado con HRP) durante 1 h a temperatura ambiente
- Se lavó con TBST por 5 min en agitación, tres veces, seguidas de un lavado con con TBS por 5 min en agitación.
- Se agregó una disolución 1:1 de luminol y peróxido contenidos en el kit SuperSignal West Pico PLUS de Thermo Scientific
- Se realizó la lectura de quimioluminiscencia en el equipo ChemiDoc de Bio-Rad
- El análisis densitométrico se llevó a cabo con el software Image Lab 6.0.1

4.7. Identificación y cuantificación relativa de los proteomas celulares

Las proteínas (100 µg) fueron tratadas con DTT 10 mM durante 30 min a 60 °C para reducir los puentes disulfuro y después fueron sometidas a alquilación con iodoacetamida (IAA) 25 mM durante 30 min en oscuridad. Finalmente fueron tratadas con DTT 10 mM por 20 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de IAA. La digestión enzimática se realizó con 2 µg de tripsina grado secuenciación (Promega) e incubación a 37 °C durante la noche. Después de la digestión las muestras fueron diluidas a 50 µL con buffer de lisis y se acidificaron con 1 µL de ácido fórmico. El precipitado se removió por centrifugación (14000 rpm, 10 min).

El análisis proteómico se llevó a cabo utilizando el método SWATH [58, 62]. Para ello, se construyó primero una biblioteca espectral a partir del fraccionamiento de las muestras mediante cromatografía en microcolumna con fase de intercambio aniónico a pH 11, 8, 6, 5, 4 y 3 y de fase reversa a pH básico.

4.7.1. Fraccionamiento por intercambio aniónico

Antes de realizar el fraccionamiento de los péptidos por intercambio aniónico, las sales de las muestras se removieron mediante purificación en microcolumnas de fase reversa, las cuales se prepararon según la metodología mostrada en el apéndice (Metodología de fraccionamiento por fase reversa e intercambio aniónico). Tales microcolumnas se acondicionaron agregando y eluyendo los siguientes reactivos en el orden indicado:

1. 100 µL de metanol
2. 60 µL de disolución con acetonitrilo (ACN) al 80% v/v y ácido trifluoroacético (TFA, *trifluoroacetic acid*) al 1% v/v
3. 80 µL de disolución con ACN al 2% v/v y TFA al 0.1% v/v

Las muestras cargadas en microcolumna se lavaron repitiendo el punto número 3 y se eluyeron en microtubos nuevos adicionando 80 μL de una disolución de ACN al 65% v/v y TFA al 0.1% v/v. Las muestras purificadas se secaron a vacío en centrífuga SpeedVac y se resuspendieron en 100 μL de buffer de pH 11 para su fraccionamiento.

Para el fraccionamiento se prepararon microcolumnas con microdiscos 3M Empore de intercambio aniónico (Figuras A1-A6 de apéndice). En este caso el acondicionamiento se efectuó eluyendo las siguientes disoluciones en el orden mencionado:

1. 100 μL de metanol
2. 100 μL de hidróxido de sodio 1 M
3. 100 μL de buffer pH 11

Las muestras resuspendidas en buffer de pH 11 se cargaron en las microcolumnas, se adicionó 100 μL de buffer pH 11 y el eluato se recogió en una microcolumna de fase reversa, previamente acondicionada. Enseguida se adicionaron 100 μL de buffer pH 8 a la microcolumna de intercambio aniónico y se realizó la elución de esta fracción, recolectándola en una nueva microcolumna acondicionada de fase reversa. Este proceso se repitió utilizando los buffers de pH 6, 5, 4 y 3. Cuando las seis fracciones se encontraron en su correspondiente microcolumna de fase reversa, se lavaron con 100 μL de disolución de ACN al 2% v/v y TFA al 0.1% v/v y se eluyeron con 80 μL de disolución de ACN al 65% v/v y TFA al 0.1% v/v. Las fracciones purificadas se secaron a vacío en SpeedVac y se reconstituyeron en disolución de acetonitrilo 2% v/v y ácido fórmico 0.1% v/v, previo a su análisis por espectrometría de masas.

El análisis de las fracciones obtenidas sirvió para preparar una biblioteca espectral. Por otra parte, también se purificaron muestras por cromatografía en microcolumna de fase reversa sin fraccionamiento, para su análisis por espectrometría de masas.

4.7.2. Fraccionamiento por fase reversa a pH básico

El fraccionamiento a pH básico en microcolumna de fase reversa se realizó utilizando el kit comercial *Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit* (ThermoFisher), siguiendo las especificaciones del fabricante. A diferencia del fraccionamiento por intercambio aniónico, en este método las microcolumnas ya estaban preparadas, por lo que solo se colocaron en microtubos de 1.5 mL para recolectar los diferentes eluatos.

La microcolumna se lavó primero con 300 μL de acetonitrilo dos veces, pasando el disolvente con ayuda de centrifugación (5000 x g, 2 min). Después se pasaron 300 μL de TFA 0.1% v/v a través de la columna, repitiendo este paso una vez. Las muestras se resuspendieron en 300 μL de TFA

0.1% v/v, se cargaron en la microcolumna y se centrifugaron a 3000 x g por 2 min. Una vez cargada, la muestra se lavó con 300 μ L de agua.

Para fraccionar la muestra se adicionaron 300 μ L de las disoluciones de elución indicadas en la Tabla 2, de manera secuencial y centrifugando (3000 x g, 2 min) para recolectar las fracciones en microtubos. Estas últimas se secaron por centrifugación al vacío en SpeedVac y los péptidos se resuspendieron en disolución de acetonitrilo 2% v/v y ácido fórmico 0.1% v/v para su análisis por espectrometría de masas.

Tabla 2. Preparación de las disoluciones de elución para fraccionamiento por fase reversa a pH básico.

# Disolución	% ACN	μ L ACN	μ L Trietilamina (0.1%)
1	5	50	950
2	7.5	75	925
3	10	100	900
4	12.5	125	875
5	15	150	850
6	17.5	175	825
7	20	200	800
8	50	500	500

4.7.3. Análisis mediante Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas

Todas las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de alta resolución AB Sciex TripleTOF 5600+ acoplado a un cromatógrafo de líquidos Eksigent nanoLC 425, empleando una precolumna ChromXP C18CL 300 μ m id x 10 mm x 5 μ m y una columna analítica ChromXP C18 0.3 mm id x 150 mm x 3 μ m. Los péptidos se atraparon en la precolumna durante 3 min a una velocidad de flujo de 10 μ L/min. Después se eluyeron con un gradiente utilizando ácido fórmico 0.1%-acetonitrilo 2% v/v en agua como disolvente débil (A) y ácido fórmico 0.1%-acetonitrilo 99.9 % v/v como disolvente fuerte (B), con velocidad de flujo de 5 μ L/min. La elución se llevó a cabo cambiando el porcentaje del disolvente B de 3% a 25% en los primeros 68 min, a 35% en los siguientes 5 min y de allí a 80% en 2 min, manteniéndolo por 3 min. La adquisición se realizó en modo dependiente de datos considerando los 30 iones más intensos en el intervalo 350-1250 masa/carga (m/z). Los archivos generados se analizaron con el software ProteinPilot 5.0 y la base de datos de proteínas humanas en UniProtKB/Swiss-Prot. La identificación de las proteínas se realizó considerando alquilación de cisteínas por IAA, posibles modificaciones biológicas y nivel mínimo de confianza de 95%.

Todas las fracciones de intercambio iónico y cromatografía en fase reversa a pH básico se analizaron por separado y los espectros de masas de los péptidos identificados se integraron a una biblioteca espectral tomando en cuenta la lista de valores m/z del ion precursor y de sus iones fragmento, así como los tiempos de retención observados. Esta biblioteca se preparó con la herramienta iSwathX [67]. De la lista de péptidos se removieron aquéllos considerados como compartidos entre proteínas para poder realizar el análisis solo con péptidos únicos. Para la cuantificación relativa de proteínas entre las líneas celulares, se inyectaron las muestras sin fraccionamiento (tres réplicas biológicas de cada una) al sistema LC-TripleTOF utilizando las mismas condiciones cromatográficas que en el caso de las corridas empleadas para construir la biblioteca espectral, pero la adquisición de datos se realizó en modo SWATH empleando 100 ventanas de intervalo m/z variable cubriendo los valores 100-1500 m/z . Los archivos generados se procesaron con el software PeakView 2.1, considerando confianza de 99% y proporción de falsos positivos (FDR) menor a 1%. La lista de las proteínas identificadas, péptidos y sus correspondientes áreas de pico se exportaron para el análisis estadístico. Este último se realizó con el software Perseus 1.6.1.3 [68] a partir de los valores logarítmicos de las áreas de pico normalizadas. Las proteínas con expresión diferencial se identificaron utilizando una prueba t de dos lados ($p < 0.05$) y proporción de cambio igual o mayor a 2.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados de viabilidad celular

5.1.1. Viabilidad celular con el inhibidor de MEK (AZD6244)

Los resultados de viabilidad de las células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244) se muestran en las Figuras 8-10, correspondientes a cada una de las réplicas experimentales. Se observó una disminución gradual en el porcentaje de la viabilidad en el intervalo de concentraciones de 0.1 nM hasta 100 000 nM, alcanzando valores cercanos o inferiores a 20% con las concentraciones más altas. Los valores de CI50 de cada réplica fueron: réplica 1 = 384.7 nM; réplica 2 = 339.2 nM y réplica 3 = 277.4 nM. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 1-3 del Apéndice. La CI50 promedio del fármaco AZD6244 para las células MIA PaCa-2 fue $CI_{50} = 333.8 \pm 53.9$ nM.

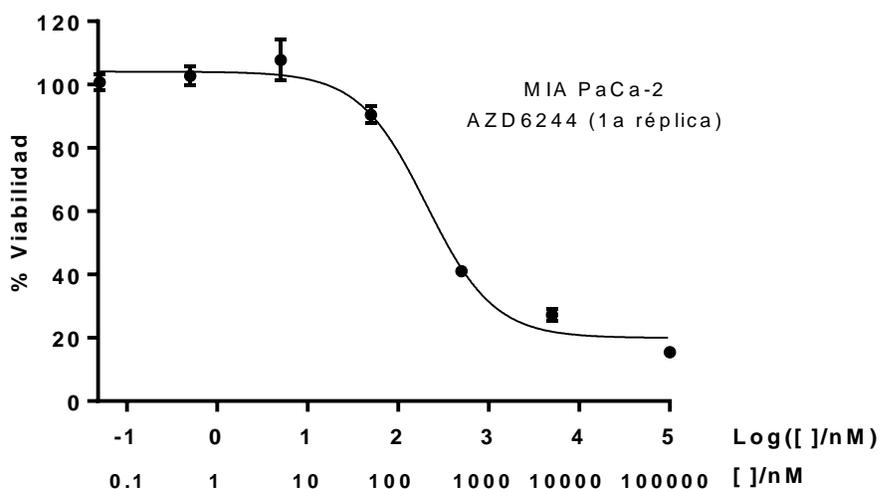


Figura 8. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244).
Réplica 1

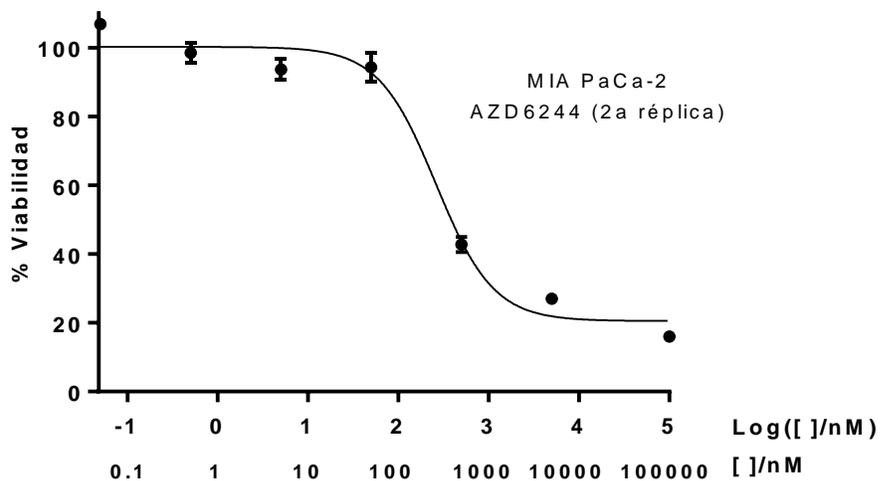


Figura 9. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244).
Réplica 2

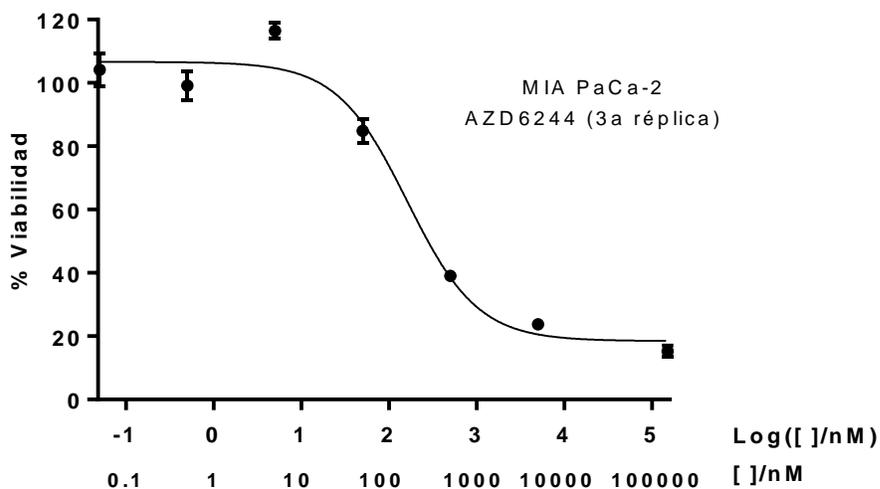


Figura 10. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244).
Réplica 3

Por otra parte, los resultados del tratamiento de las células PANC-1 con AZD6244 mostraron una escasa disminución en el porcentaje de viabilidad en las tres réplicas (Figuras 11-13) en la mayoría de las concentraciones, desde 1 nM a 50 000 nM, manteniendo viabilidad superior a 70%. Solo en la concentración más alta (100 000 nM) el porcentaje de viabilidad disminuyó hacia 40-60%. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 4-6 del Apéndice.

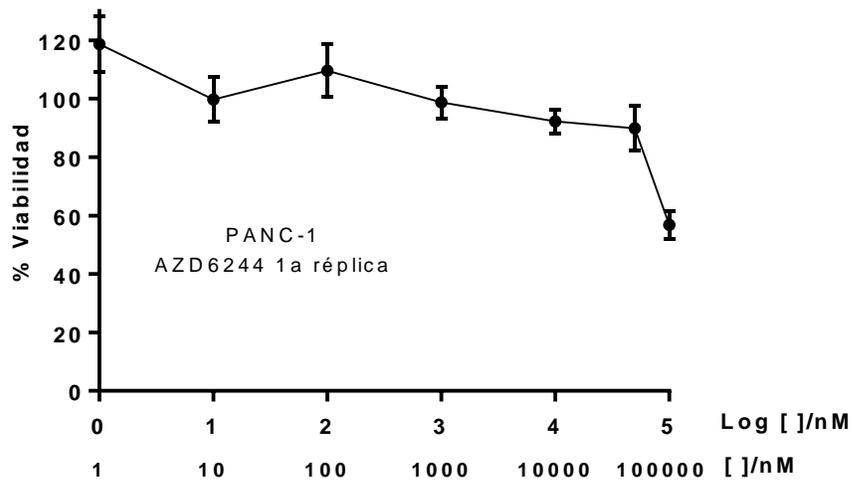


Figura 11. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244). Réplica 1

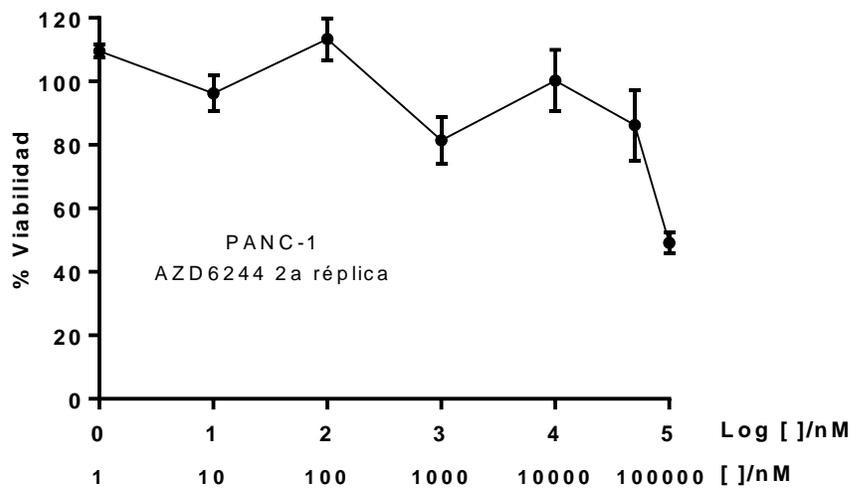


Figura 12. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244). Réplica 2

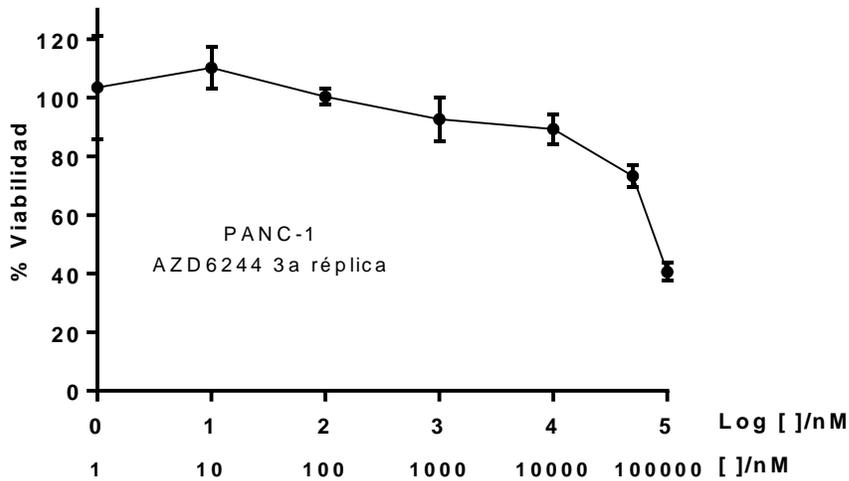


Figura 13. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de MEK (AZD6244). Réplica 3

5.1.2. Viabilidad celular con el inhibidor de PI3K (GDC-0941)

En el caso de los tratamientos de las células MIA PaCa-2 con el inhibidor de PI3K (GDC-0941, Figuras 14-16), se observó que las células mantenían alta viabilidad en las concentraciones 20-400 nM, pero disminuía hasta 20-30% a partir de 5 000 nM. Los valores de CI50 de cada réplica fueron: 1ra = 1 875.6 nM, 2da= 1 906.3 nM, 3ra = 1 621.8 nM. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 7-9 del Apéndice. El promedio de estos valores fue CI50 = 1 801.2 ± 156.2 nM.

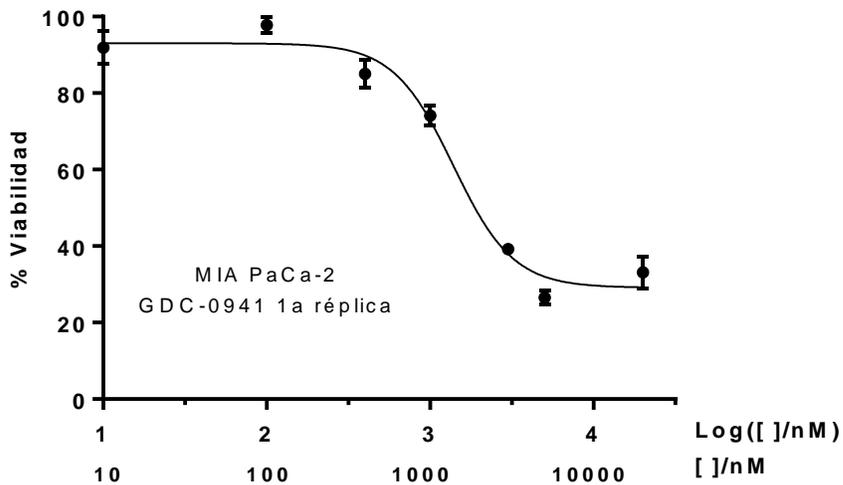


Figura 14. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de PI3K (GDC-0941). Réplica 1

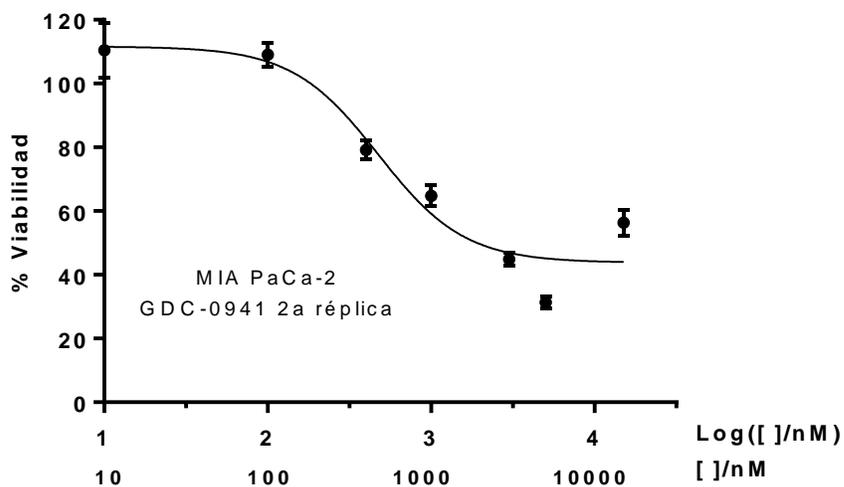


Figura 15. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de PI3K (GDC-0941).
Réplica 2

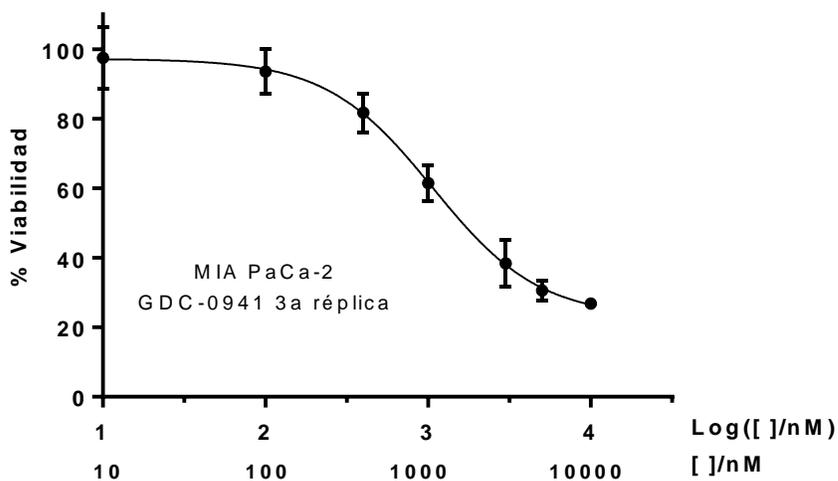


Figura 16. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con el inhibidor de PI3K (GDC-0941).
Réplica 3

En cuanto a los resultados del tratamiento de células PANC-1 con GDC-0941, las Figuras 17-19 muestran un decremento en el porcentaje de viabilidad hasta valores cercanos a 50% en el intervalo de concentraciones 20 - 2 000 nM. Sin embargo, no se observa mayor disminución en concentraciones más altas (5 000 - 30 000 nM) pues el porcentaje de viabilidad se mantiene por arriba del 40%. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 10-12 del Apéndice.

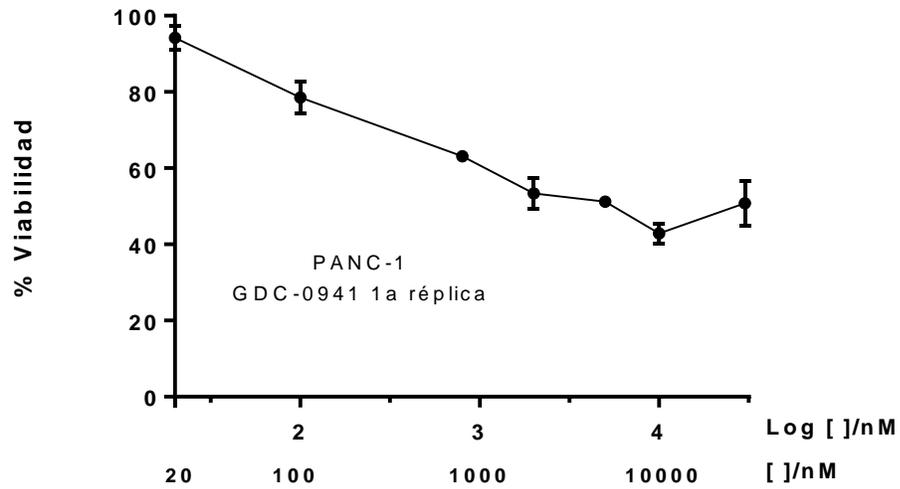


Figura 17. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de PI3K (GDC-0941). Réplica 1

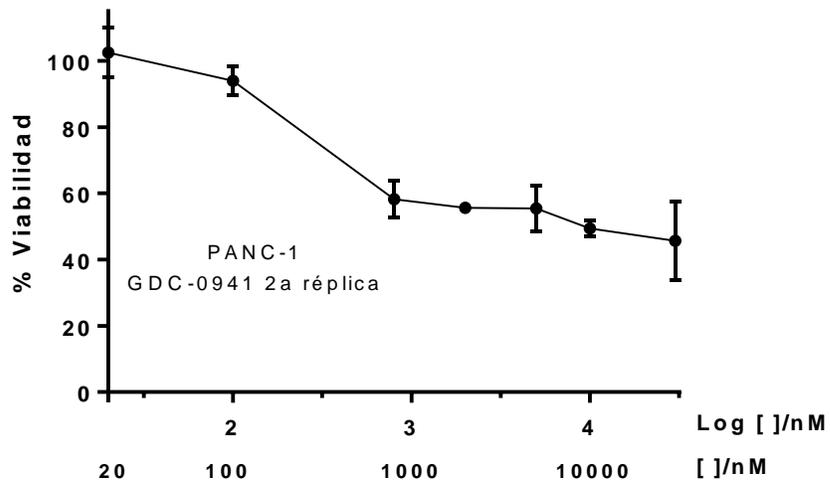


Figura 18. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de PI3K (GDC-0941). Réplica 2

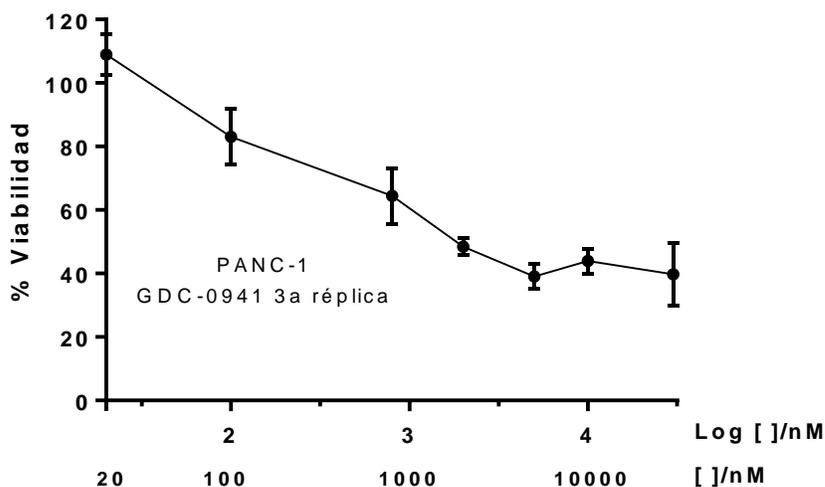


Figura 19. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de PI3K (GDC-0941). Réplica 3

5.1.3. Viabilidad celular con la combinación de los inhibidores AZD6244 y GDC-0941

En las Figuras 20 y 21 se muestran los resultados de las réplicas experimentales del tratamiento de las células MIA PaCa-2 con la combinación de los inhibidores GDC-0941 y AZD6244. Las concentraciones utilizadas corresponden a 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 veces el valor de CI50 de cada inhibidor, calculado a partir de las Figuras 8-10 (AZD6244) y Figuras 14-16 (GDC-0941). En ambas réplicas se observó una disminución de la viabilidad celular en todos los puntos de combinación de los inhibidores, en comparación con los tratamientos individuales. Por ejemplo, en el punto 0.25(CI50), donde las concentraciones de los inhibidores fueron AZD62443 = 83.5 nM y GDC-0941 = 450 nM, se obtuvo un porcentaje de viabilidad superior a 60% con los tratamientos individuales, pero hubo una reducción del porcentaje de viabilidad hasta un 40% con el tratamiento de combinación. En las concentraciones correspondientes a CI50 (AZD6244 = 333.8 nM, GDC-0941 = 1 801.2 nM) los tratamientos individuales resultaron en viabilidad cercana a 50% mientras que con el tratamiento dual la viabilidad disminuyó hasta aproximadamente 20%. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 13-18 del Apéndice.

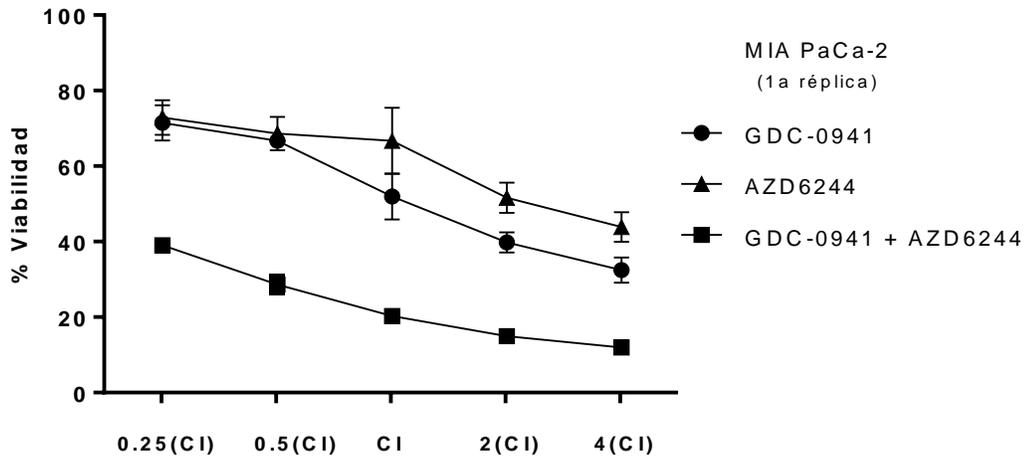


Figura 20. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (GDC-0941) de manera individual y en combinación. Réplica 1

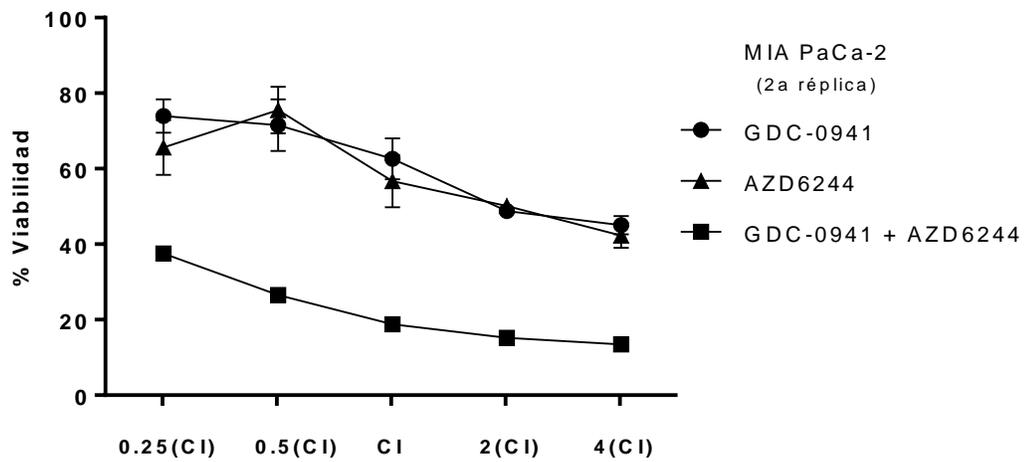


Figura 21. Curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (GDC-0941) de manera individual y en combinación. Réplica 2

Para investigar el efecto de la combinación de los inhibidores AZD6244 y GDC-0941 sobre las células PANC-1 se utilizó una concentración fija del inhibidor de PI3K (GDC-0941 2 μ M) y concentraciones variables del inhibidor de MEK (AZD6244 1 - 10 000 nM) Los resultados de las réplicas experimentales se presentan en las Figuras 22 y 23. En concordancia con lo visto en las Figuras 11-13, se observó mínima disminución de la viabilidad por tratamiento con AZD6244 de manera individual, mientras que su combinación con GDC-0941 produjo un decremento del porcentaje de viabilidad desde 50% con la concentración más baja de AZD6244, hasta

aproximadamente 20% con la concentración más alta. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 19-22 del Apéndice.

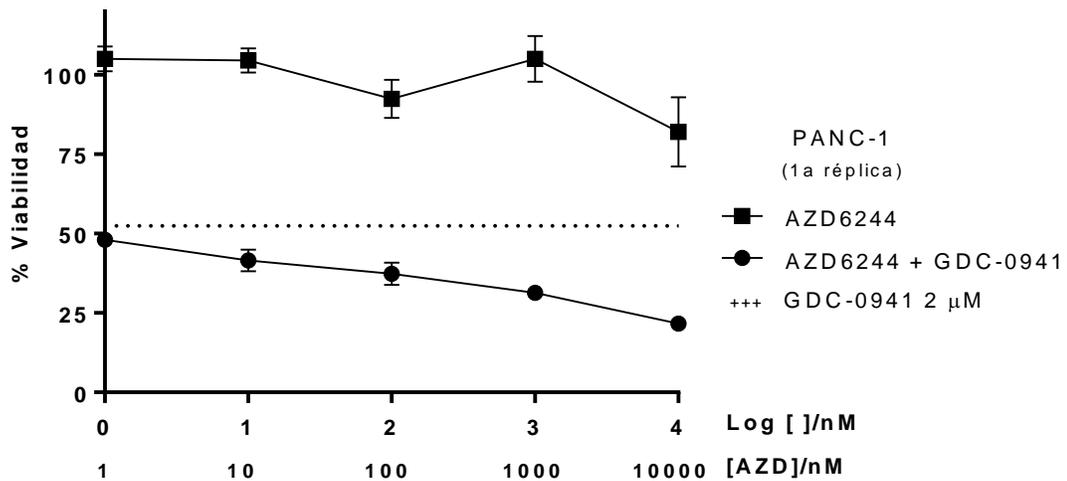


Figura 22. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual y en combinación con GDC-0941 de concentración fija (2 µM). Réplica 1

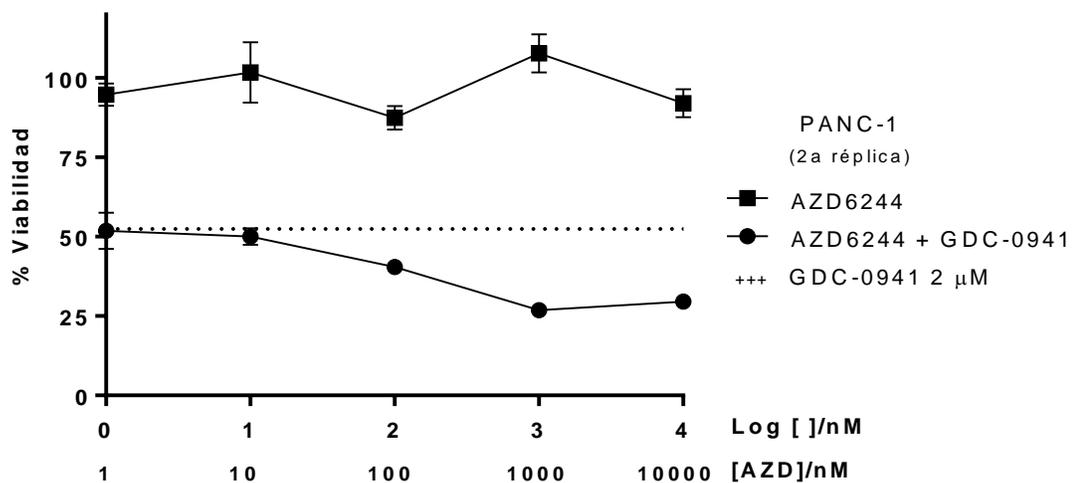


Figura 23. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual y en combinación con GDC-0941 de concentración fija (2 µM). Réplica 2

5.1.4. Viabilidad de las células PANC-1 con el inhibidor de STAT3 (Stattic)

En las Figuras 24-26 se presentan los resultados del tratamiento de las células PANC-1 con el inhibidor de STAT3 (Stattic). Se observó disminución de la viabilidad en forma dependiente de la concentración del inhibidor hasta valores inferiores a 10% con concentraciones de 4 800 nM y

superiores. Los valores de CI50 calculados a partir de las tres réplicas experimentales fueron 1 968.0 nM, 2 547.0 nM y 2 162.0 nM, obteniéndose un promedio de CI50 = 2200 ± 300 nM. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 23-25 del Apéndice.

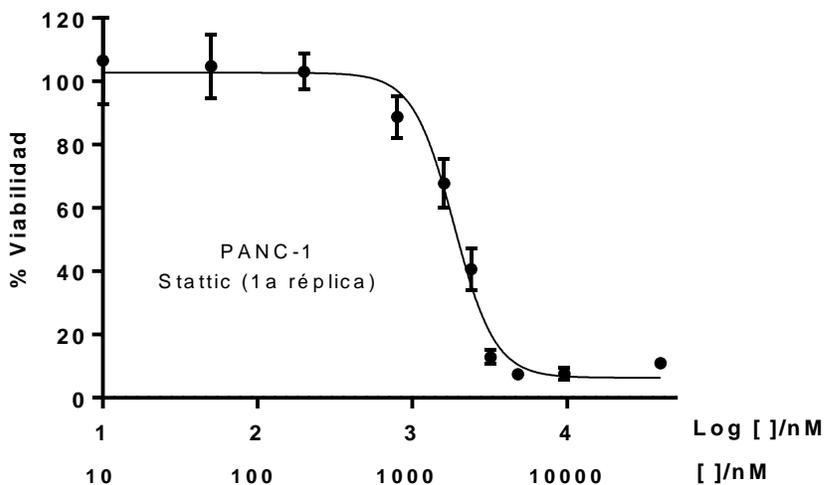


Figura 24. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de STAT3 (Stattic). Réplica 1

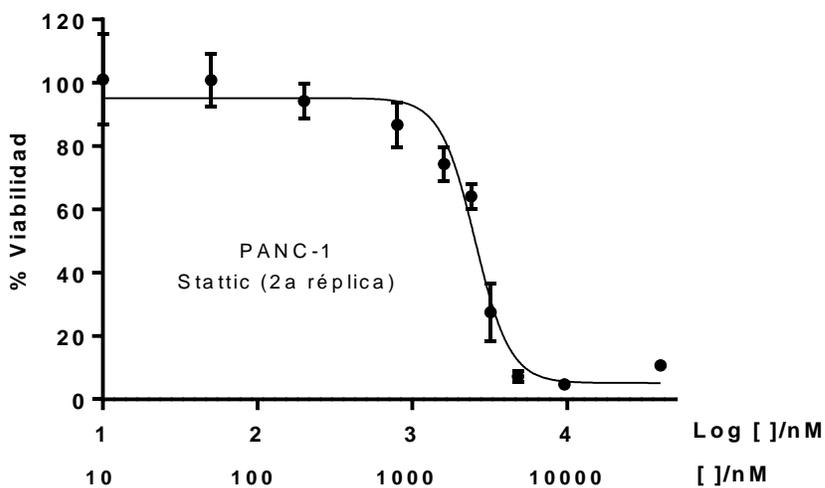


Figura 25. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de STAT3 (Stattic). Réplica

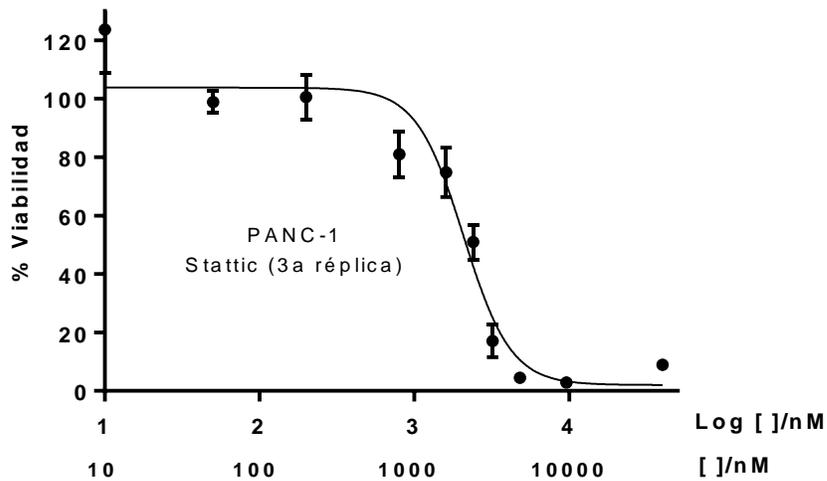


Figura 26. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con el inhibidor de STAT3 (Stattic). Réplica 3

5.1.5. Viabilidad de las células PANC-1 con el inhibidor de MEK (AZD6244) en combinación con el inhibidor de STAT3 (Stattic)

Las Figuras 27 y 28 corresponden a los resultados de la combinación del inhibidor de MEK (AZD6244) y el inhibidor de STAT3 (Stattic), utilizada sobre las células PANC-1. Se muestra la diferencia entre los porcentajes de viabilidad con los tratamientos individuales y de combinación. El tratamiento único con AZD6244 mantiene el porcentaje de viabilidad arriba de 80% en todo el intervalo de concentraciones (1-10 000 nM). Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 26-29 del Apéndice. El tratamiento de las células con la combinación de AZD6244 en las diferentes concentraciones y Stattic en concentración constante (2 200 nM) resultó en porcentajes de viabilidad desde 66 a 49%, dependiendo de la concentración de AZD6244 y la réplica experimental. Esta disminución de viabilidad fue similar a la obtenida con Stattic en tratamiento individual.

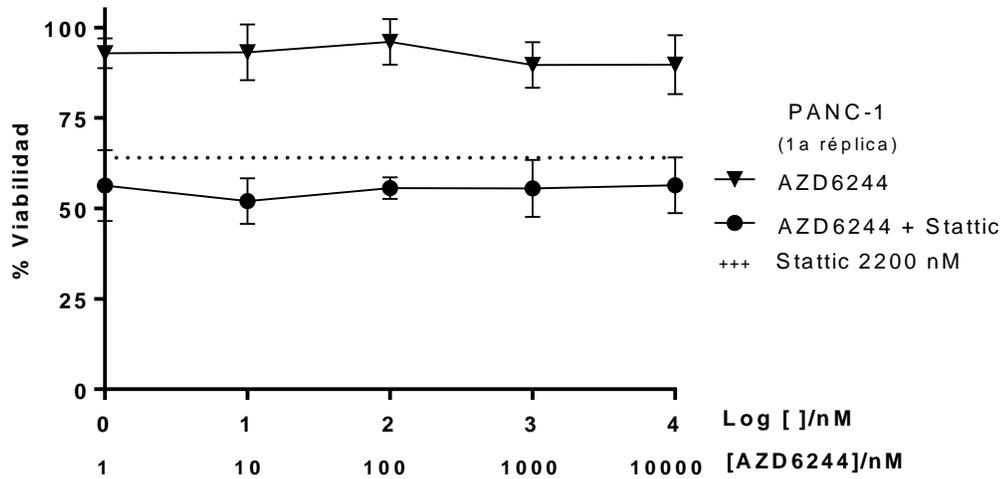


Figura 27. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 1

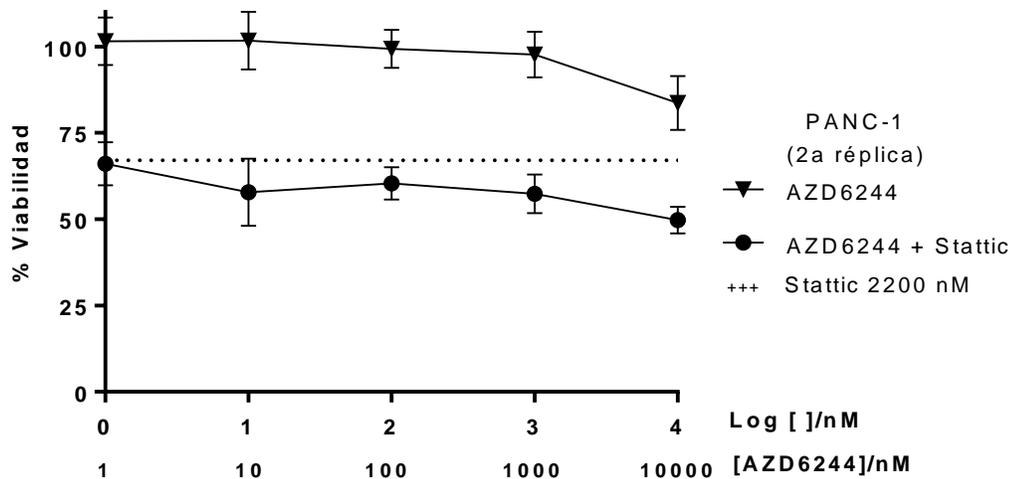


Figura 28. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 2

5.1.6. Viabilidad de las células PANC-1 con el inhibidor de PI3K (GDC-0941) en combinación con el inhibidor de STAT3 (Stattic)

Las células PANC-1 también fueron tratadas con el inhibidor de PI3K en combinación con el inhibidor de STAT3. Las Figuras 29 y 30 muestran los resultados de estos tratamientos, utilizando una concentración constante de Stattic (2 200 nM) y concentraciones variables de GDC-0941 (100 – 10 000 nM). La viabilidad de las células tratadas solo con GDC-0941 se mantuvo entre 41-50% con las concentraciones 2 000 – 10 000 nM. Sin embargo, la viabilidad con el tratamiento

combinado se encontró por debajo de 55% incluso con las concentraciones más bajas, considerando las dos réplicas experimentales. Además, se observó que la viabilidad de las células disminuyó hasta 11 - 26% al ser tratadas con ambos inhibidores con concentraciones de GDC-041 de 2 000 nM a 10 000 nM. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 30-33 del Apéndice.

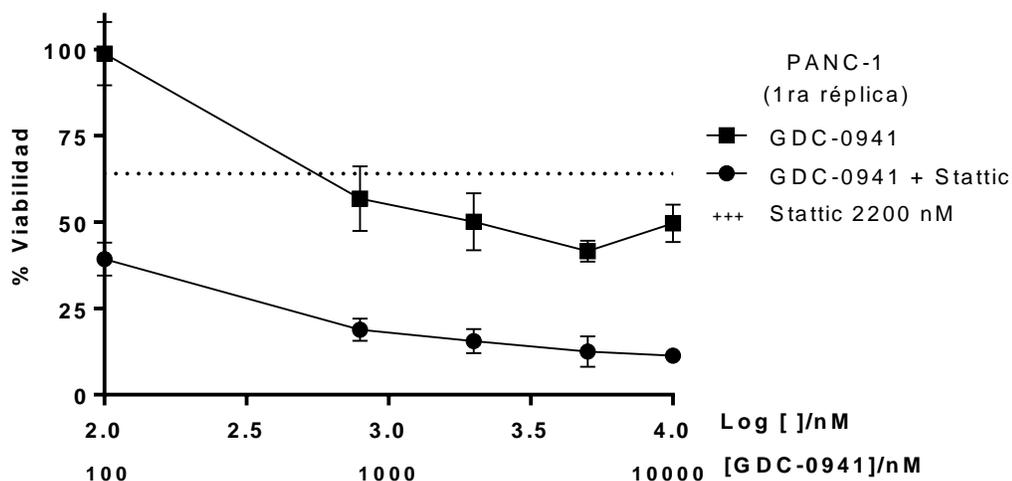


Figura 29. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic. Réplica 1

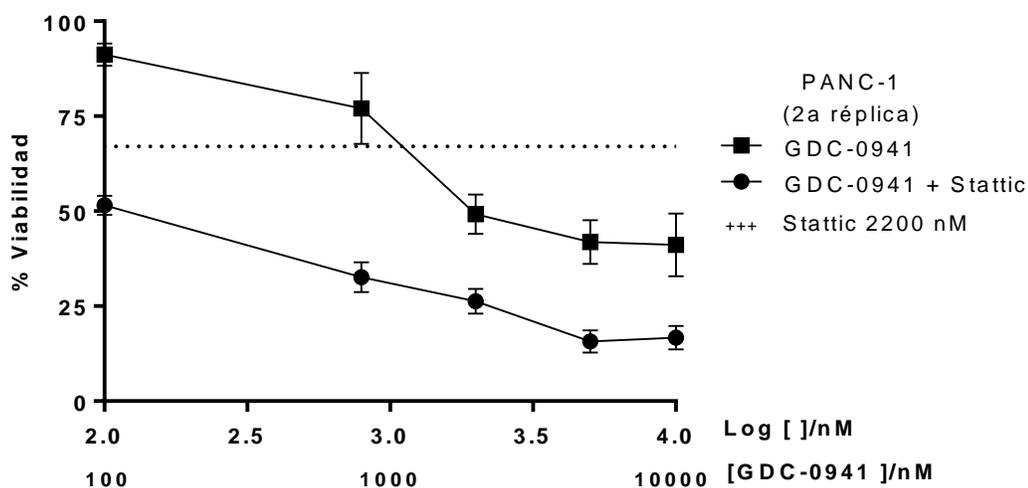


Figura 30. Curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic. Réplica 2

5.2. Resultados del análisis proteómico basado en espectrometría de masas

El análisis proteómico de las células PANC-1 y MIA PaCa-2 mediante espectrometría de masas permitió la identificación de 6 024 proteínas en total. A partir de esta lista se cuantificaron 4 808 proteínas y se encontraron 743 proteínas diferencialmente expresadas, considerando una razón de cambio mayor o igual a 2, $p < 0.05$ y proteínas cuantificadas con al menos dos péptidos. Los resultados se muestran en la Tabla 34 del Apéndice. Se encontraron 407 proteínas sobreexpresadas y 336 proteínas subexpresadas en las células PANC-1 con respecto a las células MIA PaCa-2.

Para ayudar a discernir los posibles procesos moleculares subyacentes en las diferencias del proteoma celular de PANC-1 en relación con el proteoma de las células MIA PaCa-2, se realizó un análisis de las redes de interacción proteína-proteína a partir de la lista de proteínas diferencialmente expresadas, utilizando la herramienta bioinformática STRING con el software Cytoscape 3.7.1. En la Figura 31 se muestran los grupos de redes encontrados, así como los términos de ontología génica más representativos de cada grupo. Estos últimos incluyen los términos “membrana”, “regulación de procesos metabólicos de fosfato”, “fosforilación oxidativa”, “interacción matriz extracelular-receptor”, “plegamiento de proteínas” y “peroxisoma”.

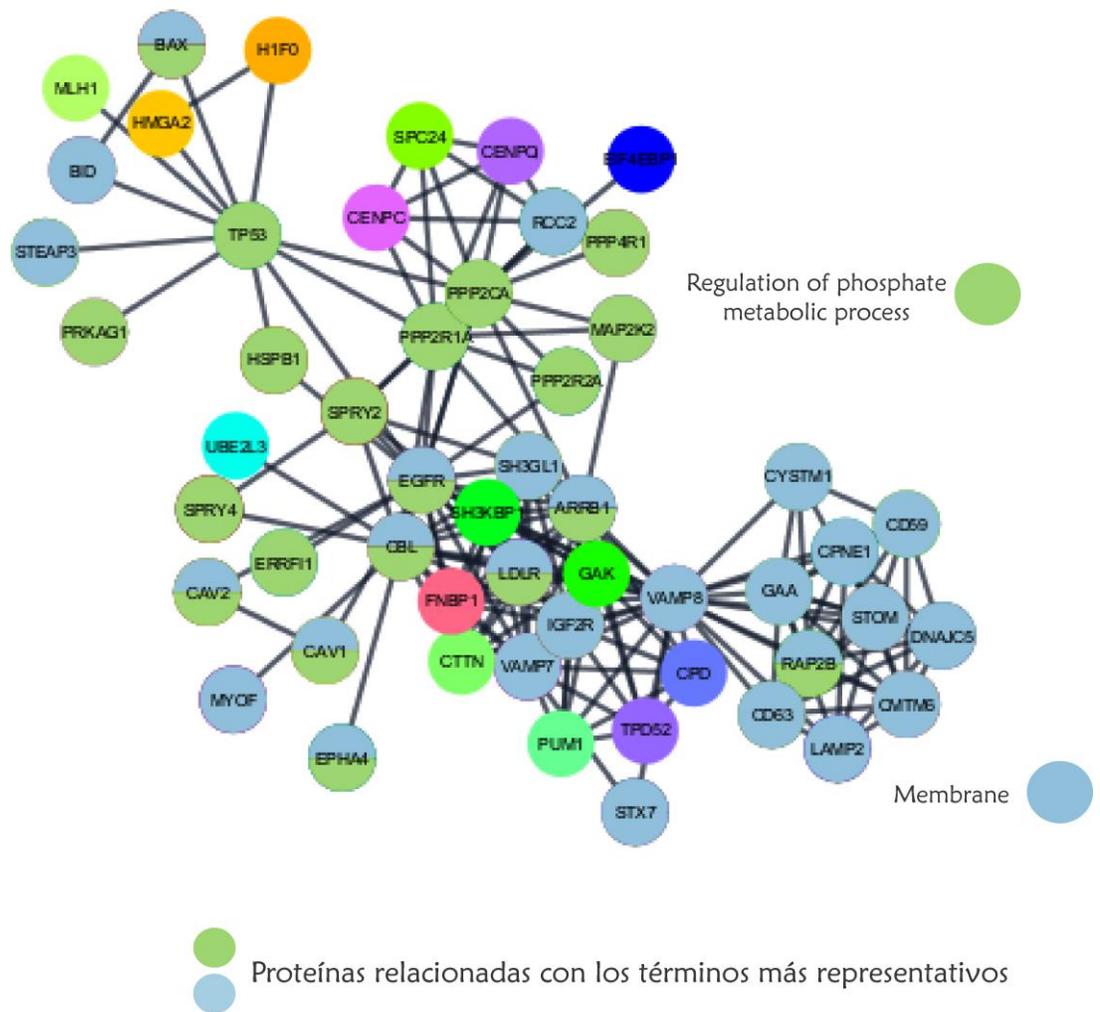


Figura 31. Grupos de redes de interacción proteína-proteína encontradas a partir del análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2. El análisis se efectuó con STRING. Los términos más representativos de cada grupo se indican al lado de cada uno de ellos y las proteínas que los conforman se presentan en color uniforme.

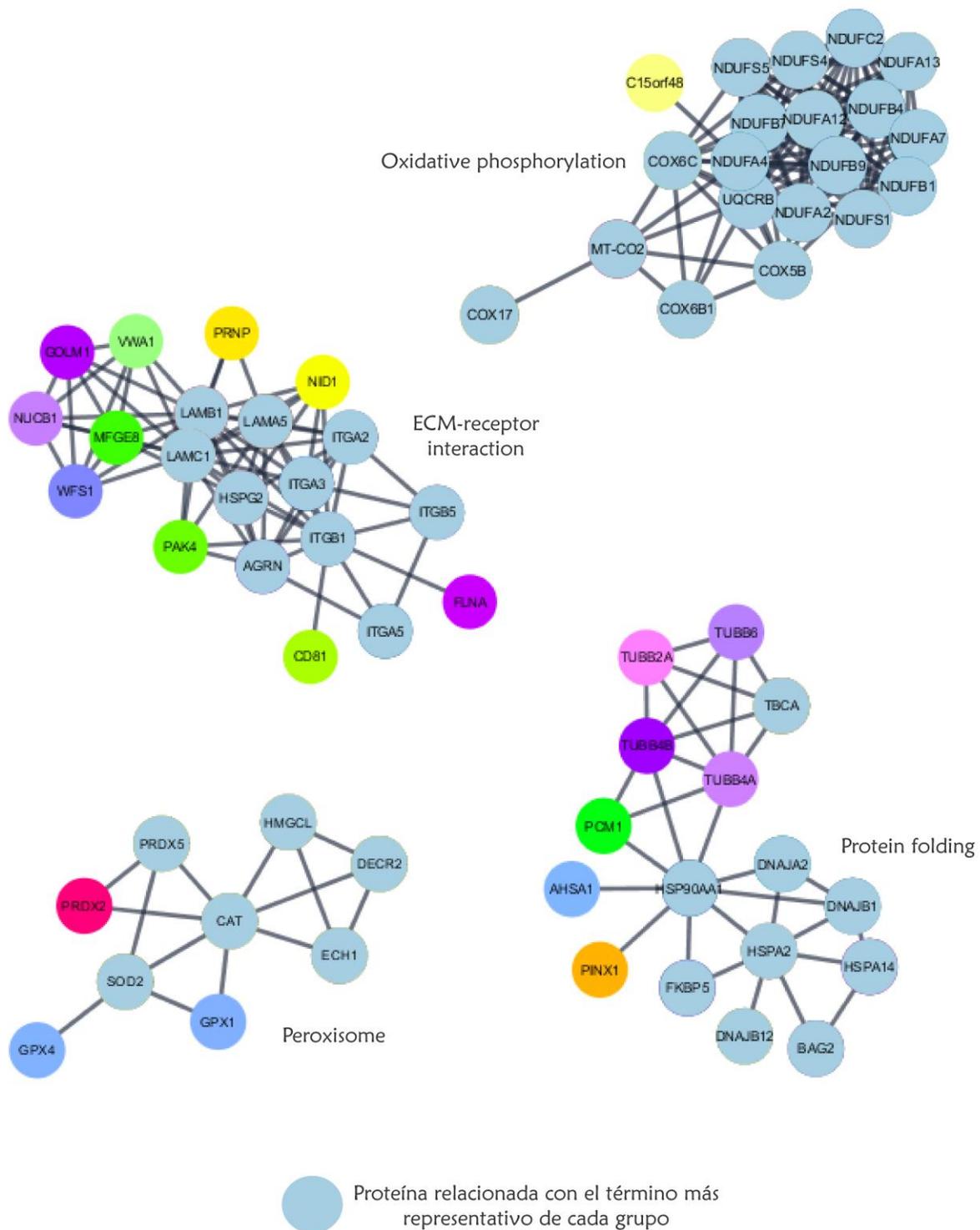


Figura 31 (continuación). Grupos de redes de interacción proteína-proteína encontradas a partir del análisis de las proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2. El análisis se efectuó con STRING. Los términos más representativos de cada grupo se indican al lado de cada uno de ellos y las proteínas que los conforman se presentan en color uniforme.

También se realizó un análisis para identificar los procesos biológicos representados por las proteínas diferencialmente expresadas utilizando la herramienta bioinformática ClueGO 2.5.4 en el software Cytoscape. Se consideraron los procesos biológicos más significativos ($p < 0.05$, corregido por comparaciones múltiples) tomando como referencia al conjunto de 4 808 proteínas cuantificadas. En la Figura 32 se muestran los resultados de este análisis, indicando los procesos biológicos correspondientes como grupos de un solo color. Los procesos más representativos se muestran en letras y nodos más grandes. La Tabla 3 resume los resultados indicando el número de genes (en nuestro caso, proteínas) asociados a cada término y en la Tabla 35 del Apéndice se listan todos los genes correspondientes.

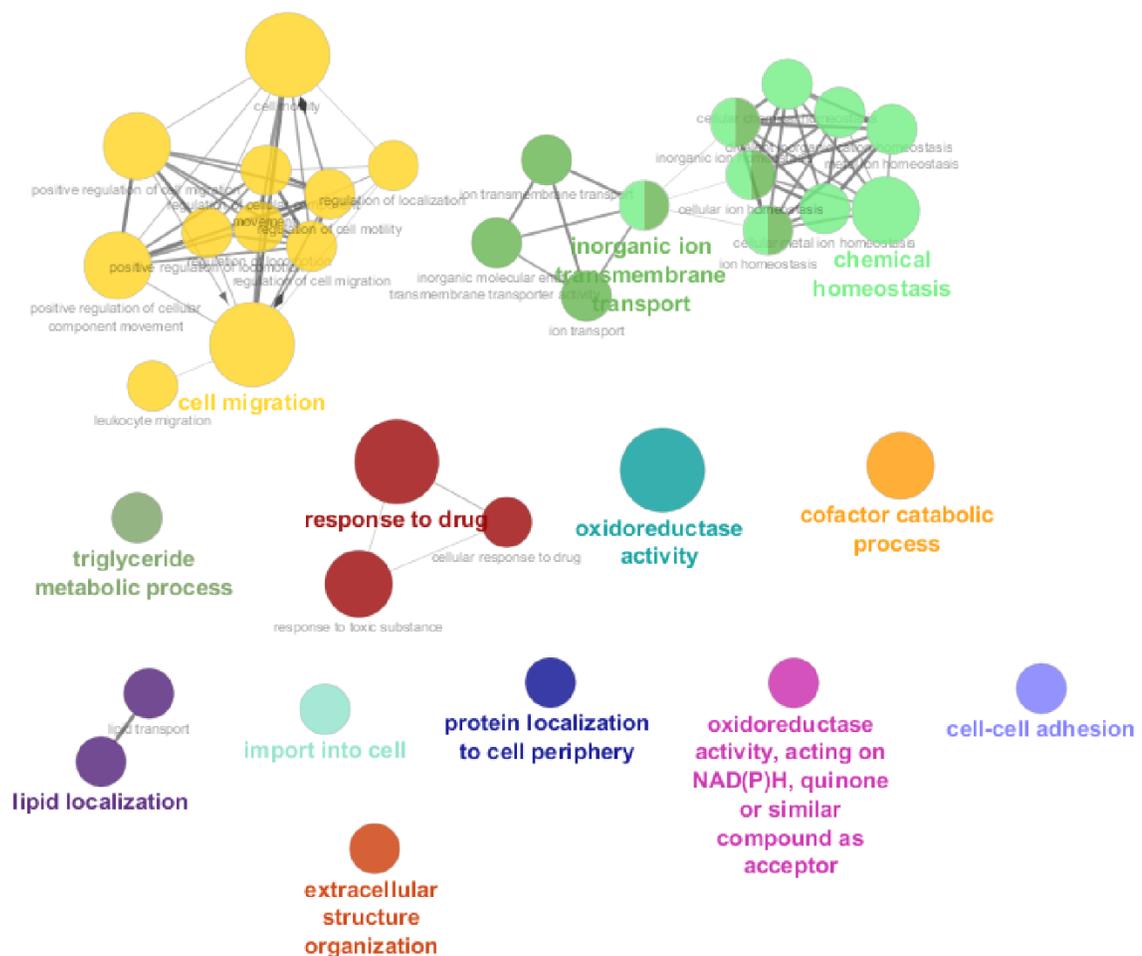


Figura 32. Procesos biológicos más representativos de las proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2, de acuerdo con el análisis realizado con ClueGO 2.5.4

Tabla 3. Procesos biológicos representados por las proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2, de acuerdo al análisis con ClueGO

Término GO (Proceso biológico)	Valor de p	# genes
Oxidoreductase activity	3.00E-09	105
Response to drug	9.08E-08	100
Chemical homeostasis	4.68E-07	90
Inorganic ion transmembrane transport	6.74E-06	68
Cofactor catabolic process	9.61E-06	17
Cell migration	2.46E-05	119
Triglyceride metabolic process	3.20E-05	14
Import into cell	5.30E-05	69
Protein localization to cell periphery	6.41E-05	45
Cell-cell adhesion	8.05E-05	64
Oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor	8.41E-05	19
Extracellular structure organization	8.92E-05	39
Lipid localization	9.13E-05	38

Como ejemplo de los datos de espectrometría de masas, en la Figura 33 se muestran los cromatogramas de iones extraídos correspondientes a péptidos de algunas de las proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas entre las células MIA PaCa-2 y PANC-1. En estos cromatogramas se ilustran las diferencias en intensidad de los iones, es decir, la distinta abundancia de los péptidos indicados en cada línea celular.

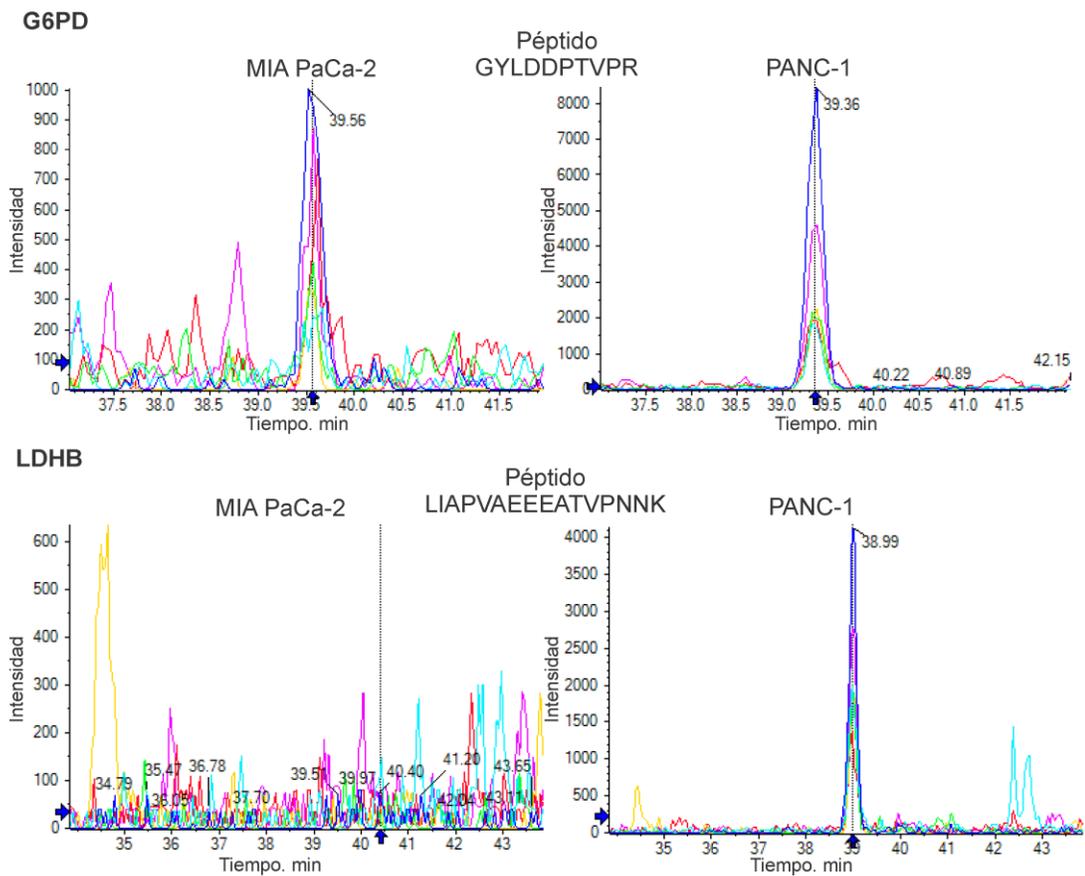


Figura 33. Ejemplos de las señales de péptidos de algunas proteínas diferencialmente expresadas entre las células MIA PaCa-2 y PANC-1, de acuerdo al análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

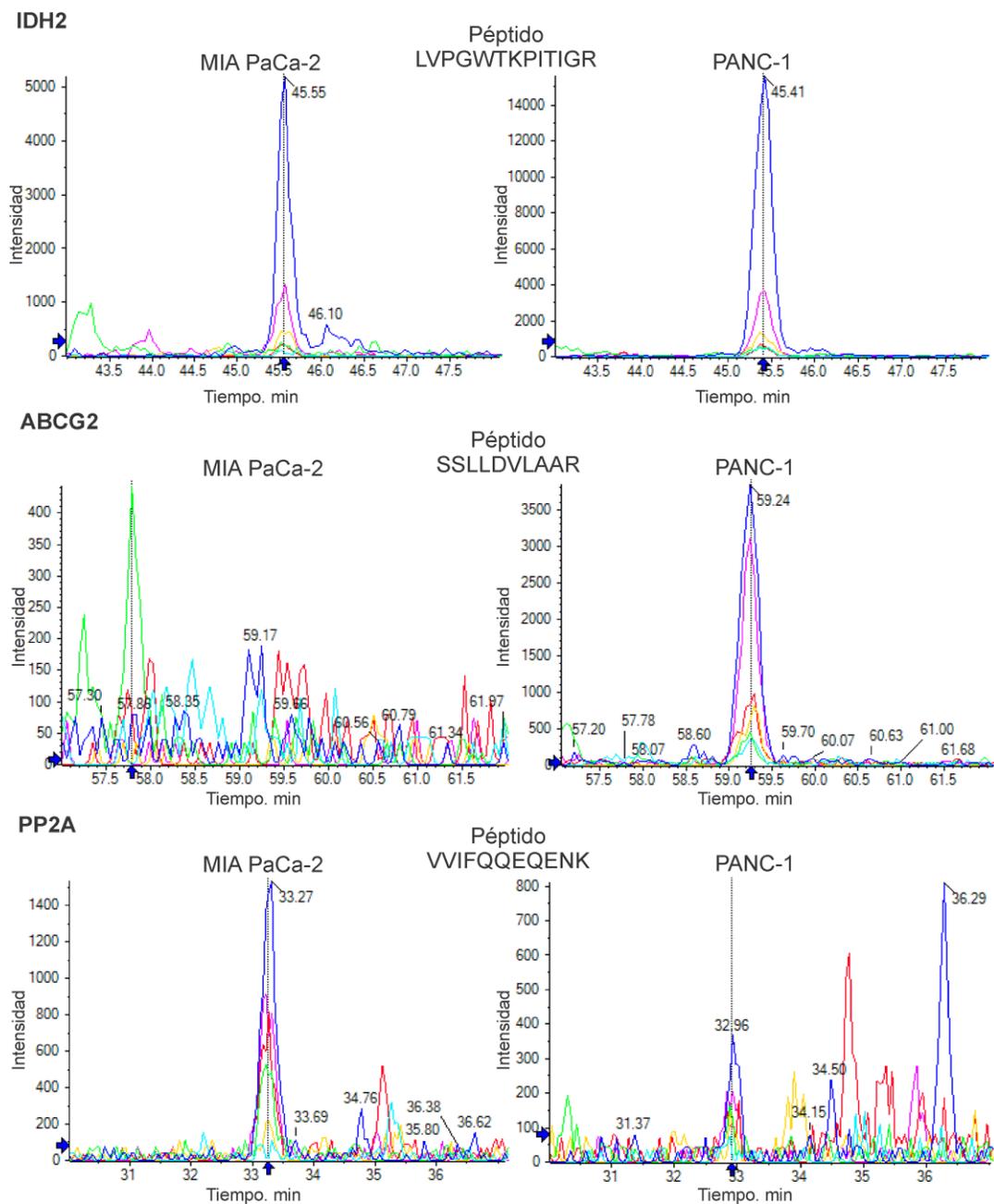


Figura 33. (continuación) Ejemplos de las señales de péptidos de algunas proteínas diferencialmente expresadas entre las células MIA PaCa-2 y PANC-1, de acuerdo al análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

5.3. Resultados de viabilidad de las células resistentes PANC-1 con fármacos seleccionados

5.3.1. Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco 6-aminonicotinamida (6AN)

Una de las proteínas encontradas sobreexpresadas en las células PANC-1 fue G6PD, *glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*, que está involucrada en el metabolismo y en procesos con actividad oxidorreductasa. Se estudió el efecto del tratamiento con el fármaco 6AN (inhibidor de la proteína G6PD) en concentraciones variables (0.1 - 7 000 μM) sobre la viabilidad de las células PANC-1. Los resultados de este tratamiento se presentan en las Figuras 34-36. Se observó que la viabilidad celular se mantiene por encima de 80% en el intervalo de concentraciones 0.1 - 5 μM , pero se reduce gradualmente al aumentar la concentración. 6AN 50 μM disminuye la viabilidad a 66-55%, dependiendo de la réplica experimental; concentraciones mayores (200 – 7 000 μM) reducen la viabilidad desde 50% hasta 4%. El tratamiento de las células PANC-1 con 6AN resultó en valores de CI50 de 118.0 μM , 123.5 μM , y 138.6 μM , correspondientes a cada una de las tres réplicas experimentales. El promedio de estos valores fue de CI50 = 126.3 ± 11.2 μM . Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 36-38 del Apéndice. En este tratamiento se encontró un fenómeno particular, pues se observó que al tratar las células con el fármaco 6AN los valores de viabilidad obtenidos con el método con CCK-8 eran muy bajos con las concentraciones más altas, aunque aún se observaba cierta cantidad de células al microscopio, muy probablemente mayor a 4% con respecto a los controles. Por tanto, se decidió utilizar también un método de tinción celular (violeta cristal), que permite determinar indirectamente la cantidad de células presentes en cada pozo después del tiempo de tratamiento (punto 1.5) y puede verse también como una medición indirecta de la viabilidad celular. Debido a esta observación, otros tratamientos con fármacos que también intervienen en el metabolismo (metformina y 2-desoxi-D-glucosa, mostrados más adelante) fueron analizados con el mismo método de tinción para determinar la viabilidad.

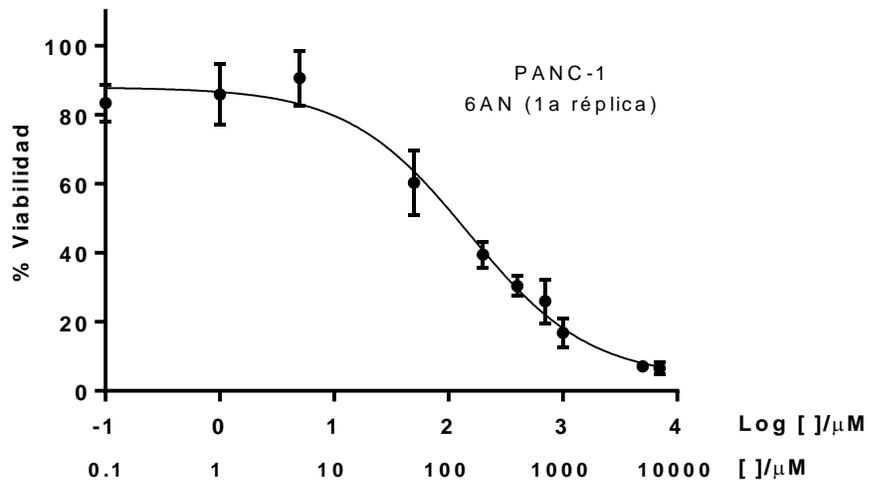


Figura 34. Curva de viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 1

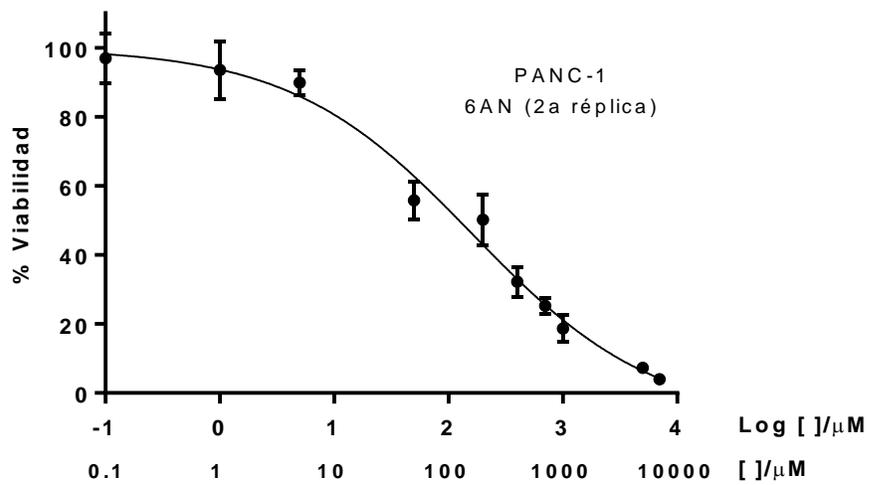


Figura 35. Curva de viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 2

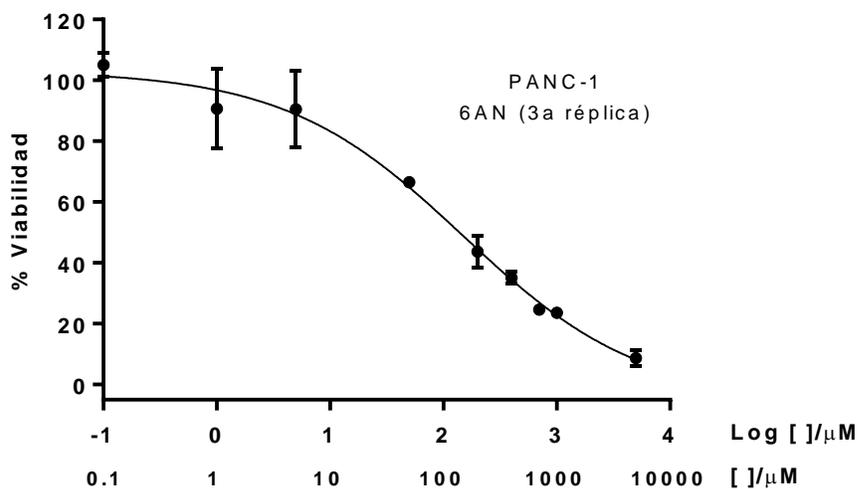


Figura 36. Curva de viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 3

Los resultados del tratamiento de las células PANC-1 con 6AN utilizando el método de violeta cristal se muestran en las Figuras 37-39. Se encontró que la viabilidad decrece a 47-39% en el intervalo de concentraciones de 200 - 1 000 µM y que con 6AN 5 000 µM o 7 000 µM los valores son cercanos a 20%. El valor de CI50 de cada réplica fue: 1ra = 136.0 µM, 2da = 182.5 µM y 3ra = 131.0 µM. El promedio de CI50 del tratamiento con 6AN analizado mediante tinción con violeta cristal fue de 149.8 ± 28.4 µM. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 39-41 del Apéndice.

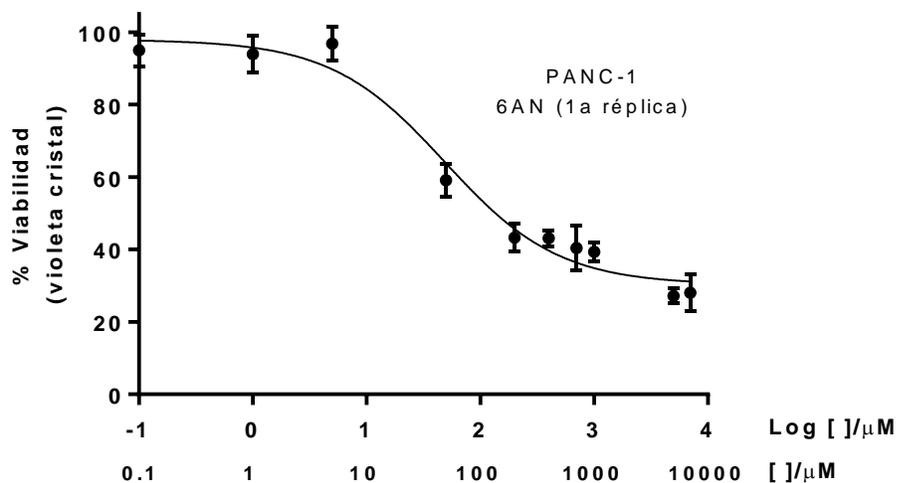


Figura 37. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 1

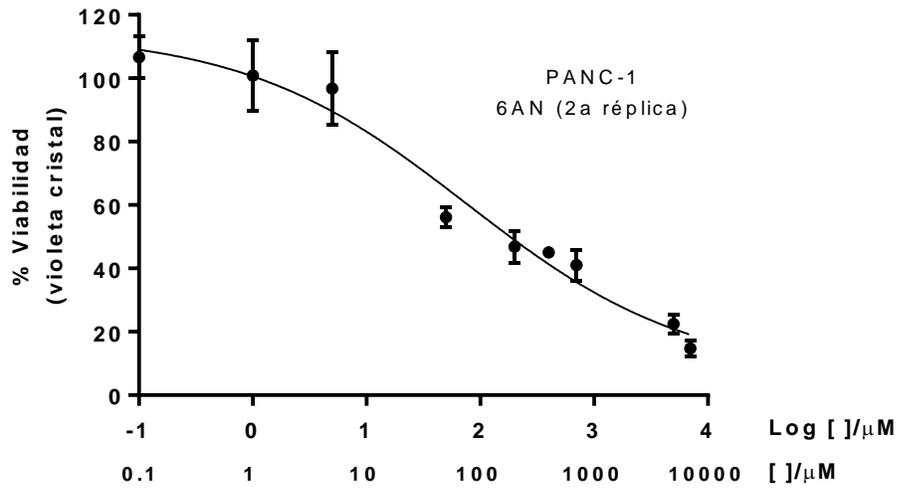


Figura 38. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 2

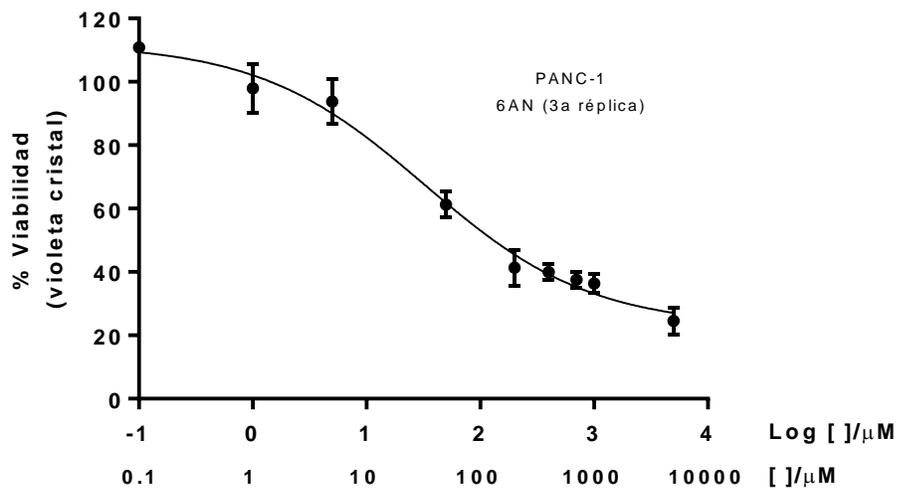


Figura 39. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 3

5.3.2. Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco metformina

Las células PANC-1 mostraron sobreexpresión de un grupo de proteínas que forman parte del complejo I de la cadena transportadora de electrones (e.g. NDUFA7, NDUFB4, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC2) y que está involucrado en la fosforilación oxidativa, por lo que se probó la resupuesta de las células PANC-1 a la inhibición de este complejo con el fármaco

metformina. Los resultados se muestran en las Figuras 40-42. Se encontró reducción de la viabilidad dependiente de la concentración en el intervalo 2.34 mM a 150 mM, hasta alcanzar 4% como valor más bajo entre las tres réplicas experimentales. El cálculo de CI50 de cada réplica indicó los siguientes valores: 1ra réplica = 16.3 mM, 2da réplica = 12.7 mM, 3ra réplica = 18.3 mM. La CI50 promedio fue 15.8 ± 2.8 mM. Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 42-44 del Apéndice.

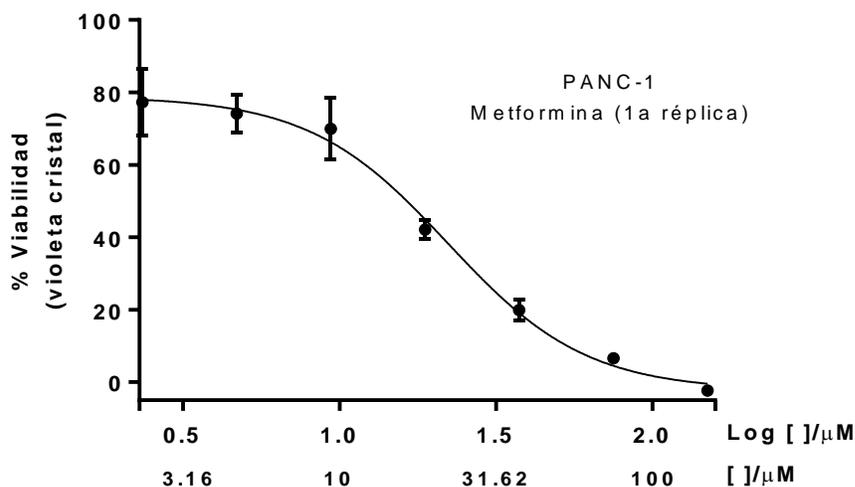


Figura 40. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con metformina. Réplica 1

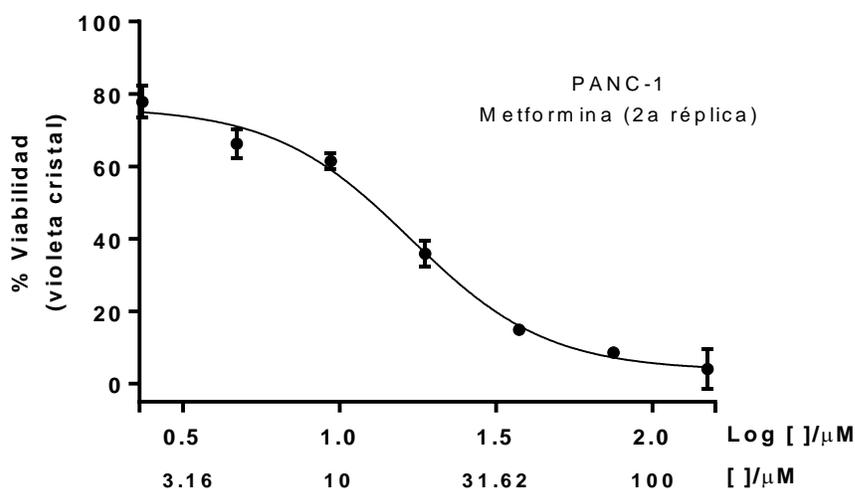


Figura 41. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con metformina. Réplica 2

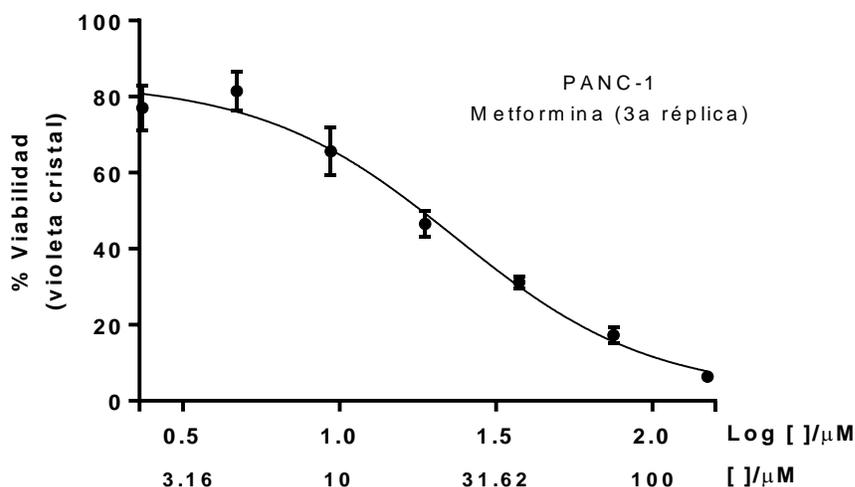


Figura 42. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con metformina. Réplica 3

5.3.3. Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco 2-desoxi-D-glucosa (2DG)

Además de G6PD y proteínas integrantes del complejo I mitocondrial, en las células PANC-1 se encontraron sobreexpresadas otras proteínas metabólicas como LDHB (*lactate dehydrogenase B*) e IDH2 (*isocitrate dehydrogenase, mitocondrial*). Se determinó entonces la viabilidad de las células empleando 2DG, un inhibidor del metabolismo de glucosa. Los resultados se muestran en las Figuras 43-45. El intervalo de concentraciones corresponde a 0.16 – 160 mM, observándose que la viabilidad disminuyó de manera progresiva al incrementar la concentración de 2DG, hasta 16.1% como punto más bajo entre las réplicas experimentales. De estos resultados se obtuvo un valor promedio de $CI_{50} = 13.0 \pm 2.9$ mM, a partir de las CI_{50} de cada réplica (1ra réplica = 9.7 mM, 2da réplica = 14.5 mM y 3ra réplica = 14.9 mM). Los datos numéricos se encuentran en las Tablas 45-47 del Apéndice

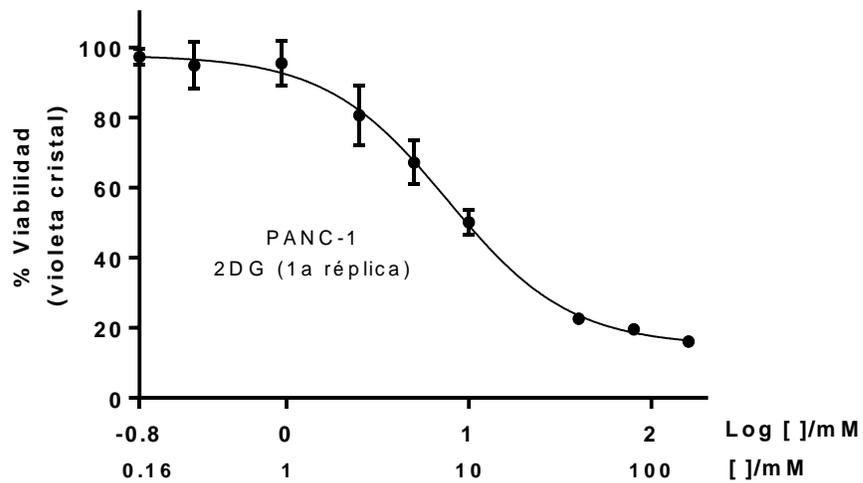


Figura 43. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG. Réplica 1

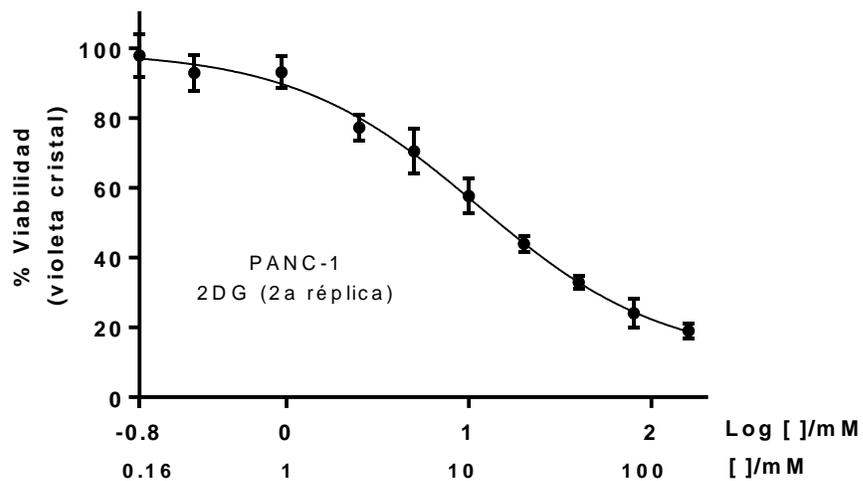


Figura 44. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG. Réplica 2

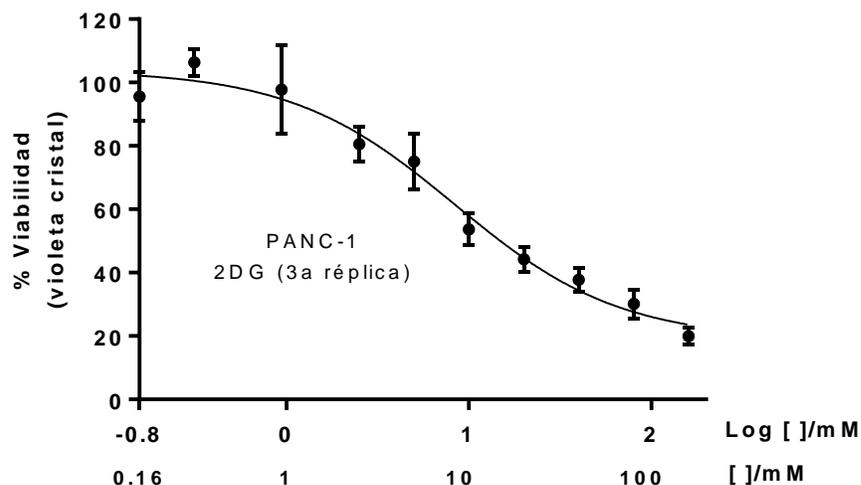


Figura 45. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG. Réplica 3

5.3.4. Viabilidad de las células PANC-1 con el fármaco 2DG en combinación con Stattic

Se llevó a cabo la determinación de viabilidad de las células PANC-1 sometidas a tratamiento de combinación con 2DG y Stattic. Se utilizó el valor de CI50 obtenido de los experimentos individuales (Figuras 24-26 de Stattic, punto 5.1.4; y Figuras 43-45 de 2DG, punto 5.3.3). Las concentraciones de ambos inhibidores se variaron en proporción 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 veces las CI50 respectivas, resultando en un intervalo de Stattic 550 – 8 800 nM y de 2DG 3.25 - 52 mM. Las Figuras 46 y 47 presentan los resultados y los datos numéricos se encuentran en las Tablas 48-53 del Apéndice. Se encontró que la viabilidad se mantiene arriba de 80% al emplear los inhibidores en concentración 0.25 veces la CI50 respectiva (550 nM de Stattic y 3.75 mM de 2DG), tanto de manera individual como en combinación. Los resultados con tratamientos individuales mantuvieron una tendencia similar hasta antes de la concentración correspondiente a 2 veces CI50 (4400 nM de Stattic y 30.8 mM de 2DG), cuando la viabilidad de las células decreció hasta 5-7% con el tratamiento con Stattic solo o en combinación, pero no con 2DG de manera individual, que presentó valores mayores de viabilidad.

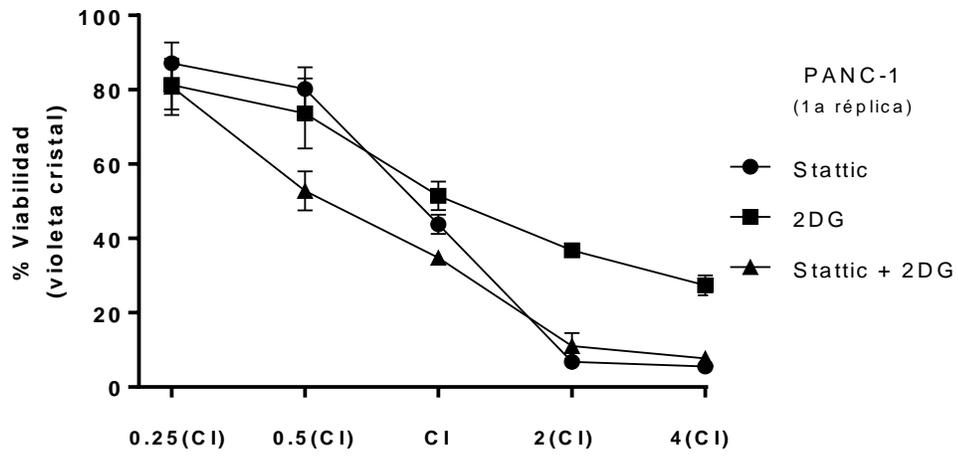


Figura 46. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic de manera individual y en combinación. Réplica 1

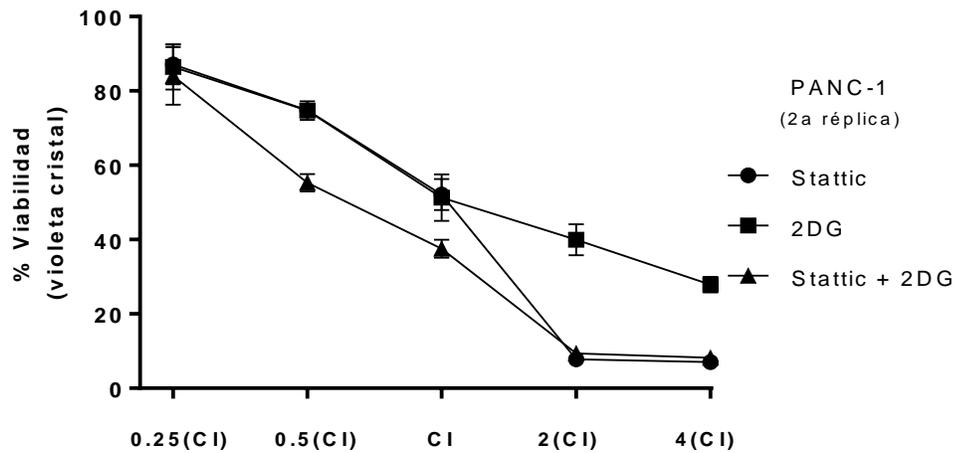


Figura 47. Curva de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic de manera individual y en combinación. Réplica 2

5.4. Resultados de Western blot

5.4.1. Tratamientos con AZD6244 y GDC0-941 de las células MIA PaCa-2 y PANC-1

Para determinar el efecto de los inhibidores AZD6244 y GDC-0941 sobre la fosforilación de proteínas relacionadas con las vías Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt y STAT3 en las células PANC-1 y MIA PaCa-2, se investigó la expresión de proteínas fosforiladas y las correspondientes proteínas totales mediante Western blot (Figuras 48 y 49), empleando tinción con rojo de Ponceau como control de carga [69]. En la Figura 48 se observan los resultados de los ensayos para las proteínas Akt, ERK, 4E-BP1, S6 y STAT3 en las células MIA PaCa-2 tratadas con los inhibidores de MEK y PI3K (1 - 72 h en concentraciones iguales a CI50), de manera individual y en combinación. En la Figura 49 se muestran los resultados correspondientes a las células PANC-1 (1 - 72 h con concentraciones de GDC-0941= 2 μ M y AZD6244= 500 nM).

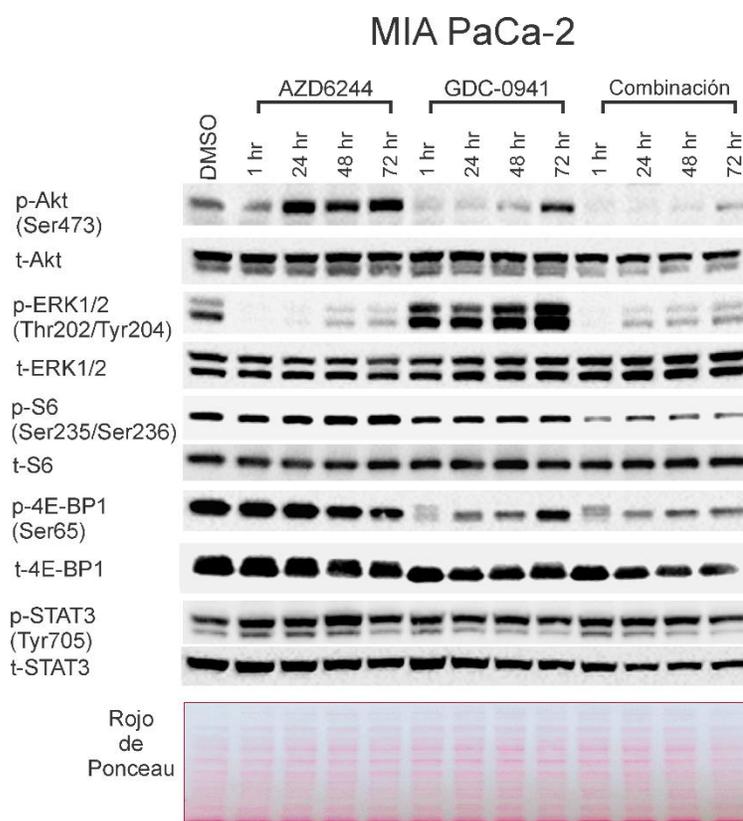


Figura 48. Western blot de proteínas relacionadas con las vías de MEK, PI3K y STAT3 en las células MIA PaCa-2 tratadas durante 1-72 h con AZD6244 y GDC-0941, de manera individual y en combinación.

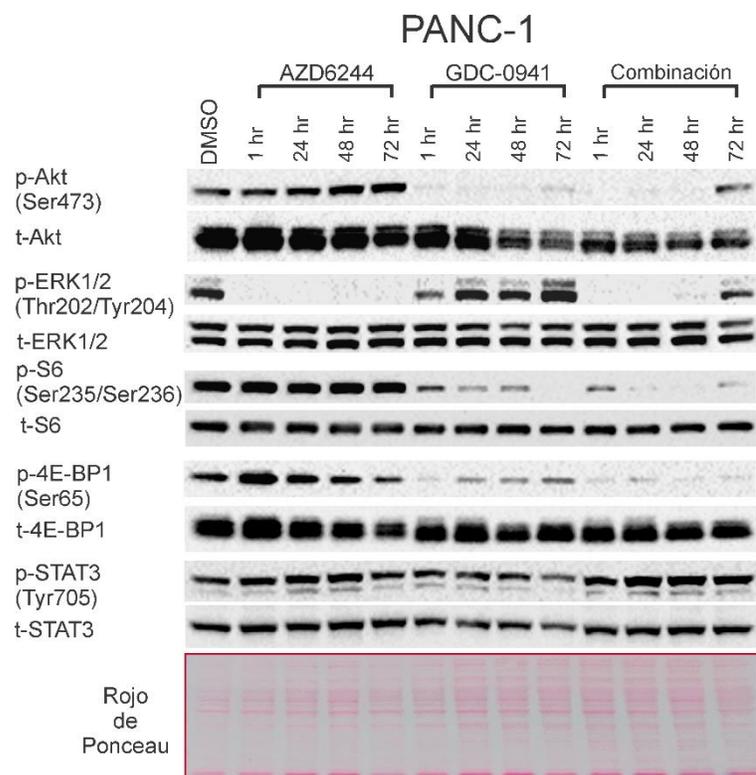


Figura 49. Western blot de proteínas relacionadas con las vías de MEK, PI3K y STAT3 en las células PANC-1 tratadas durante 1-72 h con AZD6244 y GDC-0941, de manera individual y en combinación.

Los resultados de densitometría se muestran en las Figuras 50-54. Los valores fueron normalizados con respecto a la tinción con rojo de Ponceau.

En las células MIA PaCA-2, el tratamiento con AZD6244 resultó en un marcado incremento en la fosforilación de Akt (Figura 50), redujo la fosforilación de ERK (Figura 51) y de 4E-BP1 (Figura 52), y se observó inducción de p-S6 (Figura 53). Por su parte, el tratamiento con GDC-0941 disminuyó la fosforilación de Akt, 4E-BP1 y de S6, y se elevaron los niveles de p-ERK. Con el tratamiento de combinación se encontró una inhibición general de la fosforilación de estas proteínas. También se observó que los tratamientos individuales incrementaron los niveles de p-STAT3, y que la combinación de los inhibidores produjo una elevación mayor de los mismos (Figura 54).

En cuanto a los tratamientos de las células PANC-1, AZD6244 elevó los niveles de p-Akt (Figura 50), bloqueó la fosforilación de ERK a lo largo del tratamiento (Figura 51) y disminuyó los niveles de p-4E-BP1 (Figura 52), sin afectar los de p-S6 (Figura 53). GDC-0941 inhibió la fosforilación de Akt, 4E-BP1, S6 y también redujo la fosforilación de ERK. El tratamiento conjunto disminuyó en general la fosforilación de todas estas proteínas.

Los niveles de p-STAT3 en las células PANC-1 no se vieron afectados por la inhibición de MEK y PI3K de manera individual (Figura 54), pero al igual que en el caso de las células MIA PaCa-2, la fosforilación de STAT3 se incrementó cuando las células fueron tratadas con la combinación de los fármacos AZD6244 y GDC-0941.

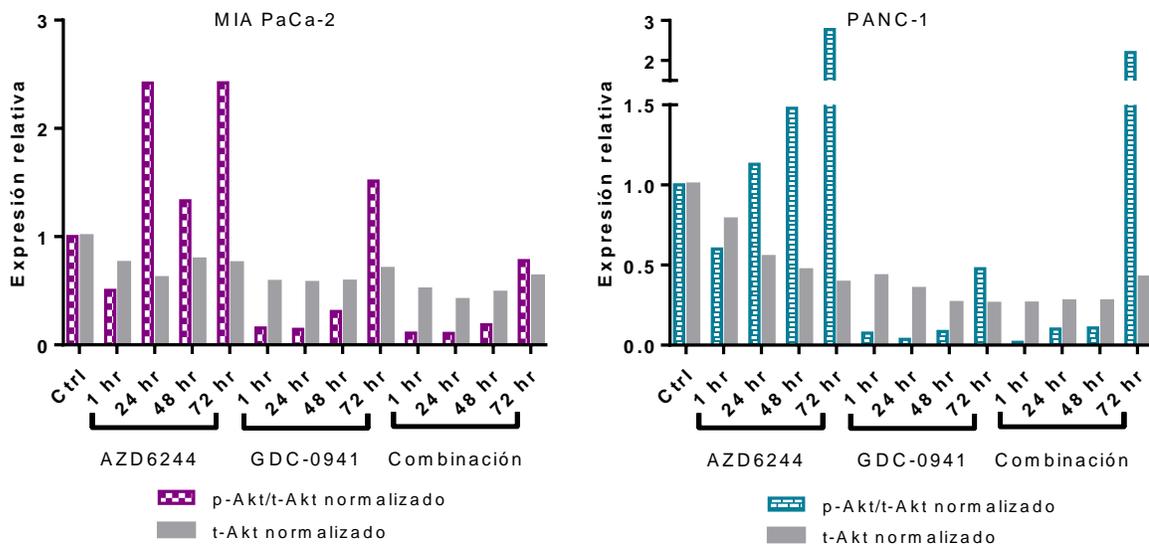


Figura 50. Gráficas de densitometría de la cinasa Akt fosforilada y total en células MIA PaCa-2 y PANC-1 al ser tratadas durante 1 - 72 h con AZD6244 y GDC-0941 de manera individual y en combinación. Datos correspondientes a las Figuras 48 y 49.

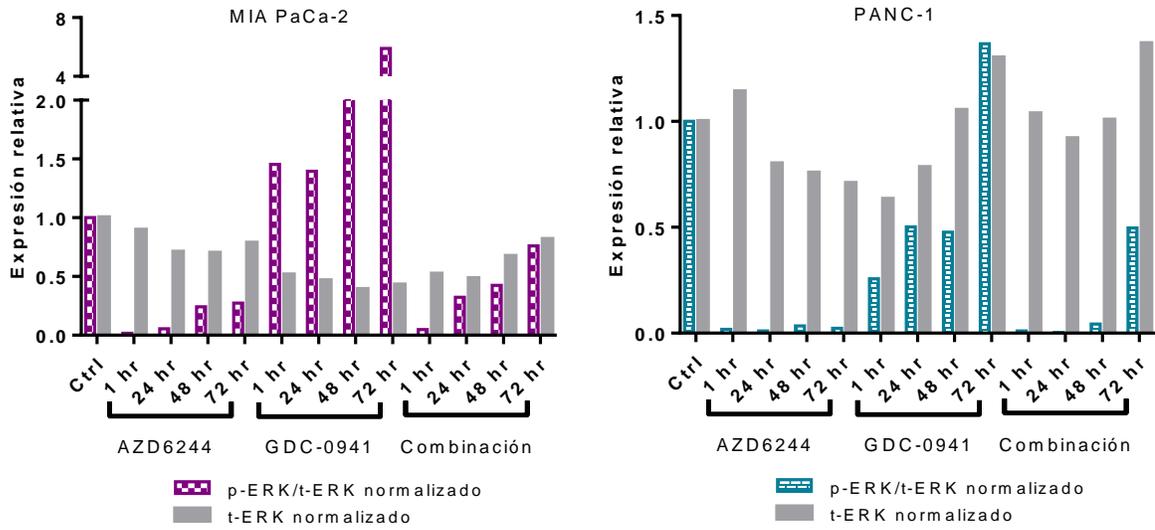


Figura 51. Gráficas de densitometría de la cinasa ERK fosforilada y total en células MIA PaCa-2 y PANC-1 al ser tratadas durante 1 - 72 h con AZD6244 y GDC-0941 de manera individual y en combinación. Datos correspondientes a las Figuras 48 y 49.

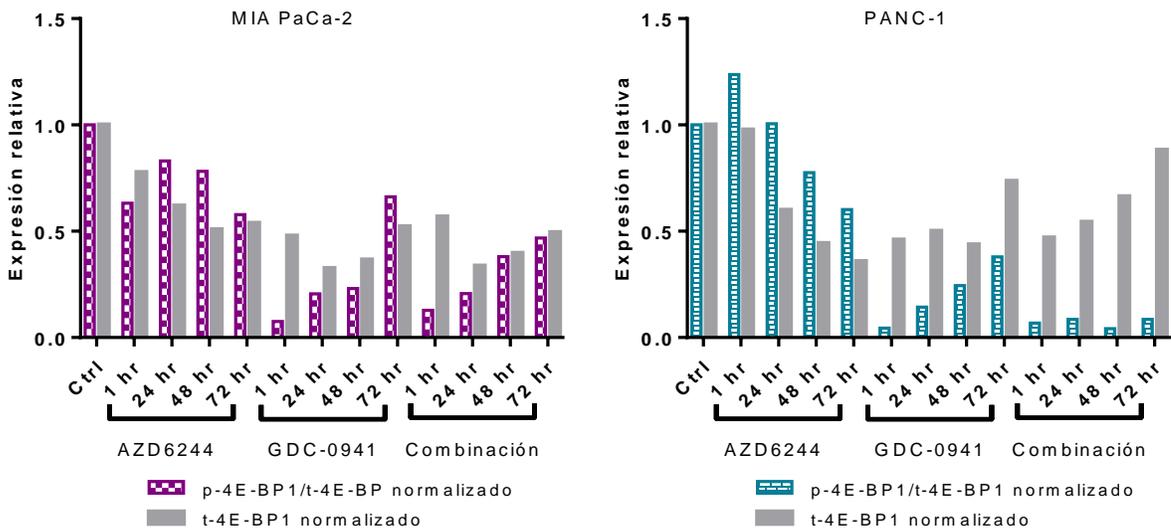


Figura 52. Gráficas de densitometría de 4E-BP1 fosforilada y total en células MIA PaCa-2 y PANC-1 al ser tratadas durante 1 - 72 h con AZD6244 y GDC-0941 de manera individual y en combinación. Datos correspondientes a las Figuras 48 y 49.

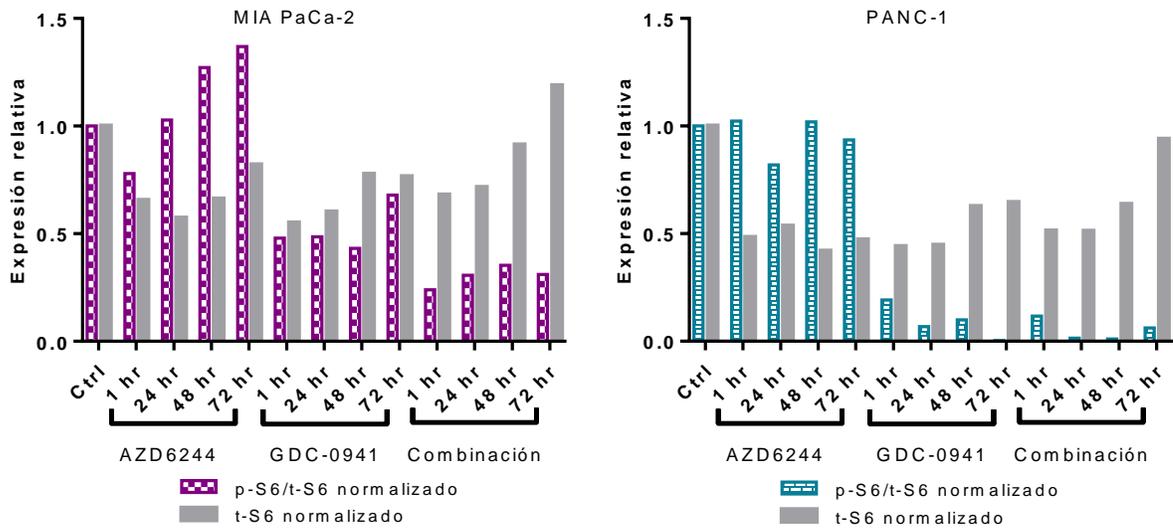


Figura 53. Gráficas de densitometría de S6 fosforilada y total en células MIA PaCa-2 y PANC-1 al ser tratadas durante 1 - 72 h con AZD6244 y GDC-0941 de manera individual y en combinación. Datos correspondientes a las Figuras 48 y 49.

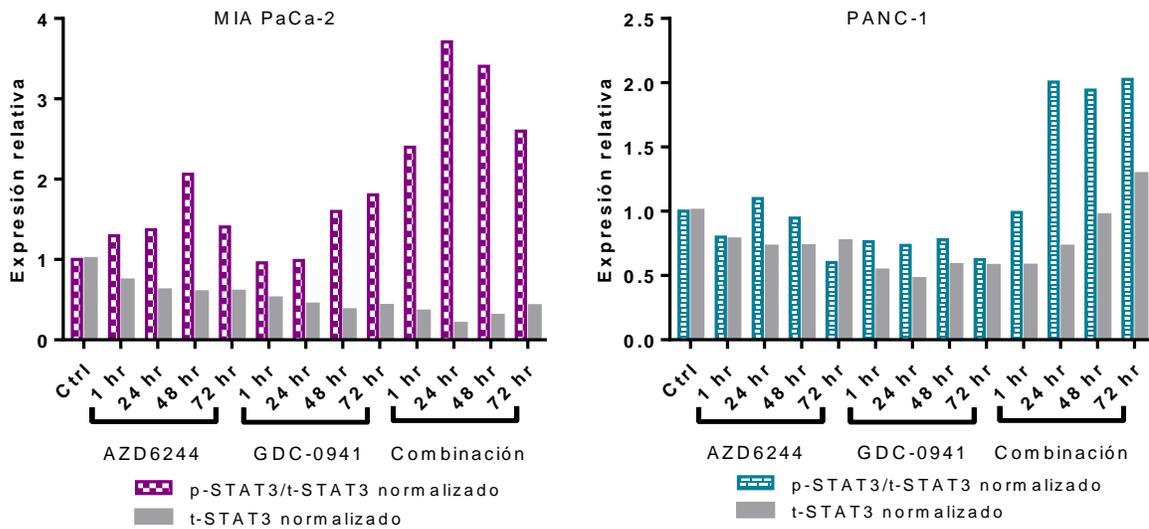


Figura 54. Gráficas de densitometría de STAT3 fosforilada y total en células MIA PaCa-2 y PANC-1 al ser tratadas durante 1 - 72 h con AZD6244 y GDC-0941 de manera individual y en combinación. Datos correspondientes a las Figuras 48 y 49.

5.4.2. Validación de los resultados obtenidos por espectrometría de masas

Los resultados obtenidos mediante proteómica por espectrometría de masas (punto 5.2) indicaron sobreexpresión de varias proteínas en las células PANC-1 con respecto a las células MIA PaCa-2. Estos resultados se validaron de manera general empleando Western blot para las proteínas EGFR, G6PD, IDH2 y LDHB (ver Figura 55).

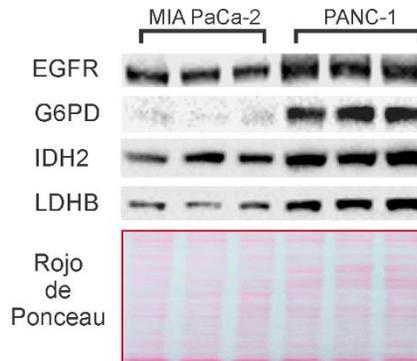


Figura 55. Validación por Western blot de los resultados de algunas proteínas sobreexpresadas en las células PANC-1 con respecto a MIA PaCa-2

Los valores de expresión relativa, normalizados con los datos de rojo de Ponceau, se ilustran en la Figura 56.

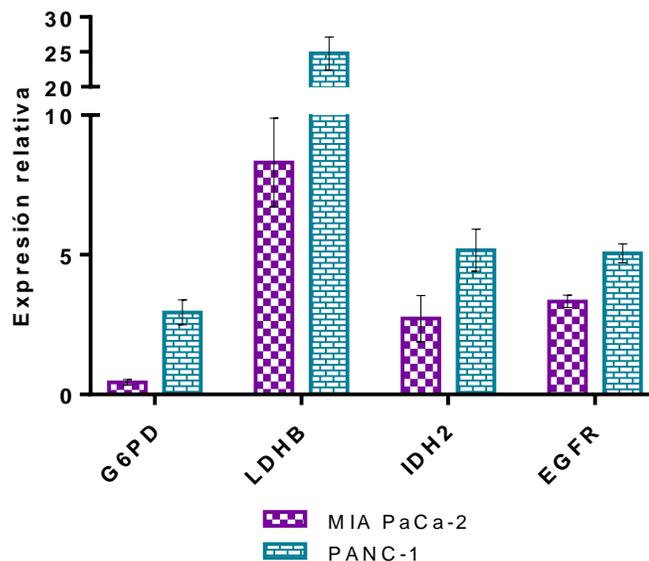


Figura 56. Gráfica de densitometría de las proteínas G6PD, LDHB, IDH2 y EGFR en células MIA PaCa-2 y PANC-1, correspondiente a la Figura 55.

5.4.3. Expresión relativa de p-Akt y p-ERK basales en MIA PaCa-2 y PANC-1

Los niveles basales de p-ERK y p-Akt también se investigaron por Western blot. Los resultados se encuentran en la Figura 57 y la comparación densitométrica normalizada con rojo de Ponceau se presenta en la Figura 58.

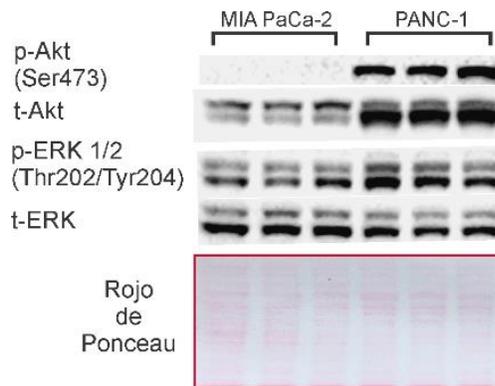


Figura 57. Western blot de cinasas Akt y ERK fosforiladas y totales en condiciones basales en las células MIA PaCa-2 y PANC-1

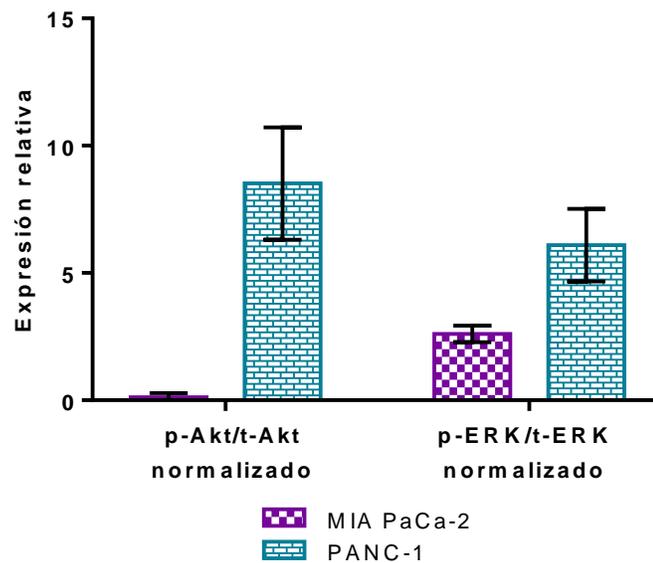


Figura 58. Grafica de densitometría de p-Akt y p-ERK basales en las células MIA PaCa-2 y PANC-1

5.4.4. Tratamiento de las células PANC-1 con Stattic y 2DG

Las células PANC-1 fueron tratadas con el inhibidor de STAT3, Stattic (punto 5.1.4) y un inhibidor del metabolismo de glucosa, 2DG (punto 5.3.3). Se llevaron a cabo experimentos de Western blot para conocer la expresión durante estos tratamientos de p-STAT3 y de varias proteínas relacionadas con el metabolismo que fueron encontradas con sobreexpresión en PANC-1 (G6PD, IDH2, LDHB). Los resultados se presentan en la Figura 59. Las comparaciones gráficas a partir de los datos densitométricos se pueden observar en la Figura 60.

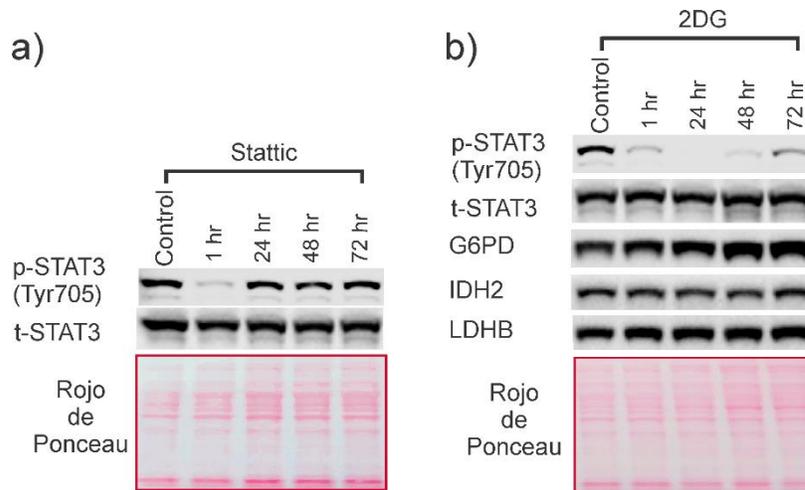


Figura 59. a) Western blot de p-STAT3 en las células PANC-1 durante el tratamiento con Stattic, b) Western blot de p-STAT3, G6PD, IDH2 y LDHB en células PANC-1 durante el tratamiento con 2DG

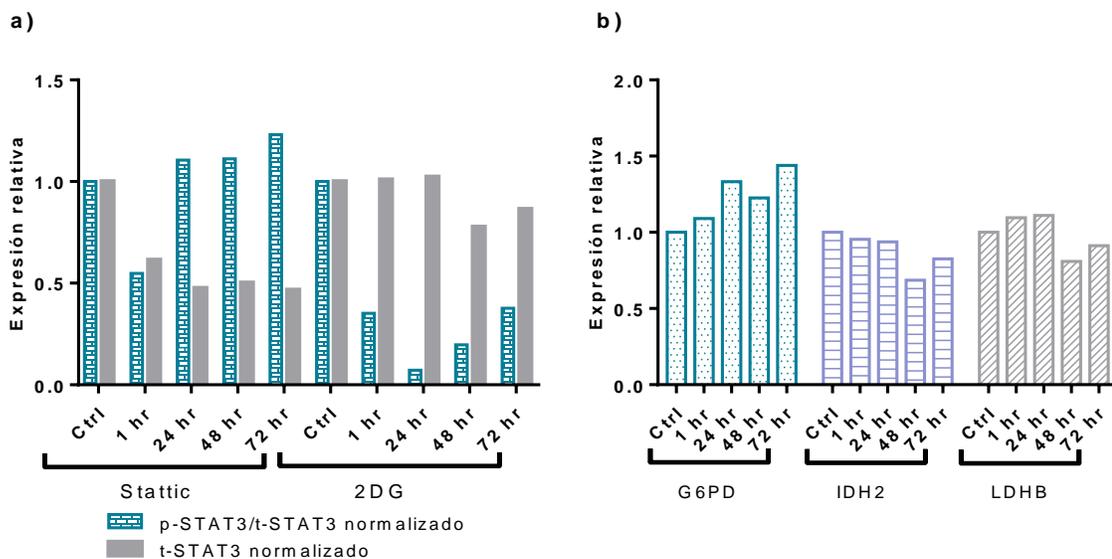


Figura 60. Gráficas de densitometría: a) p-STAT3 durante los tratamientos con Stattic y 2DG, b) G6PD, IDH2 y LDHB durante el tratamiento con 2DG. Datos correspondientes a la Figura 59

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Efecto de la inhibición de las cinasas MEK y PI3K sobre la viabilidad de las células MIA PaCa-2 y PANC-1

La inhibición de MEK con AZD6244 en las células MIA PaCa-2 causó una disminución en la viabilidad celular hasta 50% con una concentración de 333.8 nM. En contraste, la inhibición de MEK en las células PANC-1 provocó solo un pequeño decremento de viabilidad, manteniéndose arriba de 70% incluso con concentraciones de AZD6244 de 5 000 nM o mayores. Este comportamiento evidencia que las células MIA PaCa-2 son sensibles a la inhibición de MEK y, por el contrario, las células PANC-1 son resistentes. La acción del inhibidor AZD6244 sobre la cinasa MEK se comprobó mediante Western blot, pues la fosforilación del sustrato de esta proteína (la cinasa ERK) disminuyó a niveles escasos o casi nulos en ambas líneas celulares.

El tratamiento de las células MIA PaCa-2 con el inhibidor de PI3K resultó en una disminución de la viabilidad semejante a la observada con el inhibidor de MEK, aunque en este caso la concentración inhibitoria media fue 1 801.2 nM. Por otro lado, la viabilidad de las células PANC-1 presentó cierta resistencia a la inhibición de PI3K, ya que se mantuvo por arriba de 40% con concentraciones de GDC-0941 de 5 000 nM y hasta 30 000 nM. Para corroborar la inhibición de PI3K se evaluó la fosforilación de Akt en ambas líneas celulares mediante Western blot, encontrándose disminución de p-Akt a lo largo de los tratamientos. Por otra parte, la inhibición conjunta de PI3K y MEK en las células MIA PaCa-2 causó un decremento en la viabilidad celular mayor al observado en cada tratamiento por separado. Este comportamiento se observó desde concentraciones cuatro veces inferiores a la CI50 de cada inhibidor, los cuales redujeron la viabilidad hasta 40% en combinación, mientras que concentraciones equivalentes a CI50 redujeron la viabilidad celular hasta 20%. Los resultados de Western blot mostraron disminución de la fosforilación de Akt, ERK, 4E-BP1 y S6 en ambas células cuando se inhibieron las cinasas MEK y PI3K en conjunto, pero se observó incremento de p-STAT3.

El marcado efecto en la disminución de la viabilidad de las células MIA PaCa-2 concuerda con los reportes previos sobre la sensibilidad de estas células a la inhibición de PI3K y MEK [42, 43]. Además, al evaluar el efecto de la combinación de estos inhibidores en concentraciones correspondientes a 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 veces el valor de CI50 de cada fármaco, se encontró que cada uno de los tratamientos duales presenta un efecto sinérgico sobre la viabilidad celular (ver Tablas 54 y 55 del Apéndice).

Dado que las células PANC-1 presentaron resistencia a la inhibición de MEK y PI3K en los tratamientos con AZD6244 y GDC-0941, no fue posible trabajar con ellas de la misma manera que se hizo con las células MIA PaCa-2 (utilizando las concentraciones CI50 de cada fármaco).

En su lugar se utilizó una concentración fija de GDC-0941 en combinación con concentraciones variables de AZD6244. Una prueba estadística ANOVA seguida de una prueba de Dunnett demostró que los porcentajes de viabilidad obtenidos con los tratamientos de combinación, al menos con tres concentraciones de AZD6244: 100, 1 000 y 10 000 nM, son significativamente diferentes a la viabilidad resultante del tratamiento individual con GDC-0941 (ver Tablas 56 y 57 de apéndice). Estos datos indican que la resistencia de las células PANC-1 a la inhibición de MEK y PI3K por separado disminuye con el tratamiento conjunto GDC09-41 + AZD6244, aunque son necesarias concentraciones más altas de los fármacos en comparación con las células MIA PaCa-2.

La menor viabilidad de ambas líneas celulares sometidas al tratamiento dual puede explicarse por la inhibición de la fosforilación de varios sustratos importantes, como se corroboró en los experimentos de Western blot, y refleja la dependencia particular de las células sobre las vías de señalización PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK.

6.2. Regulación de las vías de señalización de MEK y PI3K en las células MIA PaCa-2

El aumento en los niveles de p-Akt al inhibir MEK en las células MIA PaCa-2 concuerda con lo reportado por Aksamitiene *et al.* [28] y supone una relación entre la inhibición de MEK y la activación de Akt. ERK, sustrato de MEK, regula a PTEN a través de GSK3; PTEN es un inhibidor natural de la vía PI3K/Akt; por tanto, una consecuente inhibición de ERK puede liberar la regulación negativa sobre la vía PI3K/Akt [13, 28]. La disminución sostenida en la fosforilación de Akt en el tratamiento de combinación AZD6244+GDC-0941 indica que la inhibición simultánea de las cinasas MEK y PI3K bloquea la activación de Akt, esta última probablemente derivada de mecanismos de inter-regulación entre las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK.

Por otro lado, la disminución de la fosforilación de ERK en las células tratadas con AZD6244 comprueba la inhibición de la actividad cinasa de MEK. Sin embargo, los niveles de p-ERK aumentan cuando las células MIA PaCa-2 son tratadas con GDC-0941, lo cual podría ser explicado mecanísticamente por la regulación negativa que Akt ejerce sobre Raf. Según lo reportado por Guan *et al.* [26], Akt es capaz de fosforilar a Raf e inhibir su actividad cinasa. Nuestros resultados comprobaron la inhibición de la fosforilación de Akt durante el tratamiento con GDC-0941, y esta disminución podría interrumpir la regulación negativa de Akt sobre Raf, incrementando la actividad de la vía Raf/MEK/ERK y por tanto los niveles de p-ERK. Con la combinación de los inhibidores AZD6244 y GDC-0941, los niveles de p-ERK se mantuvieron bajos a pesar del incremento observado en el tratamiento individual con GDC-0941, por lo que estos

resultados apuntan a que la inhibición de ambas vías es necesaria para evitar la activación de una de ellas por inhibición de la otra.

La inhibición de MEK en las células MIA PaCa-2 también disminuyó la fosforilación de 4E-BP1. Es posible que esta disminución se deba al bloqueo de la activación de ERK, que actúa como cinasa de 4E-BP1 [70]. Si bien 4E-BP1 se ha descrito principalmente como un sustrato de mTOR, existe evidencia de que la fosforilación de 4E-BP1 no depende exclusivamente de este y que, en realidad, la doble función de ERK como cinasa de 4E-BP1 y supresor de TSC conduce a una reducción de p-4E-BP1 al inhibir MEK [21]. La inhibición de TSC aumentaría la actividad de mTOR y este mecanismo explicaría la diferencia en la disminución de la fosforilación de la proteína 4E-BP1 cuando se inhibe la cinasa MEK con AZD6244 en comparación con los resultados cuando se inhibe la vía PI3K/Akt con el fármaco GDC-0941. Como se observa en la Figura 52, la inhibición de PI3K condujo a una mayor reducción de los niveles de p-4E-BP1. Por otra parte, la inhibición dual de MEK y PI3K mantiene la atenuación en la fosforilación de 4E-BP1.

La reducción en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en el tratamiento de inhibición de PI3K se explica por la reducción de la actividad de mTOR, derivada de la inhibición de p-Akt. La observación de un decremento mayor de p-S6 en el tratamiento conjunto AZD6244 + GDC-0941 podría tener origen en la regulación cruzada de las vías de señalización correspondientes, pues como se mencionó anteriormente, la inhibición solo de PI3K puede inducir la activación de la vía Raf/MEK/ERK, que a su vez también puede modular la activación de mTOR. Esto también ayuda a explicar el ligero incremento en los niveles de p-S6 cuando las células se trataron con AZD6244, además de la relación antes mencionada entre la actividad de MEK/ERK y la fosforilación de Akt mediada por PTEN. Estos resultados evidencian que la inhibición de PI3K interrumpe la activación de proteínas relacionadas con el crecimiento celular y resaltan su importancia para contrarrestar la fosforilación de S6 observada al inhibir a MEK en las células MIA PaCa-2.

Por último, la activación de STAT3 inducida por el tratamiento con AZD6244 concuerda con las observaciones reportadas por Nagathialli *et al.* [34], que indican la existencia de una relación inversa entre los niveles de p-ERK y p-STAT3 cuando se inhibe la actividad de MEK en las células MIA PaCa-2; cuando niveles de p-ERK disminuyen, los niveles de p-STAT3 se incrementan. Adicionalmente, nosotros observamos que el tratamiento individual con GDC-0941 también induce la activación de STAT3 y que cuando se combina la inhibición de PI3K con la de MEK se produce una activación aún mayor de este factor de transcripción. Será útil investigar si la activación de STAT3 está relacionada con la dependencia de las células MIA PaCa-2 a las vías de señalización PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK y cuál es el mecanismo que regula su activación.

6.3. Regulación de las vías de señalización de MEK y PI3K en las células PANC-1

Las células PANC-1 sometidas a tratamiento con AZD6244 presentaron incremento en los niveles de p-Akt, probablemente debido al mecanismo del que ya se habló en el caso de las células MIA PaCa-2. Como se esperaba, la inhibición de PI3K redujo la activación de Akt. La inhibición de MEK resultó en una disminución de los niveles de p-ERK, corroborando así la actividad de AZD6244. A diferencia de lo que se observó en las células MIA PaCa-2, el tratamiento con GDC-0941 no incrementó la fosforilación de ERK durante la mayor parte del tratamiento, lo cual podría explicar al menos parcialmente la menor resistencia de las células PANC-1 a la inhibición de PI3K con respecto a la de MEK.

El tratamiento con GDC-0941 disminuyó la fosforilación de 4E-BP1, probablemente como respuesta al bloqueo de la actividad de mTOR como cinasa de 4E-BP1, causado por la inhibición cascada arriba de PI3K y Akt. La inhibición de MEK incrementó la fosforilación de 4E-BP1 en la primera hora de tratamiento, pero durante el resto del mismo, los niveles de p-4E-BP1 decrecieron de manera similar a lo ocurrido en las células MIA PaCa-2. La razón mecánica de esta disminución sería similar entre ambas líneas celulares. Además, los niveles de p-4E-BP1 en la inhibición conjunta de MEK y PI3K son también menores a los observados en los tratamientos individuales.

La inhibición de PI3K en las células PANC-1 redujo sustancialmente la fosforilación de S6. En contraste con observado en las células MIA PaCa-2, los niveles de p-S6 no presentaron alteración por el tratamiento con el inhibidor de MEK, mientras que el tratamiento de combinación mantuvo los niveles bajos de p-S6. En conjunto, estos resultados manifiestan que la combinación de ambos inhibidores permite bloquear efectivamente efectores cascada abajo en las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK.

No obstante lo anterior, la inhibición conjunta de MEK y PI3K en las células PANC-1 provocó un aumento en la fosforilación de STAT3, que no se encontró en los tratamientos por separado. Estos resultados sugieren que la activación de STAT3 en estas células es independiente de la inhibición individual de MEK y PI3K, pero al igual que en las células MIA PaCa-2, la inhibición dual produce un aumento en su activación. Este resultado sugiere que una eventual adquisición de resistencia a la inhibición dual podría estar mediada por la activación de STAT3 y sería conveniente investigar el mecanismo asociado en futuras investigaciones.

Con el objetivo de explorar el efecto de la inhibición de STAT3 sobre la viabilidad de las células PANC-1, estas fueron sometidas a tratamiento con el compuesto Stattic (Figuras 24-26). Este fármaco es capaz de inhibir la función del dominio SH2 de STAT3 independientemente del estado de fosforilación, impidiendo su dimerización e inactivando las funciones de transcripción de esta

proteína [71]. Este mecanismo permite explicar la respuesta celular al tratamiento con este inhibidor, pues a pesar de que los niveles de p-STAT3 se mantienen relativamente constantes durante la mayor parte del tratamiento (Figuras 59 y 60), se encontró una disminución en la viabilidad de las células PANC-1, dependiente de la concentración de Stattic. Esto indica una inhibición de la actividad de STAT3 como factor de transcripción, posiblemente reduciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas y pro-proliferativas [32, 72].

6.4. Respuesta de la viabilidad de células PANC-1 a la inhibición de STAT3 en combinación con los inhibidores de AZD6244 y GDC-0941

Dada la resistencia de las células PANC-1 a la inhibición de la cinasa MEK y a los resultados de viabilidad obtenidos con el tratamiento con Stattic, se probó un tratamiento conjunto con el inhibidor de STAT3 y el de MEK. Los resultados (Figuras 27 y 28) mostraron que la viabilidad celular se mantuvo próxima a la encontrada con el tratamiento individual con Stattic en la mayoría de los puntos. Como se esperaba, el análisis estadístico de los datos experimentales mostró que los resultados de la combinación son significativamente diferentes de los correspondientes al tratamiento único con AZD6244, pero no hubo diferencia significativa con respecto al tratamiento individual con Stattic. Esto implica que la inhibición de STAT3 no tiene una repercusión importante sobre la resistencia a la inhibición de MEK en las células PANC-1.

Las células PANC-1 también presentan cierta resistencia a la inhibición de PI3K, por lo que, siguiendo el razonamiento anterior, fueron sometidas a un tratamiento combinado utilizando los fármacos GDC-0941 y Stattic. Se encontró que el tratamiento conjunto Stattic + GDC-0941 produjo una mayor disminución de la viabilidad en comparación con los tratamientos individuales (Figuras 29 y 30). El análisis estadístico demostró que esta disminución es significativa en todos los puntos de concentración correspondientes. En consecuencia, se puede deducir que la inhibición de PI3K y de STAT3 cooperan para superar la resistencia a la inhibición de la vía PI3K/Akt que se observa en las células PANC-1 al ser tratadas solo con GDC-0941.

6.5. El proteoma resistente

6.5.1. G6PD

Los resultados del estudio proteómico por espectrometría de masas (punto 5.2 y Tabla 34 del Apéndice) revelaron que la abundancia de la enzima G6PD (*glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase*) se encuentra aumentada en las células PANC-1 con respecto a las células MIA PaCa-2, y este resultado se validó mediante Western blot (Figuras 55 y 56). Esta enzima actúa en las células como determinante de la velocidad y catalizador del primer paso de la vía de las pentosas fosfato (VPF) [73]. Actualmente, diversos estudios han relacionado la sobreexpresión y

actividad de esta enzima con varios tipos de cáncer como leucemia [74], cáncer gástrico [75], cáncer de vejiga [76] y cáncer colorrectal [77] entre otros. La vía VPF es una ruta alterna del metabolismo de la glucosa, y algunos de sus productos, como los nucleótidos, son de suma importancia para la producción de ADN y ARN, que las células cancerosas requieren para suplir la demanda de ácidos nucleicos para la proliferación celular [73, 76, 78]. Otra de las funciones de esta vía es la producción y utilización de los metabolitos fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, que pueden entrar a la vía de glucólisis y mantener el flujo metabólico que las células requieren [73, 79].

La vía VPF representa la mayor fuente de NADPH en las células, que es un importante reductor que previene los daños celulares causados por especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) [80, 81] y también cumple la función de regenerar al antioxidante glutatión (GSH), para evitar el estrés oxidativo [82]. En esta vía, NADP⁺ funciona como cofactor de la enzima G6PD para oxidar la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, produciendo NADPH [73, 83]. Estas moléculas oxidorreductoras (NADP⁺ y NADPH) regulan la actividad de G6PD dependiendo de sus concentraciones; es decir, cuando NADPH se consume (e.g. por ROS), las altas concentraciones de NADP⁺ resultantes incrementan la actividad de la enzima G6PD [84].

Existe evidencia de que el incremento en la actividad de la enzima G6PD tiene efectos oncogénicos, como describen Kuo *et al.* [85]. En su estudio, los autores observaron que al transfectar células fibroblasto de ratón con G6PD humana, se produjo un incremento en su proliferación y generación de rasgos tumorigénicos. Estos hallazgos sugieren que G6PD podría estar relacionada con el desarrollo de tumores. En cáncer, G6PD y la vía VPF han sido descritos como elementos asociados a la transformación celular, procesos de angiogénesis, metástasis, y a la resistencia a terapias [73, 80]. Por ejemplo, estudios en células de cáncer de colon resistentes a terapias antineoplásicas han demostrado que los niveles de G6PD se encuentran por encima de los niveles encontrados en células sensibles [86]. Ju, *et al.* [87] encontraron que la expresión de G6PD en cáncer colorrectal causa resistencia al tratamiento con oxaliplatino debido a la activación de la vía de pentosas fosfato y su actividad antioxidante. En este estudio también analizaron la implicación clínica de los niveles de G6PD en 318 muestras de cáncer colorrectal y determinaron que los pacientes con niveles bajos de esta enzima presentan una evolución favorable y una mejor respuesta a la quimioterapia, a diferencia de los pacientes que presentaron niveles altos de G6PD. Estos resultados se suman a los encontrados por Chen, *et al.* [76] quienes analizaron muestras de 402 pacientes con cáncer de vejiga musculo-invasivo y determinaron que la esperanza de vida es mayor en pacientes con niveles bajos de G6PD. Por estas razones, G6PD ha sido descrita como un biomarcador de cáncer y un blanco terapéutico [73, 80].

La inhibición de la vía VPF ha sido planteada como una estrategia para superar la resistencia de las células cancerosas a algunos fármacos antineoplásicos, demostrándose que la inhibición de G6PD aumenta la sensibilidad a los tratamientos. Por ejemplo, la inhibición de G6PD con 6-aminonicotinamida (6AN) demostró una disminución en la resistencia de células de cáncer de colon al tratamiento con doxorrubicina [86] y de cisplatino tanto en células de cáncer de ovario [88] como de pulmón [89]. Estos fármacos, además de intercalarse en el ADN, producen ROS. Entonces, para comprobar si la actividad de G6PD disminuye los efectos del estrés oxidativo causado por tratamientos que generan ROS en las células, Hong, *et al.* [89] inhibieron a G6PD con 6AN y siRNA (ARN de interferencia) en células de cáncer de pulmón y demostraron que la interrupción de la actividad de la enzima G6PD disminuye los niveles de NADPH y GSH y produce un incremento en los niveles de ROS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ju, *et al.* [87] quienes al medir los niveles de NADPH y GSH en células de cáncer colorrectal con G6PD inhibido por shRNA, encontraron que los niveles de los antioxidantes formados a través de la vía VPF disminuyen, sensibilizando las células al estrés oxidativo [87].

Las células PANC-1 también presentaron sobreexpresión de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*, ver Figura 31), que constituye un mecanismo para la obtención de energía y que produce especies reactivas de oxígeno [90]. Además de poder mitigar estas especies, la enzima G6PD y la vía VPF podrían producir nucleótidos y metabolitos que pueden reincorporarse a la glucólisis dependiendo de los requerimientos celulares, por ejemplo, si se requiere biosíntesis reductiva (que utiliza NADPH) de ácidos grasos, las células pueden utilizar la ribosa-5-fosfato de la vía VPF para producir fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, y por gluconeogénesis obtener el sustrato de G6PD que posteriormente se oxida obteniendo el NADPH que se necesita [81], o bien utilizar los metabolitos para producir ribosa-5-fosfato para la síntesis *de novo* de ribonucleótidos [81].

La función de la enzima G6PD en la regulación de la vía de pentosas fosfato, su relación con la supervivencia, proliferación y respuesta a fármacos en diversos tipos de cáncer, así como su sobreexpresión en las células PANC-1, sugieren que G6PD podría estar involucrada en el mantenimiento de la viabilidad celular tras la inhibición de las vías de MEK o PI3K. La importancia de la vía VPF en las células de cáncer y los resultados obtenidos en diversos estudios sobre la inhibición de la enzima G6PD con el fármaco 6AN nos condujeron a estudiar el efecto de 6AN sobre la viabilidad de las células PANC-1.

6AN es un inhibidor competitivo de G6PD que es consumido por las células y transformado a 6-amino-NADP⁺. Este análogo de NADP⁺ inhibe a las enzimas G6PD y 6PGD de la vía VPF [91], aunque ha presentado una mayor especificidad hacia la inhibición de G6PD [86]. Cuando las células PANC-1 fueron tratadas con el fármaco 6AN se observó una disminución progresiva de

su viabilidad (Figuras 34-36). Esta disminución podría deberse a la acción de 6AN como análogo de NADP⁺ en las células, impidiendo la formación de NADPH y por ende de la vía VPF desde su primer paso. Esto implicaría un posible aumento de ROS y disminución de ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis *de novo* de los ribonucleótidos que conforman a los ácidos nucleicos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Ju, *et al.* [87], Polimeni, *et al.* [86], Cantazaro *et al.* [88] y Hong, *et al.* [89]. Además, debido a que las células PANC-1 son un modelo de ADP con mutación en KRas, nuestros resultados concuerdan con lo observado por Ying, *et al.* [92] quienes demostraron una relación entre KRas y la producción de nucleótidos por la vía VPF en modelos murinos de ADP.

Entre los métodos utilizados para determinar la viabilidad de las células tratadas con 6AN se encontró una diferencia importante, pues al utilizar el método CCK-8 la viabilidad de las células se encontró en valores muy bajos (hasta 4%) con concentraciones de inhibidor alrededor de 5000 µM, mientras que al utilizar tinción con violeta cristal la viabilidad se mantuvo por arriba de 22% con las mismas concentraciones de 6AN y concordaba con lo visto al microscopio. Esta diferencia en los datos obtenidos podría tener su origen en la acción misma del fármaco, pues el fundamento del método con CCK-8 es la reducción de una sal de tetrazolio a un formazán colorido y, como ya se comentó anteriormente, la inhibición de G6PD conlleva a la disminución del poder reductor de las células. Por el contrario, la tinción celular con violeta cristal no tiene una relación con la acción de las deshidrogenasas celulares. La observación al microscopio de las réplicas corroboró cualitativamente los datos obtenidos por el método de violeta cristal y aunque estos datos se contraponen a los obtenidos por el método de CCK-8, confirman indirectamente la inhibición de la vía VPF.

Otras proteínas que se encontraron en mayor abundancia en las células PANC-1 en comparación con las células MIA PaCa-2 fueron lactato deshidrogenasa subunidad B (LDHB, *lactate dehydrogenase B*), proteínas del complejo I (NADH quinona reductasa) y complejo IV (citocromo C oxidasa) de la cadena de transporte de electrones (ETC, *electron transport chain*), el transportador de lactato (MCT4, *monocarboxylate transporter 4*) e isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2, *isocitrate dehydrogenase, mitochondrial*). Ver Figura 55 y Tabla 34 del Apéndice.

6.5.2. LDHB

LDHB es una enzima implicada en la conversión entre lactato y piruvato [93]. Esta proteína ha mostrado una conexión variable con el cáncer, pues su sobreexpresión se ha relacionado a la proliferación de células de cáncer de pulmón y a un desarrollo de adenocarcinomas pulmonares [94], y a su vez se le relaciona a la disminución de la migración en células de cáncer de páncreas [95]. Su sobreexpresión también se ha relacionado con la resistencia a tratamientos

anticancerígenos. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de LDHB se incrementa en células de cáncer colorrectal resistentes a cetuximab, un inhibidor de EGFR [96]. Los resultados de este estudio demostraron que los niveles elevados de esta enzima favorecen la supervivencia de las células cancerosas. Coincidentemente, las células PANC-1 también poseen mayores niveles de EGFR que las células MIA PaCA-2 (Figuras 55 y 56). Adicional a esto, se ha observado que LDHB promueve el crecimiento de células de cáncer de pulmón con KRas mutante [94].

En el cáncer de páncreas, sin embargo, se ha encontrado que la sobreexpresión de LDHB dirige el metabolismo hacia OXPHOS y que cuando se suprime su expresión las células muestran un aumento en la glucólisis [95]. En un análisis de 154 muestras de tumores pancreáticos, 34 muestras de tejido adyacente a tumores y 22 muestras de tejido pancreático normal se encontró mayor expresión de LDHB en los tejidos normal y adyacentes que en las muestras de tumores. En contraparte, la enzima LDHA se encontró sobreexpresada en los tejidos tumorales [95] y se sabe que favorece la producción de lactato a partir de piruvato [97]. Se ha encontrado que la sobreexpresión de LDHB disminuye los niveles de lactato y aumenta los niveles de ATP.

Otro aspecto importante de LDHB es la regulación que ejerce sobre la autofagia tanto en células glucolíticas como oxidativas, a diferencia de LDHA que sólo está relacionada a la autofagia en células glucolíticas [98]. El proceso de autofagia se resume como el mecanismo de adaptación a condiciones de estrés, que involucra la autodigestión de los componentes celulares como organelos y proteínas [99]. Este proceso ha sido relacionado con la supervivencia y la resistencia del cáncer a tratamientos farmacológicos [100, 101] o radioterapéuticos [102]. Mirzoeva, *et al.* encontraron que al tratar tumores de cáncer de páncreas con un inhibidor de PI3K y mTOR se inducía autofagia [100]. Estos datos concuerdan con los reportados por Bryant *et al.* [101], donde se observa que la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK conduce a las células de cáncer de páncreas a depender de la autofagia, y proponen este mecanismo como un blanco terapéutico para el tratamiento de ADP.

Como se ha mencionado, la sobreexpresión de LDHB en células de cáncer de páncreas favorece a OXPHOS [95], mismo que en las células PANC-1 también se encuentra representado por la mayor expresión de proteínas del complejo I y IV de la cadena de transporte de electrones (Figura 31 y Tablas 34 y 35 del Apéndice). La vía OXPHOS no excluye a la glucólisis en el cáncer, pues se ha demostrado que ambas pueden coexistir [103]. Por ejemplo, Viale, *et al.* [104], vieron que al suprimir la actividad de KRas, genéticamente y por inhibición farmacológica de MEK, PI3K y mTOR, se obtuvo un subtipo celular de cáncer de páncreas resistente que presenta un incremento en OXPHOS. En el estudio encontraron que las células resistentes presentan una actividad mitocondrial mayor, niveles altos de ROS y una dependencia a OXPHOS en comparación a las células no resistentes (glucolíticas). Además, las células que mantienen un

metabolismo preferentemente oxidativo resultaron no ser capaces de suplir sus requerimientos energéticos cuando OXPHOS es inhibida farmacológicamente. Otro aspecto que se observó en estas células de cáncer de páncreas resistentes fue la presencia de lisosomas y autofagosomas, lo que indica la activación de la autofagia.

En suma, la sobreexpresión de LDHB en las células PANC-1 concuerda con un metabolismo de tipo oxidativo que podría estar asociado a su resistencia a la inhibición de MEK y PI3K.

6.5.3. Complejo I de la cadena de transporte de electrones

Para que la fosforilación oxidativa se lleve a cabo, otras proteínas deben ser expresadas, y en nuestros resultados de proteómica de las células PANC-1 observamos sobreexpresión de proteínas de los complejos I y IV de la cadena ETC, encargada de la ejecución de OXPHOS (e.g. NDUFA7, NDUFB4, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC2). La fosforilación oxidativa es el último paso en una serie de reacciones celulares para obtener energía en forma de ATP, donde las fuentes de carbono son oxidadas y se utilizan las especies NADH y FADH₂, de las cuales se trasladan electrones hasta un aceptor final que puede ser el O₂ y culmina con la formación de moléculas de ATP [105, 106]. El transporte de estos electrones sucede en la membrana interna de la mitocondria y en él intervienen 5 complejos proteicos donde los complejos I, III y IV actúan como bombas oxidorreductoras [106, 107]. El complejo I inicia la transferencia electrónica al oxidar al NADH y formar NAD⁺, manteniendo así el balance NADH / NAD⁺, mientras que el complejo IV es el paso del transporte donde se reduce al receptor final de electrones (O₂) a agua [105, 107]. En condiciones de proliferación, la OXPHOS funciona como una vía anabólica por la cual se producen intermediarios para la formación de biomasa y biosíntesis de moléculas como el aspartato, que además de servir como aminoácido en la formación de proteínas, también permite la formación de adenina monofosfato (AMP, *adenide-5'-monophosphate*) necesaria para la síntesis de purinas [108]. Otra función del complejo I es promover la adaptabilidad de las células a condiciones hipóxicas al estabilizar el factor inducido por hipoxia 1 alfa (HIF1α, *hypoxia-inducible factor alpha*) [107]. Debido a esto, el complejo I es un blanco terapéutico y se ha demostrado poder inhibirlo con fármacos de tipo biguanida, en especial la metformina.

La metformina es un fármaco que actúa a nivel mitocondrial acumulándose e interfiriendo con la función del complejo I [109]. El mecanismo aún no es del todo claro, pero se ha propuesto que altera el consumo de oxígeno y desacopla el transporte de electrones, que a su vez altera la actividad oxidorreductora del complejo I causando la interrupción de la ETC [110]. Estudios sobre el efecto de este fármaco han determinado que en presencia de glucosa, la metformina solo inhibe la proliferación celular, mientras que al privar a las células de este carbohidrato, las células mueren [109]. Nosotros corroboramos la importancia de la fosforilación oxidativa, y más

específicamente del complejo I de la ETC, en las células de cáncer de páncreas PANC-1, que al ser tratadas con metformina disminuyeron su viabilidad de forma dependiente de la concentración.

6.5.4. MCT4, transportador de lactato

Como se mencionó anteriormente, otra proteína hallada con sobreexpresión en las células PANC-1 es MCT4, que funciona como transportador que permite la salida de lactato de las células al medio [111, 112]. La sobreexpresión de este transportador está reportada en varios tipos de cáncer incluyendo de pulmón [94, 113], mama, colorrectal, ovario [113] y pancreático [95]. La sobreexpresión de MCT4 en tumores de cáncer de páncreas ha sido relacionado a un pronóstico pobre para los pacientes [111]. En un estudio con 223 muestras de ADP, Baek, *et al.* [111] encontraron elevación de MCT4 en diferentes zonas tumorales: 121 de los casos presentaron MCT4 elevado en los epitelios, 69 lo presentaron en el estroma, 56 tenían expresión del transportador elevada en ambos tejidos y solo 13 tumores presentaron niveles bajos. Al analizar la relación de la sobreexpresión de esta proteína en los tumores, se llegó a la conclusión de que su elevación tiene un fuerte impacto en el desarrollo y pronóstico del ADP. En este mismo estudio, utilizaron siRNAs para evaluar la actividad de este transportador en células de cáncer de páncreas, encontrando que la inhibición de MCT4 causa un decremento en la secreción de lactato al medio y su acumulación dentro de la célula, regulando negativamente la glucólisis y generando estrés metabólico.

En el estudio también evaluaron el consumo de glucosa, el cual no se vio afectado por la inhibición de MCT4, sugiriendo que otras rutas metabólicas fueron activadas para intentar suplir la demanda energética. Además de estos hallazgos, se encontró que la OXPHOS se incrementó, que las mitocondrias crecieron, los niveles de ROS subieron y la glutamina se estaba utilizando en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, *tricarboxilic acid*) como se ha visto en estudios con diferentes tipos de cáncer [114]. Todos estos mecanismos sugieren que las células de ADP son capaces de reprogramar su metabolismo para sobrevivir, pero se encontró que la inhibición de MCT4 interrumpe el ciclo celular, afecta su viabilidad y se inician procesos de muerte como la apoptosis o de supervivencia como la autofagia. Por último, Baek, *et al.* [111] evaluaron el desarrollo de tumores en modelos murinos al injertar células de cáncer de páncreas que expresan altos niveles de MCT4 en dos condiciones: células con MCT4 suprimido mediante ARN interferente y células silvestres. Los resultados concordaron con lo visto en experimentos *in vitro* y sugieren a la inhibición del metabolismo como un posible blanco terapéutico.

6.5.5. IDH2

Otra enzima metabólica sobreexpresada en las células PANC-1 es IDH2. Esta enzima cataliza la reacción reversible de descarboxilación oxidativa del isocitrato para formar α -cetoglutarato y una molécula de NADPH, aportando antioxidantes para la regulación de ROS [115]. IDH2 es una de las 3 isoformas de la enzima IDH que se han encontrado en el ser humano [116]. La sobreexpresión de esta enzima se ha reportado en cánceres como próstata, mama, ojo, pulmón y ovario [117]. En cáncer de pulmón, la sobreexpresión de IDH2 se ha relacionado a la reducción de ROS junto con la regulación del metabolismo por acción de HIF1 α . Adicionalmente, su inhibición afectó la proliferación celular y aumentó la apoptosis [116]. Además de la protección celular contra la apoptosis, se ha visto que IDH2 es capaz de proteger a las mitocondrias contra el estrés oxidativo que constantemente ocurre en estos organelos [116]. Aunque la función específica de IDH2 en cáncer de páncreas aún no ha sido explorada, un estudio reciente demostró que la inhibición de la isoenzima IDH1 disminuye la capacidad reductora de las células al disminuir los niveles de NADPH, así como la protección contra las ROS, sensibilizando las células de cáncer al tratamiento con gemcitabina [118].

Debido a la sobreexpresión de las proteínas G6PD, LDHB, complejo I y IV de ETC, MCT4 e IDH2, aunado a sus funciones como reguladores metabólicos y como factores de supervivencia celular, es probable que la resistencia de las células PANC-1 esté relacionada a la actividad de estas proteínas, confiriéndoles capacidad para crecer y proliferar en condiciones diversas.

6.5.6. Respuesta del proteoma resistente al tratamiento con 2DG

Anteriormente se han mencionado las alteraciones metabólicas que ocurren en las células de cáncer y las rutas por las cuales obtienen energía y metabolitos importantes para su crecimiento y proliferación. Ciertamente, el metabolismo se ha considerado como un blanco terapéutico en cáncer, y debido a que el consumo de glucosa es necesario en la mayoría de las condiciones, se ha propuesto al fármaco 2-desoxi-D-glucosa (2DG) como un inhibidor del metabolismo y la proliferación celular [102]. Este compuesto es un análogo de la glucosa que tiene reemplazo del grupo hidroxilo del carbono 2 por un hidrógeno, por lo que funciona como inhibidor competitivo de la glucosa [102]. Cuando 2DG entra a la célula es fosforilado por la enzima hexocinasa formando 2-desoxi-glucosa-6-fosfato (2DG-6-P, *2-deoxy-glucose-6-phosphate*), producto que no puede ser metabolizado por las enzimas glucolíticas y se acumula en las células [102, 119].

La inhibición de la glucólisis por acción de 2DG refleja la privación de glucosa, y esta condición genera estrés oxidativo en las células [120]. Ya se ha mencionado en este trabajo la importancia de la vía VPF para contrarrestar el estrés oxidativo; sin embargo, cuando las células son tratadas con 2DG y se forma 2DG-6-P, este es utilizado como sustrato por G6PD pero la molécula

resultante (2-desoxi-glucosa-6-fosfogluconolato) no puede ser metabolizado por la siguiente enzima de la vía (6-PGD). Por tanto, la producción de NADPH se ve acotada y con ello disminuye el poder reductor de la célula, dejándola parcialmente expuesta a la acción de ROS [102]. Otro efecto de la inhibición del metabolismo mediante 2DG es el proceso de autofagia que se activa, por ejemplo, en ausencia de glucosa [121] y como se mencionó anteriormente, está implicado en la resistencia a tratamientos.

Bajo estas consideraciones, el decremento en la viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 2DG tiene su origen en la inhibición del metabolismo, incluyendo la vía VPF, probablemente causando una disfunción energética y estrés oxidativo.

Debido a que la viabilidad de las células PANC-1 disminuye cuando son tratadas con el compuesto 2DG, se estudió el efecto de este inhibidor en la expresión de las proteínas G6PD, LDHB e IDH2, de las que ya se habló con anterioridad. Los resultados de este estudio se observan en las Figuras 59b y 60b, donde se muestra la variación en la expresión de estas proteínas cuando las células PANC-1 son tratadas durante 1 - 72 h con 2DG. Se observó un ligero aumento en la expresión de la enzima G6PD a lo largo del tratamiento, lo cual podría explicarse como una respuesta al estrés oxidativo causado por la inhibición de la glucólisis, pues G6PD es el primer paso en la vía VPF que es de suma importancia para mitigar los efectos de este fenómeno oxidativo. En cuanto a las enzimas LDHB e IDH2, no se encontró un cambio importante en su expresión, lo que sugiere que su actividad se mantiene a pesar de la relativa privación de glucosa. Sería adecuado estudiar si estos niveles se deben a su aporte en la formación de antioxidantes para proteger a la célula del estrés causado por 2DG así como su contribución a la regulación del metabolismo bajo privación de glucosa, posiblemente en la fosforilación oxidativa.

Como parte del estudio de la resistencia que las células PANC-1 presentan a la inhibición de MEK y PI3K, y considerando los resultados de los tratamientos con Stattic de manera individual (y su combinación con GDC-9041 o AZD6244) así como el tratamiento con 2DG, se estudió el efecto de la inhibición de STAT3 combinado con el análogo de glucosa 2DG sobre la viabilidad celular. Para determinar si la disminución en la viabilidad de las células PANC-1 tratadas con la combinación de estos fármacos es diferente al porcentaje de viabilidad obtenido de manera individual con cada inhibidor, se realizó una prueba t no pareada. Estadísticamente, los resultados del tratamiento combinado en comparación a los resultados del tratamiento individual con Stattic son significativamente diferentes en las concentraciones: 0.5xCI50 y CI50 (Tablas 66 y 68 de Apéndice). Por otro lado, los datos del tratamiento con 2DG son diferentes a los del tratamiento combinado en al menos 3 concentraciones, las más elevadas (Tablas 67 y 69 del Apéndice). Esta evaluación nos indica que 2DG en concentraciones bajas coopera con Stattic para inhibir la

proliferación celular. Sin embargo, en concentraciones elevadas la reducción de viabilidad está determinada por Stattic y no por el análogo de la glucosa.

En búsqueda de una explicación al comportamiento anterior, se evaluó mediante Western blot la fosforilación de STAT3 cuando las células PANC-1 son tratadas con 2DG (Figuras 59b y 60a). Se observó que durante todo el tratamiento hubo inhibición de la fosforilación de STAT3. Se puede plantear que concentraciones bajas de 2DG cooperan con Stattic para inhibir la fosforilación de STAT3, mientras que el incremento de la concentración de Stattic a dos o cuatro veces el valor de CI50 se aproxima a la máxima inhibición de STAT3, la cual resulta más efectiva para reducir la viabilidad de las células PANC-1 en comparación al efecto de 2DG.

6.5.7. Akt2

Los resultados de la comparación proteómica entre las líneas celulares PANC-1 y MIA PaCa-2 demostraron que la proteína Akt2 se encuentra sobreexpresada en la primera línea celular. Además, PANC-1 posee mayor nivel de p-Akt (Figuras 57 y 58). Akt2 es una proteína serina/treonina cinasa perteneciente a la familia Akt que consta de 3 isoformas (Akt1, Akt2 y Akt3) [122]. El conjunto de isoformas de Akt se ha relacionado a la proliferación y señalización de células de cáncer [122, 123] y en específico, la isoforma Akt2 se ha relacionado a la capacidad de carcinomas pancreáticos para crecer aun cuando las señales externas no son suficientes para promover la proliferación [123]. Las isoformas de Akt regulan diferentes procesos, por ejemplo, la isoforma Akt1 ha demostrado tener mayor relación con el crecimiento, pues al inhibir esta isoforma en ratones estos presentan deficiencia en su crecimiento desde el estadio fetal [124], mientras que la deficiencia de la isoforma Akt2 en modelos murinos causa resistencia a la insulina, deterioros en el consumo de glucosa y fallas en la actividad de células beta del páncreas [125]. Por otro lado, cuando se inhibe la isoforma Akt3 en ratones se observa disminución en el crecimiento cerebral, pero sin malformaciones [126]. Además, la isoforma Akt1 se ha relacionado al aumento en la tumorigénesis en el cáncer de mama en modelos murinos y a su vez disminuye la metástasis e invasividad [127]. Mientras tanto, la sobreexpresión y activación de la isoforma Akt3 está relacionada con la progresión y agresividad de melanomas [128].

La isoforma Akt2 se ha visto aumentada en al menos 10% de los tumores pancreáticos y en líneas celulares como la línea PANC-1 [122, 123, 129]. Para demostrar la importancia de esta proteína en el cáncer de páncreas, Cheng, *et al.* [130] inhibieron su expresión por medio de ARN de interferencia y observaron la incapacidad de las células PANC-1 para producir tumores en ratones. Además, existe evidencia de que la sobreexpresión de esta proteína está vinculada a la resistencia al tratamiento con erlotinib [131], que es un inhibidor del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) asociado a la tumorigénesis del cáncer de páncreas [132] y que también se

encontró aumentado en los resultados de proteómica de nuestro estudio (Figura 55 y Tabla 34 del Apéndice). Para determinar la relación de Akt con EGFR, Dhani, *et al.* examinaron muestras de 22 pacientes con cáncer de páncreas y 7 líneas celulares de tres cánceres diferentes (pulmón, colorrectal y pancreático), entre las cuales se utilizó la línea PANC-1 por presentar altos niveles basales de Akt2. Los resultados de este estudio demostraron que al inhibir la vía PI3K/Akt, las células que sobreexpresaban Akt se vuelven sensibles al tratamiento con el inhibidor de EGFR.

Otra función reportada de Akt es la degradación del supresor tumoral p53 [133]. Para determinar de qué manera afecta Akt a p53, Ogawara, *et al.* [133] midieron la cantidad de mRNA de p53 y su proteína expresada en células transfectadas con Akt y observaron que la expresión de la proteína p53 disminuyó, pero la cantidad de mRNA se mantuvo sin cambios. En este mismo estudio determinaron que la disminución de p53 se debe a la ubiquitinación de esta proteína por medio de una ubiquitina ligasa denominada MDM2 (*murine double minute 2*), la cual es activada por Akt. Esta no es la única molécula apoptótica que Akt puede inhibir, pues también existe, por ejemplo, una interacción inhibitoria de Akt con Bax [134], una molécula de la familia Bcl-2 (Beclin-2), que favorece el proceso de apoptosis al permitir la salida de citocromo C de la mitocondria y desencadenar la actividad de las caspasas [134-136]. Akt inhibe el cambio conformacional que permite a Bax dirigirse desde el citosol a las mitocondrias para interactuar con otras moléculas de la familia Bcl-2 y desestabilizar la membrana mitocondrial. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Tsuruta, *et al.* [137]. Ambos trabajos establecen que este mecanismo es el más probable, ya que en presencia de Akt, Bax no es capaz de dimerizarse ni dirigirse a la mitocondria, mientras que al inhibir la vía PI3K/Akt, las células mueren y Bax se dimeriza.

A diferencia de las otras dos isoformas, Akt2 también es capaz de aumentar la invasividad celular [138]. Además, se ha visto que la expresión de Akt2 aumenta la migración y metástasis de células de cáncer mama injertadas en modelos murinos [138]. Los ratones utilizados en este estudio desarrollaron infiltraciones tumorales en páncreas, estómago y duodeno. En el mismo estudio se determinó que el aumento en la metástasis es debida a la capacidad de Akt2 para inducir la expresión de la integrina $\beta 1$, la cual es parte de los receptores de unión a colágeno IV que se encuentra en la matriz extracelular [138, 139]. Las células PANC-1 también presentan niveles superiores de integrina $\beta 1$ (Tabla 34 del Apéndice).

Las funciones reportadas de la cinasa Akt2 sugieren que su actividad es de suma importancia tanto en la proliferación y supervivencia celular, como en la resistencia a fármacos y la evasión de la muerte celular. Adicionalmente, la inhibición de la expresión de Akt2 incapacita a las células de cáncer de páncreas para formar tumores, por lo que sería conveniente estudiar a profundidad la inhibición específica de cada isoforma de Akt para determinar su función en la tumorigénesis del cáncer de páncreas.

6.5.8. Proteínas relacionadas con β -oxidación de ácidos grasos y metabolismo de lípidos

En las células PANC-1 encontramos que algunas proteínas implicadas en el proceso de β -oxidación de ácidos grasos se encuentran sobreexpresadas en comparación con las células MIA PaCa-2. Entre ellas se encuentran CPT1A (*carnitine O-palmitoyltransferase 1A*), ACSL4 (*long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4*), ECI1 (*enoyl-CoA delta isomerase 1*) y ECH1 (*Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial*). La oxidación de los ácidos grasos es un proceso cíclico que ocurre en la mitocondria y los peroxisomas, donde los ácidos grasos son cortados cada dos carbonos desde el extremo carboxi terminal, para formar una molécula de acetil-CoA por cada ciclo para que entre en el ciclo de Krebs con la finalidad de obtener energía [140, 141]. Aunque ambos organelos (mitocondria y peroxisoma) son capaces de llevar a cabo la β -oxidación, la función de los peroxisomas está más dirigida a la reducción de las cadenas más largas de ácidos grasos; además, en este organelo no se enlaza la degradación de ácidos grasos a la OXPHOS por lo que el peroxisoma no produce energía como las mitocondrias [142].

Para que los ácidos grasos se puedan degradar, las células necesitan de la enzima ACSL4, la cual une la molécula de CoA-SH a los ácidos grasos [140, 143]. Esta enzima está relacionada a la fosforilación de Akt en células de cáncer de próstata como lo reporta Wu *et al.* [144] donde la sobreexpresión de ASCL4 aumenta la cantidad de prostaglandinas que podrían interactuar con los receptores tirosina cinasa que activan a PI3K. En el paso de los ácidos grasos a las mitocondrias y los peroxisomas, las proteínas membranales juegan un papel importante ya que el acil-CoA no puede atravesar la membrana mitocondrial, por lo que debe pasar por la lanzadera de carnitina transformándose de un acil-CoA a una acilcarnitina por acción de CPT1A [141].

El aumento en la expresión de CPT1A ha sido relacionado al incremento en la oxidación de ácidos grasos y la supervivencia de células en condiciones de hipoxia [145]. La enzima ECI1 está relacionada con la oxidación tanto de ácidos grasos saturados como insaturados pues forma los isómeros intermediarios de estos ácidos para que entren en las reacciones de la β -oxidación [146] tanto en mitocondria como en peroxisomas [147, 148]. En un estudio realizado por Janssen *et al.* [146] encontraron que al inhibir genéticamente la expresión de esta enzima en ratones se observa un incremento de etilmalonato y metilsuccinato en la orina, los cuales son metabolitos indicadores de una β -oxidación incompleta. Otra enzima relacionada con la β -oxidación de ácidos grasos insaturados es DECR2, la cual rompe los dobles enlaces en los ésteres de enoil-CoA. Por otra parte, la enzima ECH1 es la encargada de romper el doble enlace que se encuentra en los ácidos grasos utilizando una molécula de agua para que el acetil CoA pueda ser cortado de la cadena y esta continúe en el ciclo de la β -oxidación [140]. La sobreexpresión de estas proteínas en las

células PANC-1 también podría estar relacionada a la baja respuesta en la viabilidad celular que se observa al tratar las células con los inhibidores de MEK y PI3K, debido a que la función de la β -oxidación es la producción de energía por medio de acetil-CoA, lo cual podría favorecer la supervivencia y resistencia de esta línea celular.

En el metabolismo lipídico se encuentran involucradas una gran cantidad de proteínas, de las cuales las células PANC-1 presentan niveles elevados de las enzimas clave SCD (*acyl-CoA desaturase*) y FADS2 (*acyl-CoA 6-desaturase*). Los ácidos grasos pasan por una serie de reacciones para formar la variedad de lípidos y derivados que son necesarios para la fisiología, señalización, almacenamiento de energía y las membranas celulares [149]. Una de estas reacciones es la desaturación, proceso en el que está implicada la enzima SCD [150]. Esta enzima utiliza como sustrato al ácido palmítico para formar un ácido graso monoinsaturado (MUFA, *monounsaturated fatty acid*), el ácido palmitoleico, del cual se pueden formar ésteres de colesterol, triacilgliceroles e incluso fosfolípidos [149]. La importancia de este paso regulado por SCD en la formación de los componentes celulares a partir de ácidos grasos es tan grande, que la deprivación de estos MUFA causa muerte celular derivada de estrés en el retículo endoplásmico y la consecuente acumulación de proteínas no plegadas como lo determinaron Roongta *et al.* [149]. Además de esto, se produce inhibición del crecimiento de tumores en modelos murinos con injertos de células de cáncer gástrico después de inhibir la actividad de SCD. Adicionalmente, existe evidencia de otro mecanismo por el cual las células de cáncer pueden desaturar el ácido palmítico sin necesidad de SCD, lo cual fue investigado por Vriens *et al.* [151] al utilizar líneas celulares de cáncer de hígado, pulmón y próstata. En sus resultados encontraron que la inhibición de SCD no disminuye en algunos casos la proliferación celular ni la desaturación del ácido palmítico, pero no se forma el ácido palmitoleico sino el ácido sapiénico. También observaron que las células resistentes a la inhibición de SCD sobreexpresaban la enzima capaz de formar este ácido, FADS2. Los resultados de este estudio sugieren que en algunos tipos de cánceres existe una plasticidad entre las rutas para desaturar a los ácidos grasos para mantener su capacidad de proliferación.

La sobreexpresión de proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos y lípidos sugiere que las células PANC-1 son capaces de utilizar estas rutas para la obtención de energía y la proliferación, en comparación con las células MIA PaCa-2. Además de la producción de energía, las proteínas que encontramos sobreexpresadas en PANC-1 también están relacionadas con la localización de lípidos en la célula, como las proteínas APOL2, CAV2, CES1, CLU y CPT1A (Tabla 34 del Apéndice).

6.5.9. Transportadores de la familia ABC

En este trabajo se ha mencionado a las proteínas relacionadas con la adaptación del metabolismo como un posible factor de resistencia a la inhibición de MEK o PI3K en las células PANC-1. Esta resistencia puede además estar relacionada a otros procesos que favorezcan la evasión de los tratamientos y que interfieran directamente en su respuesta a fármacos. Un grupo de moléculas conocidas como los transportadores de la superfamilia cassette de unión a ATP (ABC, *ATP-binding cassette*), que a su vez contiene 7 familias (A-G), han sido relacionados a la resistencia a fármacos debido a su capacidad de expulsar los agentes terapéuticos al exterior de la célula, evitando o reduciendo su efecto biológico [148, 149]. De estos transportadores, las células PANC-1 muestran una sobreexpresión de las proteínas ABCG2 (*ATP-binding cassette sub-family G member 2*), ABCD1 (*ATP-binding cassette sub-family D member 1*), ABCC1 (*multidrug resistance-associated protein 1*, MRP1) y ABCC4 (*multidrug resistance-associated protein 4*, MRP4), en comparación con su expresión en las células MIA PaCa2.

El transportador ABCG2 se ha relacionado a la eliminación de mitoxantrona [152], el transporte de erlotinib [153], e inhibidores multikinasa [154], se ha implicado a la resistencia contra múltiples fármacos en células de cáncer de mama [155] y es también un factor de resistencia en terapias fotodinámicas, radioterapia o tratamientos hormonales y además está relacionado con el fenotipo de células troncales de cáncer [154]. En un estudio de tumores de cáncer de páncreas se ha asociado la expresión de ABCG2 con las etapas clínicas del tumor, pues se encontró que los niveles de este transportador se incrementan en etapas avanzadas [156]. Por otro lado, en un estudio con 130 pacientes con cáncer en células pequeñas de pulmón (SCLC, *small-cell lung cancer*), Kim *et al.* [157] determinaron que ABCG2 está relacionado a la respuesta a la terapia y la supervivencia en pacientes tratados con cisplatino, pues los pacientes que expresan ABCG2 tienen baja respuesta al tratamiento y sobreviven menos. Además, en células de mieloma múltiple, se estudió la relación entre el transportador ABCG2 y la vía PI3K/Akt utilizando un inhibidor de esta vía (LY294002) y se observó que la expresión del transportador disminuye cuando las células son tratadas con el inhibidor, lo que indica una regulación positiva de esta vía en la expresión de ABCG2 [158].

Existe evidencia de que Akt regula la localización de ABCG2, ya que en ausencia de p-Akt el transportador se internaliza y sus niveles en la superficie celular disminuyen [159]. La importancia de este transportador en la resistencia a fármacos que presenta el cáncer de páncreas se puede apreciar en un estudio realizado por Ling *et al.* [160], donde al tratar líneas celulares como PANC-1 tanto *in vitro* como en injertos en ratón con el fármaco FL118 (un inhibidor de proteínas antiapoptóticas como la survivina, Mcl-1, XIAP y cIAP2) que se ha catalogado como un no

sustrato de ABCG2, se han obtenido resultados favorables en la superación de la resistencia a tratamientos con cisplatino y con gemcitabina. Además, se ha descrito que GCD-0941 es un sustrato de ABCG2 en estudios *in vivo* con cerebros de ratón, donde se estableció una relación entre la actividad del inhibidor y la presencia de los transportadores ABCB1 (MDR1, *multidrug resistance protein 1*) y ABCG2 [161].

Otro integrante de familia de estos transportadores es ABCD1, el cual se encuentra en las membranas peroxisomales [162] y está relacionado al transporte de ésteres de CoA de ácidos grasos de cadena larga (>20 carbonos) [142, 163, 164] para su utilización en la β -oxidación. Este transportador está aumentado en tumores pancreáticos que presentan angiainvasión en comparación a los tumores que no presentan esta característica [156].

Por otra parte, el transportador ABCC1 tiene afinidad por fármacos hidrofóbicos, aniones orgánicos y compuestos conjugados con glutatión [165]. Debido a su capacidad para transportar conjugados de glutatión [166] podría tener relación con la resistencia contra el estrés oxidativo que causan algunos tratamientos antineoplásicos [167]. Además, confiere resistencia a camptotecinas, antimetabolitos y antraciclinas, entre otros [165, 168]. Este transportador se mantiene en la membrana plasmática y toma sus sustratos del citoplasma [169], y se encuentra muy distribuido en cánceres de páncreas, leucemia linfoblástica aguda y pulmones [168]. ABCC1 se ha relacionado a la resistencia a terapias en cáncer de mama [170] y ha mostrado dependencia a la vía PI3K/Akt en células de cáncer de próstata multirresistentes a terapias, como lo evidencia Lee *et al.* [171]. Estos últimos utilizaron tres líneas celulares de cáncer de próstata y determinaron que la expresión de ABCC1 en condiciones basales era baja o nula en dos de ellas pero aumentaba al activar a PI3K. La otra línea celular que utilizaron presentó expresión de ABCC1 sin necesidad de activar a PI3K pues no expresaba a PTEN, que es un inhibidor de PI3K.

Por último, la isoforma ABCC4 se ha relacionado al flujo del mensajero secundario AMP cíclico y a la tumorigénesis, ya que modelos murinos con injertos de células PANC-1 transfectadas con ARN de interferencia para este transportador, mostraron una disminución de la proliferación [172]. En resumen, varias proteínas de la familia ABC podrían estar implicadas en la resistencia a los fármacos AZD6244 y GDC-0941 en las células PANC-1.

6.5.10. Caveolina 1

Otra proteína involucrada en el flujo membranal y que se encuentra sobreexpresada en las células PANC-1 es Cav-1 (*caveolin 1*), la cual está implicada en la formación de invaginaciones en la membrana plasmática [173, 174]. La función de estas invaginaciones llamadas caveolas es diversa; se relacionan con el transporte vesicular, la regulación de colesterol y la transducción de señales [173]. Estas caveolas pueden formar túbulos a través de la membrana plasmática o bien

desprenderse de esta como vesículas individuales o en grupos [175]. Caveolina 1 se encontró expresada en 40.5% de tumores de carcinoma pancreático en un estudio donde además se le encontró relacionada con la supervivencia postoperatoria, debido a que el 33.8% de los pacientes con tumores que no expresaban Cav-1 sobrevivió hasta 3 años, mientras que solo 4.8% de los pacientes con tumores positivos a esta proteína lograron sobrevivir ese mismo tiempo, relacionando así a Cav-1 con la agresividad tumoral [176].

En otro estudio con células de cáncer de páncreas, se demostró que la expresión de Cav-1 aumenta en respuesta a la exposición a fármacos, mientras que su disminución causa un aumento en la apoptosis y disminución de Akt activo, por lo que se ha relacionado a la resistencia a tratamientos como gemcitabina y 5-FU (5-fluorouracil) [174]. Una de las teorías sobre la asociación de Cav-1 y la resistencia a fármacos estipula que el transporte de colesterol desde el citosol a la membrana plasmática donde las caveolas sean abundantes, podría funcionar como un mecanismo de eflujo a través del cual los fármacos preferentemente lipofílicos son acarreados al exterior de la célula [177].

Chatterjee *et al.* [174] determinaron que al disminuir la expresión de Cav-1 en modelos murinos inoculados con células de cáncer de páncreas, disminuye el crecimiento tumoral al igual que la proliferación, invasividad y migración. También demostraron que la inhibición de Cav-1 en células de cáncer de páncreas es capaz de afectar vías de señalización como JAK2 (*janus kinase 2*)/STAT3 y SAPK (*stress-activated protein kinase*)/JNK (*c-jun n-terminal kinase*), debido a que la disminución de Cav-1 aumenta la expresión del supresor de señal de citocinas 2 (SOCS2, *supresor of cytokine signaling*) y de la proteína inhibidora de STAT3 activado (PIAS3, *protein inhibitor of activated STAT3*), los cuales inhiben a JAK2 y STAT3, respectivamente. Esta inhibición de STAT3 causada por la disminución de Cav-1 tiene repercusiones en la proliferación y la supervivencia de las células de cáncer de páncreas [174, 178]. Por lo tanto, sería útil realizar una investigación más a fondo de la actividad de Cav-1, sus interacciones con otras proteínas y vías de señalización, además de su posible relación con la resistencia de las células PANC-1 a la inhibición de las cinasas MEK y PI3K.

La función de los transportadores o proteínas membranales sugieren que su sobreexpresión provee a las células PANC-1 de un repertorio molecular encargado del transporte dentro y fuera de las células, capaz de regular procesos celulares que posiblemente otorguen la capacidad de resistencia no solo a la inhibición de las cinasas MEK y PI3K, sino a un gran y variado tipo de fármacos. Es por esto que el estudio de estas proteínas con un enfoque hacia la resistencia podría arrojar nuevos y más efectivos blancos farmacológicos que superen la resistencia que presentan las células de cáncer de páncreas.

6.5.11. Fosfatasa PP2A

Una fosfatasa que podría ser fundamental en la resistencia a la inhibición de MEK en las células PANC-1 es la fosfatasa 2A (PP2A, *protein phosphatase 2A*), subexpresada en esta línea celular en comparación con MIA PaCa-2. PP2A es un complejo de tres subunidades: subunidad A (PPP2R1A, PPP2R1B), subunidad catalítica PP2AC (PPP2CA, PPP2CB) y la subunidad B (reguladora) [179]. Las células PANC-1 muestran niveles bajos de la proteína PTPA (*serine/threonine-protein phosphatase 2A activator*), PPP2R2A (*serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform*), PPP2R1A (*serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform*), y PPP2CA (*serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform*).

PP2A es capaz de regular la vía Raf/MEK/ERK al interactuar con los sitios de fosforilación de Raf [180]. Kauko *et al.* [181] determinaron la relación de esta fosfatasa con la resistencia a la inhibición de la cinasa MEK en líneas celulares de cáncer de pulmón con mutaciones en KRas al tratarlas con trametinib (inhibidor de MEK) o con inhibición de la subunidad PPP2R1A por modificación genética con la técnica de CRISPR/Cas9, demostrando que la viabilidad y formación de colonias no decrece de igual manera que las células control cuando se inhibe la subunidad PPP2R1A. En este estudio también determinaron el efecto de la inhibición (con ARN de interferencia) de otras subunidades de PP2A (PPP2R5B, PPP2R5E y PPP2R2) sobre la resistencia a la inhibición de MEK, obteniendo resultados similares al primer experimento y por lo tanto concluyendo que la resistencia a la inhibición de MEK con trametinib está ligada a la inhibición de la fosfatasa PP2A.

Para determinar el mecanismo por el cual la inhibición de PP2A genera resistencia a la inhibición de MEK, el equipo de Kauko [181] utilizó espectrometría de masas para determinar las proteínas que son fosforiladas en ausencia de PP2A y con tratamiento con trametinib. Sus resultados indicaron que el patrón de fosforilación del inhibidor y la fosfatasa son diferentes, por lo que la resistencia a la inhibición de MEK inducida por la inhibición de PP2A no está relacionada a la actividad de la vía Raf/MEK/ERK. Como posible alternativa, este grupo de trabajo estudió la vía PI3K/Akt/mTOR y encontraron un incremento en la fosforilación de sustratos relacionados a las cinasas de esta vía de señalización (e.g. S6K y S6) cuando PP2A se inhibe. Además, observaron un incremento en p-Akt cuando la inhibición de la fosfatasa se combina con el fármaco trametinib. También observaron sobreexpresión de Myc (*Myc proto-oncogene protein*), proteína que según otros estudios es degradada cuando se inhibe a ERK [182], mientras que en el trabajo de Kauko *et al.* demostraron que la expresión de Myc inducida por la inhibición de PP2A es suficiente para generar resistencia al tratamiento con trametinib. Estos resultados y su análisis determinaron que la resistencia a la inhibición de MEK no surge de la relación que pueda tener PP2A con las cinasas MEK o ERK, sino más bien con la capacidad de esta fosfatasa para inhibir la señalización de

PI3K/Akt/mTOR. Para comprobar esta aseveración se inhibió a Akt o mTOR en combinación con la inhibición de PP2A y el tratamiento con trametinib, observando una disminución en la resistencia a la inhibición de MEK. Estos resultados concuerdan con la disminución de la resistencia de las células PANC-1 que nosotros observamos al combinar el inhibidor de MEK con el inhibidor de PI3K. Por último, en el estudio mencionado se determinó el efecto de la reactivación de PP2A (utilizando el fármaco DT-061) en la resistencia al inhibidor AZD6244. Cuando las células fueron tratadas con estos fármacos de manera individual no se observó un decremento en la proliferación, pero sí al estar en combinación, por lo que sería interesante conocer si la reactivación de PP2A induce la sensibilidad de las células PANC-1 a la inhibición de MEK.

6.5.12. Proteína de choque térmico

Otra proteína que se encontró sobre expresada en las células PANC-1 es una proteína de choque térmico (HSPA2, *heat shock-related protein 2*) la cual funciona como chaperona en el proceso de plegamiento proteico y como un regulador de la agregación de polipéptidos, además de ser capaz de unirse a proteínas proapoptóticas como las activadas por la mitocondria con el fin de inhibir su actividad [183]. En un estudio con 268 muestras de diversos tipos de tumores se encontró que esta proteína estuvo presente en 26% de ellas y que los cánceres de piel, mama, cabeza-cuello y ovario presentan más casos con expresión de esta proteína, que además estuvo presente en 11 de los 14 tipos de cáncer que se analizaron [184]. Esta proteína también se ha relacionado a las etapas del cáncer de páncreas, como lo demuestran Zhang *et al.* [185]: mientras más avanzado sea el estadio de la enfermedad, mayor es la expresión de HSPA2. Además, en ese mismo estudio se relacionó una mayor expresión de HSPA2 con la disminución de la supervivencia de los pacientes. Futuras investigaciones sobre el papel de esta proteína en el cáncer de páncreas podrían dar luz acerca de su posible rol en la resistencia a la inhibición de MEK o PI3K.

La Figura 60 muestra un resumen de los hallazgos referentes a la expresión de proteínas que podrían estar participando en la resistencia de las células PANC-1 a los fármacos AZD6244 y GDC-0941.

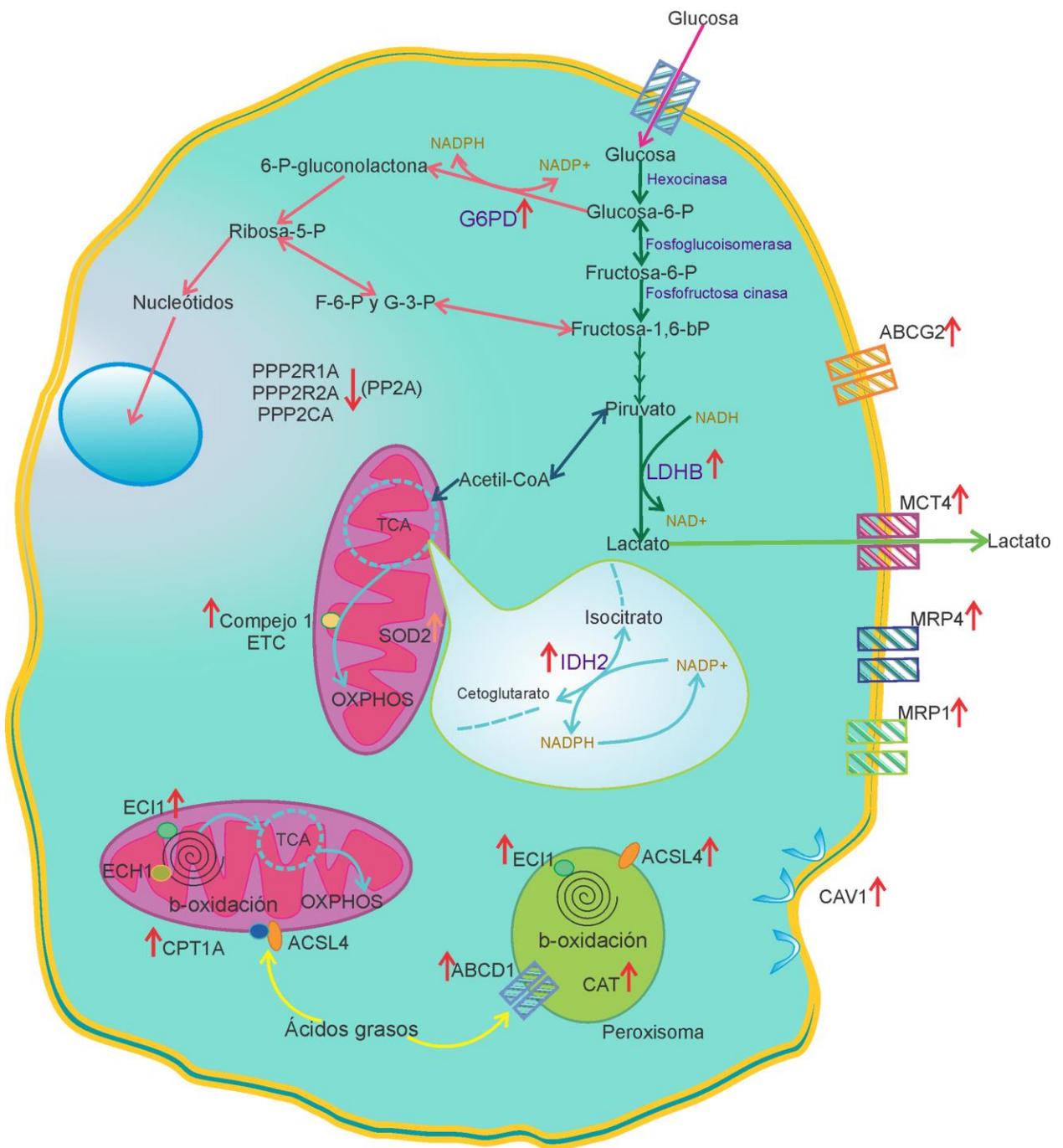


Figura 60. Proteínas sobreexpresadas ↑ o subexpresadas ↓ en las células PANC-1 en comparación con las células MIA PaCa-2, que podrían estar relacionadas con la resistencia a la inhibición de MEK y PI3K

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se comprobó la diferencia en la respuesta de la viabilidad de las células PANC-1 y MIA PaCa-2 a la inhibición de las vías Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt. Las células Mia PaCa-2 presentaron sensibilidad a la inhibición de MEK y PI3K con los fármacos AZD6244 y GDC-0941, de manera individual y en combinación. También se comprobó la resistencia de las células PANC-1 a la inhibición de MEK y PI3K por separado, y se observó que tal resistencia disminuye al inhibir simultáneamente las dos vías de señalización. Los resultados sugieren que las células PANC-1 no dependen directamente de la actividad de la vía Raf/MEK/ERK para sobrevivir y además son capaces de evadir el efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt. Se corroboró que los inhibidores AZD6244 y GDC-0941 interrumpen la actividad de sus cinasas blanco MEK y PI3K, encontrando disminución en la fosforilación de sus sustratos.

Se encontraron 743 proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2. La diferencia entre los proteomas celulares sugiere que las células sensibles presentan un metabolismo distinto a las resistentes; específicamente, las células PANC-1 mantienen niveles elevados de proteínas como LDHB, IDH2 y el complejo 1 de ETC, las cuales dirigen el metabolismo hacia la fosforilación oxidativa, mecanismo que se ha relacionado a la resistencia adquirida a la inhibición de cinasas como MEK y PI3K en células de cáncer de páncreas.

Las células PANC-1 también poseen sobreexpresión de G6PD, una enzima clave en la vía de pentosas fosfato. Además, se encontró un incremento en transportadores de membrana, como los pertenecientes a la familia ABC, mismos que se han relacionado a la resistencia a terapias en otros tipos de cánceres, incluyendo al tratamiento con GDC-0941.

Otras proteínas con elevada abundancia en PANC-1 están relacionadas con el metabolismo de lípidos y el proceso de β -oxidación de ácidos grasos (e.g. ACSL4, CPT1A y ECH1), que tienen un rol importante en la producción de energía, la supervivencia y proliferación celular. Un descubrimiento adicional e importante fue la disminución de la fosfatasa PP2A, que se encuentra estrechamente ligada a la resistencia a la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK.

En este trabajo se reporta por primera vez la inducción de la activación de STAT3 por inhibición conjunta de MEK y PI3K, y establece a este factor de transcripción como posible blanco terapéutico. La inhibición de STAT3 en las células PANC-1 redujo sustancialmente la viabilidad en comparación con los tratamientos con AZD6244 y GDC-0941. Al combinar la inhibición de PI3K con la inhibición de STAT3 se logró superar la resistencia parcial que estas células presentaron en los tratamientos con GDC-0941. Estos resultados subrayan la importancia de esta proteína para la viabilidad y la resistencia de las células PANC-1. Futuros estudios podrían ayudar a discernir mejor su papel en las vías de señalización Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt.

También se demostró la susceptibilidad de las células PANC-1 a la intervención sobre el metabolismo utilizando los fármacos 6AN, 2DG y metformina, los cuales mostraron un efecto inhibitorio de la viabilidad celular. Las células PANC-1 podrían ser susceptibles a la inhibición conjunta del metabolismo y las vías de señalización. Nosotros realizamos una comprobación preliminar de esta hipótesis empleando el inhibidor Stattic y el análogo de glucosa 2DG en tratamiento combinado. Encontramos un punto de convergencia entre el efecto de ambos compuestos, pues los dos son capaces de inhibir la actividad de STAT3 y cooperar en la reducción de la viabilidad celular, dependiendo de las concentraciones.

Por último, es importante destacar que el proteoma resistente de las células PANC-1 abarca un amplio espectro de procesos celulares que van desde la regulación del metabolismo hasta el eflujo de fármacos. Será conveniente poder conocer con mayor precisión en futuras investigaciones el rol de estos procesos en la resistencia de las células a la inhibición de MEK y PI3K, y comprobar los resultados en otras células de cáncer de páncreas resistentes.

8. REFERENCIAS

1. Maitra, A., et al., *Precursors to invasive pancreatic cancer*. *Adv Anat Pathol*, 2005. **12**(2): p. 81-91.
2. Ryan, D.P., T.S. Hong, and N. Bardeesy, *Pancreatic Adenocarcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 2014. **371**(11): p. 1039-1049.
3. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer*. *Nature reviews. Disease primers*, 2016. **2**: p. 16022-16022.
4. Meng, Q., et al., *KRAS RENAISSANCE(S) in Tumor Infiltrating B Cells in Pancreatic Cancer*. *Frontiers in Oncology*, 2018. **8**(384).
5. Maraculla, T., *Análisis molecular en tumores de páncreas avanzados para identificar biomarcadores predictivos de respuesta a nuevas drogas biológicas*, in *Departamento de medicina*. 2016, Universitat Autònoma de Barcelona: Barcelona.
6. 29 Noviembre 2018]; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>.
7. Maisonneuve, P. and A. Lowenfels, *Epidemiology and Prospects for Prevention of Pancreatic Cancer*, in *Pancreatic Cancer*, J.P. Neoptolemos, et al., Editors. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 3-18.
8. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2007. **25**(15): p. 1960-1966.
9. Cintas, C., et al., *Signal-Targeted Therapies and Resistance Mechanisms in Pancreatic Cancer: Future Developments Reside in Proteomics*. *Cancers*, 2018. **10**(6): p. 174.
10. Bournet, B., et al., *Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities*. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2016. **54**: p. 75-83.
11. Collins, M.A., et al., *Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012. **122**(2): p. 639-653.
12. Drosten, M., et al., *Loss of p53 induces cell proliferation via Ras-independent activation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014. **111**(42): p. 15155-15160.
13. Mann, K.M., et al., *KRAS-related proteins in pancreatic cancer*. *Pharmacol Ther*, 2016. **168**: p. 29-42.
14. Margolis, B. and E.Y. Skolnik, *Activation of Ras by receptor tyrosine kinases*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1994. **5**(6): p. 1288-1299.
15. Pinzón, C.E., M.L. Serrano, and M.C. Sanabria, *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos*. *Revista Ciencias de la Salud*, 2009. **7**: p. 47-66.
16. Eser, S., et al., *Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer*. *British Journal Of Cancer*, 2014. **111**: p. 817.
17. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
18. Lu, L. and J. Zeng, *Evaluation of K-ras and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma using the cancer genome atlas*. *PloS one*, 2017. **12**(7): p. e0181532-e0181532.
19. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. *Cell*, 2017. **168**(6): p. 960-976.
20. Zhou, L., et al., *Expression of key mTOR pathway components in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multicenter study for clinicopathologic and prognostic significance*. *Cancer Lett*, 2017. **395**: p. 45-52.
21. Qin, X., B. Jiang, and Y. Zhang, *4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2016. **15**(6): p. 781-786.
22. Shaul, Y.D. and R. Seger, *The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions*. *Biochimica et biophysica acta*, 2007. **1773**(8): p. 1213-1226.

23. Wang, Y., Y. Zhou, and D.T. Graves, *FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 13.
24. Hwang, J.-W., et al., *Chapter 15 - SIRT1 and Inflammaging in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, in *Inflammation, Advancing Age and Nutrition*, I. Rahman and D. Bagchi, Editors. 2014, Academic Press: San Diego. p. 183-191.
25. Yang, J.-Y., et al., *ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation*. Nature cell biology, 2008. **10**(2): p. 138-148.
26. Guan, K.L., et al., *Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27354-9.
27. Collisson, E.A., et al., *A Central Role for RAF→MEK→ERK Signaling in the Genesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Cancer Discovery, 2012. **2**(8): p. 685-693.
28. Aksamitiene, E., A. Kiyatkin, and B.N. Kholodenko, *Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(1): p. 139-46.
29. Ma, L., et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**(2): p. 179-93.
30. Scholz, A., et al., *Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 891-905.
31. Huang, C. and K. Xie, *Crosstalk of Sp1 and Stat3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2012. **23**(1-2): p. 25-35.
32. Johnston, P.A. and J.R. Grandis, *STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges*. Molecular interventions, 2011. **11**(1): p. 18-26.
33. Cao, X., et al., *Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1595-603.
34. Nagathihalli, N.S., et al., *Inverse Correlation of STAT3 and MEK Signaling Mediates Resistance to RAS Pathway Inhibition in Pancreatic Cancer*. Cancer Res, 2018. **78**(21): p. 6235-6246.
35. Jain, N., et al., *Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. Oncogene, 1998. **17**(24): p. 3157-3167.
36. Chung, J., et al., *STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6508-16.
37. Sengupta, T.K., et al., *Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(19): p. 11107-11112.
38. Sebolt-Leopold, J.S. and R. Herrera, *Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(12): p. 937-947.
39. Alagesan, B., et al., *Combined MEK and PI3K inhibition in a mouse model of pancreatic cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2015. **21**(2): p. 396-404.
40. Junttila, M.R., et al., *Modeling targeted inhibition of MEK and PI3 kinase in human pancreatic cancer*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(1): p. 40-7.
41. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 320-8.
42. Zhong, H., et al., *Synergistic effects of concurrent blockade of PI3K and MEK pathways in pancreatic cancer preclinical models*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77243.
43. Langdon, C.G., et al., *Combinatorial Screening of Pancreatic Adenocarcinoma Reveals Sensitivity to Drug Combinations Including Bromodomain Inhibitor Plus Neddylaton Inhibitor*. Mol Cancer Ther, 2017. **16**(6): p. 1041-1053.
44. Deer, E.L., et al., *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2010. **39**(4): p. 425-35.
45. Feoktistova, M., P. Geserick, and M. Leverkus, *Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells*. Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(4): p. pdb.prot087379.

46. Hopwood, D., *Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver.* Journal of anatomy, 1967. **101**(Pt 1): p. 83-92.
47. Ishiyama, M., et al., *A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability.* Talanta, 1997. **44**(7): p. 1299-1305.
48. Stockert, J.C., et al., *Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives.* Acta Histochemica, 2018. **120**(3): p. 159-167.
49. *Protocol Cell Counting Kit-8.* 7 de julio de 2019]; Available from: <https://www.dojindo.com/store/pg/76-MolTech-Protocol-Download.html>.
50. Walker, J.M., *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation*, in *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2002, Humana Press: Totowa, NJ. p. 11-14.
51. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
52. Krohn, R.I., *The colorimetric detection and quantitation of total protein.* Curr Protoc Cell Biol, 2002. **Appendix 3**: p. Appendix 3H.
53. Legler, G., et al., *On the chemical basis of the Lowry protein determination.* Anal Biochem, 1985. **150**(2): p. 278-87.
54. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
55. Mahmood, T. and P.-C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting.* North American journal of medical sciences, 2012. **4**(9): p. 429-434.
56. *Western blot introducción y optimización.* 19 de julio de 2019]; Available from: <https://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf>.
57. Rogers, L.D., Y. Fang, and L.J. Foster, *An integrated global strategy for cell lysis, fractionation, enrichment and mass spectrometric analysis of phosphorylated peptides.* Mol Biosyst, 2010. **6**(5): p. 822-9.
58. Martínez-Aguilar, J., R. Clifton-Bligh, and M.P. Molloy, *Proteomics of thyroid tumours provides new insights into their molecular composition and changes associated with malignancy.* Scientific Reports, 2016. **6**: p. 23660.
59. Cox, J. and M. Mann, *Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 273-99.
60. Walther, T.C. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics in cell biology.* The Journal of cell biology, 2010. **190**(4): p. 491-500.
61. Yang, F., et al., *High-pH reversed-phase chromatography with fraction concatenation for 2D proteomic analysis.* Expert review of proteomics, 2012. **9**(2): p. 129-134.
62. Guo, T., et al., *Rapid mass spectrometric conversion of tissue biopsy samples into permanent quantitative digital proteome maps.* Nat Med, 2015. **21**(4): p. 407-13.
63. Walther, T.C. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics in cell biology.* J Cell Biol, 2010. **190**(4): p. 491-500.
64. Sebaugh, J.L., *Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation.* Pharm Stat, 2011. **10**(2): p. 128-34.
65. Chou, T.-C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.* Advances in Enzyme Regulation, 1984. **22**: p. 27-55.
66. Chou, T.C., *Preclinical versus clinical drug combination studies.* Leuk Lymphoma, 2008. **49**(11): p. 2059-80.
67. Noor, Z., et al., *iSwathX: an interactive web-based application for extension of DIA peptide reference libraries.* Bioinformatics, 2019. **35**(3): p. 538-539.
68. Tyanova, S., et al., *The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data.* Nature Methods, 2016. **13**: p. 731.

69. Romero-Calvo, I., et al., *Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots*. *Anal Biochem*, 2010. **401**(2): p. 318-20.
70. Herbert, T.P., A.R. Tee, and C.G. Proud, *The Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway Regulates the Phosphorylation of 4E-BP1 at Multiple Sites*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(13): p. 11591-11596.
71. Schust, J., et al., *Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization*. *Chemistry & Biology*, 2006. **13**(11): p. 1235-1242.
72. Corcoran, R.B., et al., *STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis*. *Cancer research*, 2011. **71**(14): p. 5020-5029.
73. Zhang, C., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014. **14**(2): p. 280-9.
74. Batetta, B., et al., *G6PD activity and gene expression in leukemic cells from G6PD-deficient subjects*. *Cancer Letters*, 1999. **140**(1): p. 53-58.
75. Wang, J., et al., *Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer*. *Tumor Biology*, 2012. **33**(1): p. 95-101.
76. Chen, X., et al., *Modulation of G6PD affects bladder cancer via ROS accumulation and the AKT pathway in vitro*. *Int J Oncol*, 2018. **53**(4): p. 1703-1712.
77. Van Driel, B.E., et al., *Prognostic estimation of survival of colorectal cancer patients with the quantitative histochemical assay of G6PDH activity and the multiparameter classification program CLASSIF1*. *Cytometry*, 1999. **38**(4): p. 176-83.
78. Kowalik, M.A., A. Columbano, and A. Perra, *Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma*. *Frontiers in Oncology*, 2017. **7**(87).
79. Patra, K.C. and N. Hay, *The pentose phosphate pathway and cancer*. *Trends Biochem Sci*, 2014. **39**(8): p. 347-54.
80. Riganti, C., et al., *The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(3): p. 421-36.
81. Jiang, P., W. Du, and M. Wu, *Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer*. *Protein & cell*, 2014. **5**(8): p. 592-602.
82. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2009. **30**(1): p. 42-59.
83. GERHARD MICHAL, D.S., *Biochemical pathways : an atlas of biochemistry and molecular biology*. 2nd ed. 2012.
84. Ayala, A., I. Fabregat, and A. Machado, *The role of NADPH in the regulation of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in rat adipose tissue*. *Mol Cell Biochem*, 1991. **105**(1): p. 1-5.
85. Kuo, W., J. Lin, and T.K. Tang, *Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice*. *Int J Cancer*, 2000. **85**(6): p. 857-64.
86. Polimeni, M., et al., *Modulation of doxorubicin resistance by the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity*. *Biochem J*, 2011. **439**(1): p. 141-9.
87. Ju, H.Q., et al., *Disrupting G6PD-mediated Redox homeostasis enhances chemosensitivity in colorectal cancer*. *Oncogene*, 2017. **36**(45): p. 6282-6292.
88. Catanzaro, D., et al., *Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death*. *Oncotarget*, 2015. **6**(30): p. 30102-14.
89. Hong, W., et al., *Inhibition of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Reverses Cisplatin Resistance in Lung Cancer Cells via the Redox System*. *Frontiers in Pharmacology*, 2018. **9**(43).
90. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *The Biochemical journal*, 2009. **417**(1): p. 1-13.
91. Köhler, E., H.-J. Barrach, and D. Neubert, *Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP*. *FEBS Letters*, 1970. **6**(3): p. 225-228.
92. Ying, H., et al., *Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism*. *Cell*, 2012. **149**(3): p. 656-670.

93. Porporato, P.E., et al., *Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review*. *Frontiers in pharmacology*, 2011. **2**: p. 49-49.
94. McClelland, M.L., et al., *Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(4): p. 773-84.
95. Cui, J., et al., *Suppressed expression of LDHB promotes pancreatic cancer progression via inducing glycolytic phenotype*. *Med Oncol*, 2015. **32**(5): p. 143.
96. Nagamine, A., et al., *L-Lactate dehydrogenase B may be a predictive marker for sensitivity to anti-EGFR monoclonal antibodies in colorectal cancer cell lines*. *Oncology letters*, 2019. **17**(5): p. 4710-4716.
97. Dawson, D.M., et al., *Lactic Dehydrogenases: Functions of the Two Types*. *Science*, 1964. **143**(3609): p. 929-933.
98. Brisson, L., et al., *Lactate Dehydrogenase B Controls Lysosome Activity and Autophagy in Cancer*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(3): p. 418-431.
99. Levine, B., *Eating Oneself and Uninvited Guests: Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense*. *Cell*, 2005. **120**(2): p. 159-162.
100. Mirzoeva, O.K., et al., *Autophagy suppression promotes apoptotic cell death in response to inhibition of the PI3K-mTOR pathway in pancreatic adenocarcinoma*. *J Mol Med (Berl)*, 2011. **89**(9): p. 877-89.
101. Bryant, K.L., et al., *Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer*. *Nature Medicine*, 2019. **25**(4): p. 628-640.
102. Zhang, D., et al., *2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy*. *Cancer Lett*, 2014. **355**(2): p. 176-83.
103. Ashton, T.M., et al., *Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy*. *Clinical Cancer Research*, 2018. **24**(11): p. 2482.
104. Viale, A., et al., *Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function*. *Nature*, 2014. **514**.
105. Heales, S.J.R., M.E. Gegg, and J.B. Clark, *Oxidative phosphorylation: Structure, function, and intermediary metabolism*, in *International Review of Neurobiology*. 2002, Academic Press. p. 25-56.
106. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer, *Chapter 18, Oxidative Phosphorylation*, in *Biochemistry*. 2002, W. H. Freeman.
107. Janssen, R.J.R.J., et al., *Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2006. **29**(4): p. 499-515.
108. Sullivan, L.B., et al., *Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells*. *Cell*, 2015. **162**(3): p. 552-563.
109. Wheaton, W.W., et al., *Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis*. *eLife*, 2014. **3**: p. e02242-e02242.
110. Cameron, A.R., et al., *Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction*. *Redox biology*, 2018. **14**: p. 187-197.
111. Baek, G., et al., *MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies*. *Cell Rep*, 2014. **9**(6): p. 2233-49.
112. Halestrap, A.P., *The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization*. *IUBMB Life*, 2012. **64**(1): p. 1-9.
113. Pinheiro, C., et al., *Expression of Monocarboxylate Transporters 1, 2, and 4 in Human Tumours and Their Association with CD147 and CD44*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. **2010**: p. 7.
114. Mullen, A.R., et al., *Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects*. *Cell reports*, 2014. **7**(5): p. 1679-1690.
115. Reitman, Z.J. and H. Yan, *Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2010. **102**(13): p. 932-941.

116. Bergaggio, E. and R. Piva, *Wild-Type IDH Enzymes as Actionable Targets for Cancer Therapy*. *Cancers*, 2019. **11**(4): p. 563.
117. Altenberg, B. and K.O. Greulich, *Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes*. *Genomics*, 2004. **84**(6): p. 1014-1020.
118. Vaziri-Gohar, A., et al., *Abstract LB-B05: Targeting IDH1 inhibits survival and growth of pancreatic cancer cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018. **17**(1 Supplement): p. LB-B05-LB-B05.
119. Xiao, H., et al., *Separate and concurrent use of 2-deoxy-D-glucose and 3-bromopyruvate in pancreatic cancer cells*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(1): p. 329-34.
120. Ahmad, I.M., et al., *Mitochondrial O₂*- and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4254-63.
121. Wu, H., et al., *Silencing of Elongation Factor-2 Kinase Potentiates the Effect of 2-Deoxy-D-Glucose against Human Glioma Cells through Blunting of Autophagy*. *Cancer Research*, 2009. **69**(6): p. 2453.
122. Testa, J.R. and A. Bellacosa, *AKT plays a central role in tumorigenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. **98**(20): p. 10983-10985.
123. Altomare, D.A., et al., *Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas*. *J Cell Biochem*, 2002. **87**(4): p. 470-6.
124. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
125. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(2): p. 197-208.
126. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. *Development*, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
127. Hutchinson, J.N., et al., *Activation of Akt-1 (PKB- α) Can Accelerate ErbB-2-Mediated Mammary Tumorigenesis but Suppresses Tumor Invasion*. *Cancer Research*, 2004. **64**(9): p. 3171-3178.
128. Stahl, J.M., et al., *Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma*. *Cancer Research*, 2004. **64**(19): p. 7002-7010.
129. Ruggeri, B.A., et al., *Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas*. *Mol Carcinog*, 1998. **21**(2): p. 81-6.
130. Cheng, J.Q., et al., *Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(8): p. 3636-3641.
131. Banno, E., et al., *Clinical significance of Akt2 in advanced pancreatic cancer treated with erlotinib*. *International Journal of Oncology*, 2017. **50**.
132. Kelley, R.K. and A.H. Ko, *Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer*. *Biologics : targets & therapy*, 2008. **2**(1): p. 83-95.
133. Ogawara, Y., et al., *Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **277**: p. 21843-50.
134. Yamaguchi, H. and H.-G. Wang, *The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change*. *Oncogene*, 2001. **20**(53): p. 7779-7786.
135. Narita, M., et al., *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(25): p. 14681-14686.
136. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. *Genes Dev*, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
137. Tsuruta, F., N. Masuyama, and Y. Gotoh, *The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 14040-7.
138. Arboleda, M.J., et al., *Overexpression of AKT2/Protein Kinase B β Leads to Up-Regulation of β 1 Integrins, Increased Invasion, and Metastasis of Human Breast and Ovarian Cancer Cells*. *Cancer Research*, 2003. **63**(1): p. 196-206.

139. Kern, A., et al., *Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1*. Eur J Biochem, 1993. **215**(1): p. 151-9.
140. Kumari, A., *Chapter 4 - Beta Oxidation of Fatty Acids*, in *Sweet Biochemistry*, A. Kumari, Editor. 2018, Academic Press. p. 17-19.
141. Houten, S.M. and R.J.A. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation*. Journal of inherited metabolic disease, 2010. **33**(5): p. 469-477.
142. Mannaerts, G.P. and P.P. Van Veldhoven, [*Peroxisomal beta-oxidation*]. Verh K Acad Geneeskd Belg, 1993. **55**(1): p. 45-78.
143. Soupene, E. and F.A. Kuypers, *Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(5): p. 507-21.
144. Wu, X., et al., *ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44849-44863.
145. Zaugg, K., et al., *Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1041-51.
146. Janssen, U. and W. Stoffel, *Disruption of mitochondrial beta -oxidation of unsaturated fatty acids in the 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase-deficient mouse*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19579-84.
147. Poirier, Y., et al., *Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2006. **1763**(12): p. 1413-1426.
148. Kärki, T., et al., *β -oxidation of polyunsaturated fatty acids in peroxisomes Subcellular distribution of $\Delta 3, \Delta 2$ -enoyl-CoA isomerase activity in rat liver*. FEBS Letters, 1987. **215**(2): p. 228-232.
149. Roongta, U.V., et al., *Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(11): p. 1551-61.
150. Sunami, Y., A. Rebelo, and J. Kleeff, *Lipid Metabolism and Lipid Droplets in Pancreatic Cancer and Stellate Cells*. Cancers, 2017. **10**(1): p. 3.
151. Vriens, K., et al., *Evidence for an alternative fatty acid desaturation pathway increasing cancer plasticity*. Nature, 2019. **566**(7744): p. 403-406.
152. Kruh, G.D. and M.G. Belinsky, *The MRP family of drug efflux pumps*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7537-52.
153. Marchetti, S., et al., *Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic studies employing Bcrp1^{-/-}/Mdr1a/1b^{-/-} (triple-knockout) and wild-type mice*. Molecular Cancer Therapeutics, 2008. **7**(8): p. 2280-2287.
154. Westover, D. and F. Li, *New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2015. **34**(1): p. 159.
155. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 48-58.
156. Mohelnikova-Duchonova, B., et al., *Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues*. Pancreas, 2013. **42**(4): p. 707-16.
157. Kim, Y.H., et al., *Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 2009. **65**(1): p. 105-111.
158. Wang, L., N. Lin, and Y. Li, *The PI3K/AKT signaling pathway regulates ABCG2 expression and confers resistance to chemotherapy in human multiple myeloma*. Oncol Rep, 2019. **41**(3): p. 1678-1690.
159. Takada, T., et al., *Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of Akt in polarized cells*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(7): p. 905-9.
160. Ling, X., et al., *An ABCG2 non-substrate anticancer agent FL118 targets drug-resistant cancer stem-like cells and overcomes treatment resistance of human pancreatic cancer*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018. **37**(1): p. 240.
161. Salphati, L., et al., *Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein-1 in the Brain Penetration and Brain Pharmacodynamic Activity of the Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor GDC-0941*. Drug Metabolism and Disposition, 2010. **38**(9): p. 1422-1426.

162. Baker, A., et al., *Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism*. Biochemical Society transactions, 2015. **43**(5): p. 959-965.
163. van Roermund, C.W., et al., *The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters*. Faseb j, 2008. **22**(12): p. 4201-8.
164. Wanders, R.J.A., et al., *The peroxisomal ABC transporter family*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2007. **453**(5): p. 719-734.
165. Deeley, R.G. and S.P. Cole, *Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1)*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1103-11.
166. Jedlitschky, G., et al., *Transport of Glutathione, Glucuronate, and Sulfate Conjugates by the MRP Gene-encoded Conjugate Export Pump*. Cancer Research, 1996. **56**(5): p. 988-994.
167. Munoz, M., et al., *Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer*. IUBMB Life, 2007. **59**(12): p. 752-7.
168. Lu, J.F., D. Pokharel, and M. Bebawy, *MRP1 and its role in anticancer drug resistance*. Drug Metab Rev, 2015. **47**(4): p. 406-19.
169. Johnson, Z.L. and J. Chen, *Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1*. Cell, 2017. **168**(6): p. 1075-1085.e9.
170. Rudas, M., et al., *Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **81**(2): p. 149-57.
171. Lee, J.T., Jr., L.S. Steelman, and J.A. McCubrey, *Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8397-404.
172. May, M., et al., *P-020: Targeting multidrug resistance – associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in pancreatic cancer*. Annals of Oncology, 2016. **27**(Suppl 2): p. ii6-ii7.
173. Williams, T.M. and M.P. Lisanti, *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(3): p. C494-506.
174. Chatterjee, M., et al., *Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10867.
175. Razani, B., S.E. Woodman, and M.P. Lisanti, *Caveolae: from cell biology to animal physiology*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 431-67.
176. Suzuoki, M., et al., *Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. British journal of cancer, 2002. **87**(10): p. 1140-1144.
177. Lavie, Y., G. Fiucci, and M. Liscovitch, *Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **49**(3): p. 317-323.
178. Turkson, J., et al., *Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2545-52.
179. Kauko, O. and J. Westermarck, *Non-genomic mechanisms of protein phosphatase 2A (PP2A) regulation in cancer*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2018. **96**: p. 157-164.
180. Eichhorn, P.J.A., M.P. Creighton, and R. Bernards, *Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2009. **1795**(1): p. 1-15.
181. Kauko, O., et al., *PP2A inhibition is a druggable MEK inhibitor resistance mechanism in KRAS-mutant lung cancer cells*. Sci Transl Med, 2018. **10**(450).
182. Hayes, T.K., et al., *Long-Term ERK Inhibition in KRAS-Mutant Pancreatic Cancer Is Associated with MYC Degradation and Senescence-like Growth Suppression*. Cancer cell, 2016. **29**(1): p. 75-89.
183. Kalmar, B. and L. Greensmith, *Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**(4): p. 310-318.
184. Scieglinska, D., et al., *HSPA2 is expressed in human tumors and correlates with clinical features in non-small cell lung carcinoma patients*. Anticancer Res, 2014. **34**(6): p. 2833-40.
185. Zhang, H., et al., *Expression and clinical significance of HSPA2 in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Diagnostic pathology, 2015. **10**: p. 13-13.

9. APÉNDICE

Metodología de fraccionamiento por fase reversa e intercambio aniónico

Las microcolumnas para fraccionamiento por fase reversa e intercambio aniónico se prepararon utilizando los siguientes materiales:

- Puntas para micropipeta de 200 μ L cortadas del extremo angosto para obtener una circunferencia de aproximadamente 1 mm de diámetro como se observa en las Figuras A1 y A2
- Discos de fase reversa 3M Empore C18 (N° de catálogo 2215)
- Discos de intercambio aniónico 3M Empore Anion (N° de catálogo 2252)
- Puntas para micropipeta de 200 μ L sin cortar
- Clip metálico desdoblado

Los microdiscos se cortaron a partir del disco Empore C18 o Empore Anion utilizando el extremo angosto de la punta cortada (Figura A3), en la cual quedaba atrapada una porción del disco original (Figura A4). Los microdiscos así obtenidos se depositaron en la parte baja de la punta para micropipeta de 200 μ L (sin cortar) con ayuda de un clip metálico, como se muestra en las Figuras A5 y A6. Las microcolumnas de fase reversa se prepararon depositando cinco microdiscos C18 en la punta de 200 μ L. mientras que para las microcolumnas de intercambio aniónico se utilizaron seis microdiscos de tipo aniónico.

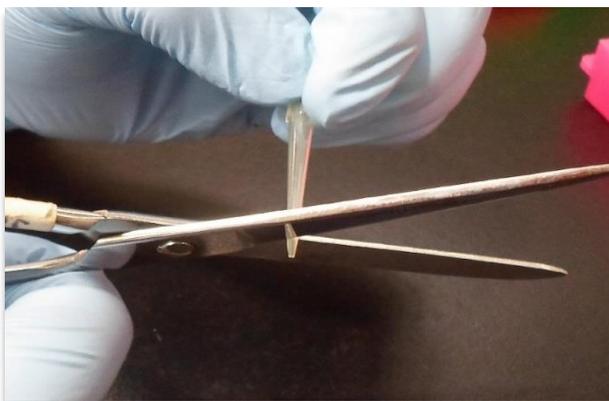


Figura A1. Corte de punta para micropipeta de 200 μ L para obtener una circunferencia de aproximadamente 1 mm de diámetro.



Figura A2. Vista de la circunferencia de punta cortada

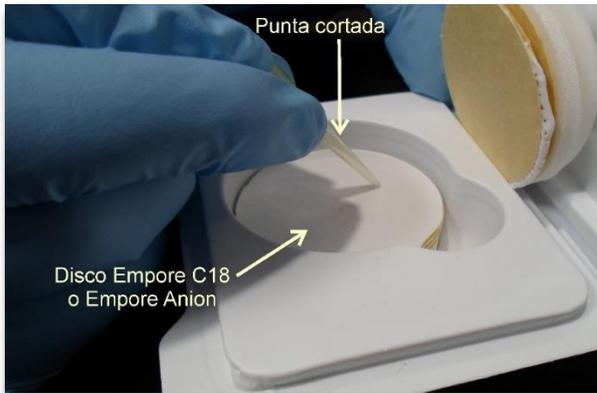


Figura A3. Corte de disco Empore C18/Empore Anion utilizando una punta cortada

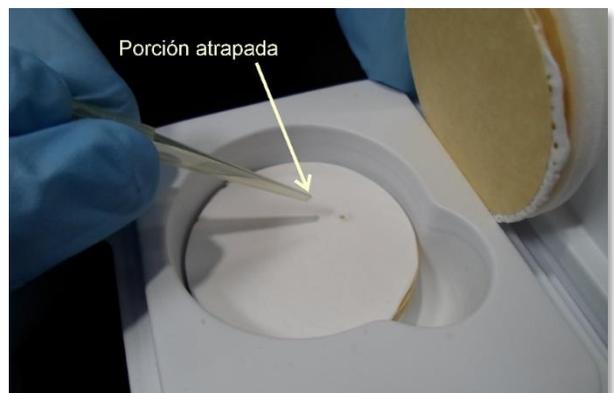


Figura A4. La porción atrapada es un microdisco de un diámetro aproximado de 1 mm

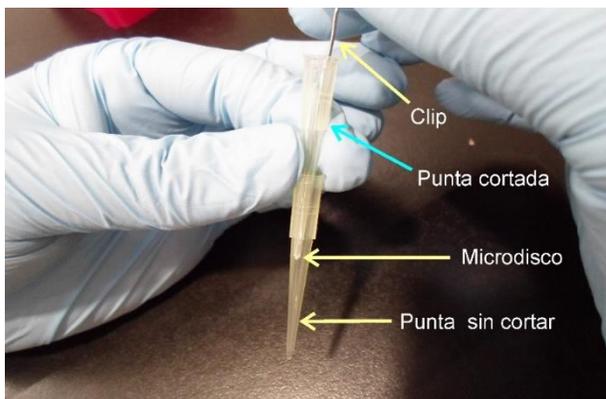


Figura A5. El microdisco se deposita con la ayuda de un clip adentro de una punta de 200 µL, donde se apila el número de microdiscos necesarios para la microcolumna



Figura A6. Microcolumna terminada

Tablas de resultados de viabilidad celular

T= Tratamiento, C= Control, S= Desviación estándar

Tabla 1. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK AZD6244.
 Réplica 1. Correspondiente a Figura 8

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.05	-1.30	1.419	1.408	1.008	100.8	2.5
0.5	-0.30	1.299	1.264	1.028	102.8	3.0
5	0.70	1.290	1.197	1.078	107.8	6.6
50	1.70	1.009	1.116	0.904	90.4	2.7
500	2.70	0.491	1.198	0.410	41.0	1.2
5000	3.70	0.328	1.202	0.273	27.3	2.0
100000	5.00	0.177	1.143	0.155	15.5	1.1

Tabla 2. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK AZD6244.
 Réplica 2. Correspondiente a Figura 9

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.05	-1.30	1.469	1.375	1.069	106.9	1.4
0.5	-0.30	1.127	1.144	0.985	98.5	3.1
5	0.70	1.118	1.194	0.937	93.7	3.0
50	1.70	0.992	1.052	0.943	94.3	4.1
500	2.70	0.469	1.098	0.427	42.7	2.2
5000	3.70	0.298	1.101	0.270	27.0	1.1
100000	5.00	0.185	1.155	0.160	16.0	0.3

Tabla 3. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244).
 Réplica 3. Correspondiente a Figura 10

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.05	-1.30	1.376	1.322	1.041	104.1	5.1
0.5	-0.30	1.306	1.317	0.991	99.1	4.6
5	0.70	1.284	1.103	1.165	116.5	2.5
50	1.70	1.015	1.196	0.849	84.9	3.7
500	2.70	0.475	1.218	0.390	39.0	1.1
5000	3.70	0.293	1.233	0.238	23.8	0.8
150000	5.18	0.184	1.206	0.153	15.3	1.9

Tabla 4. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244). Réplica
 1. Correspondiente a Figura 11

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.628	0.529	1.186	118.6	9.7
10	1.00	0.631	0.632	0.997	99.7	7.6
100	2.00	0.627	0.572	1.096	109.6	9.0
1000	3.00	0.604	0.612	0.987	98.7	5.5
10000	4.00	0.497	0.539	0.923	92.3	4.0
50000	4.70	0.342	0.380	0.898	89.8	7.7
100000	5.00	0.200	0.351	0.568	56.8	4.9

Tabla 5. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244). Réplica 2. Correspondiente a Figura 12

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.657	0.599	1.096	109.6	2.0
10	1.00	0.686	0.713	0.962	96.2	5.6
100	2.00	0.681	0.601	1.134	113.4	6.6
1000	3.00	0.639	0.785	0.815	81.5	7.4
10000	4.00	0.576	0.574	1.003	100.3	9.8
50000	4.70	0.516	0.599	0.862	86.2	11.1
100000	5.00	0.375	0.764	0.491	49.1	3.3

Tabla 6. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244). Réplica 3. Correspondiente a Figura 13

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.332	0.321	1.035	103.5	17.5
10	1.00	0.385	0.349	1.102	110.2	7.2
100	2.00	0.360	0.359	1.004	100.4	2.8
1000	3.00	0.345	0.373	0.927	92.7	7.5
10000	4.00	0.353	0.395	0.893	89.3	5.1
50000	4.70	0.234	0.319	0.733	73.3	3.8
100000	5.00	0.181	0.447	0.406	40.6	3.0

Tabla 7. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941). Réplica 1. Correspondiente a la Figura 14

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
10	1.00	1.377	1.498	0.919	91.9	4.2
100	2.00	1.251	1.279	0.978	97.8	2.1
400	2.60	0.975	1.146	0.850	85.0	3.7
1000	3.00	0.778	1.049	0.741	74.1	2.6
3000	3.48	0.413	1.053	0.392	39.2	1.3
5000	3.70	0.318	1.198	0.266	26.6	1.7
20000	4.30	0.396	1.195	0.331	33.1	4.1

Tabla 8. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941). Réplica 2. Correspondiente a Figura 15

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
10	1.00	1.359	1.231	1.104	110.4	8.6
100	2.00	1.205	1.105	1.090	109.0	3.9
400	2.60	0.956	1.207	0.792	79.2	3.0
1000	3.00	0.780	1.206	0.647	64.7	3.4
3000	3.48	0.479	1.066	0.449	44.9	2.0
5000	3.70	0.376	1.199	0.314	31.4	1.8
15000	4.18	0.655	1.161	0.564	56.4	4.2

Tabla 9. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941).
 Réplica 3. Correspondiente a Figura 16

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
10	1.00	1.025	1.051	0.975	97.5	9.0
100	2.00	0.991	1.060	0.936	93.6	6.4
400	2.60	0.881	1.078	0.817	81.7	5.6
1000	3.00	0.748	1.216	0.615	61.5	5.2
3000	3.48	0.453	1.180	0.384	38.4	6.8
5000	3.70	0.346	1.130	0.306	30.6	2.8
10000	4.00	0.316	1.179	0.268	26.8	1.1

Tabla 10. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de PI3K(GDC-0941).
 Replica 1. Correspondiente a Figura 17

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
20	1.30	0.447	0.475	0.942	94.2	3.2
100	2.00	0.412	0.525	0.785	78.5	4.1
800	2.90	0.321	0.509	0.631	63.1	1.4
2000	3.30	0.263	0.493	0.534	53.4	4.1
5000	3.70	0.225	0.440	0.512	51.2	1.4
10000	4.00	0.193	0.449	0.429	42.9	2.6
30000	4.48	0.222	0.436	0.508	50.8	5.9

Tabla 11. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941).
 Réplica2. Correspondiente a Figura 18

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
20	1.30	0.164	0.160	1.025	102.5	7.5
100	2.00	0.151	0.161	0.940	94.0	4.3
800	2.90	0.124	0.213	0.582	58.2	5.6
2000	3.30	0.099	0.178	0.556	55.6	1.7
5000	3.70	0.094	0.169	0.554	55.4	6.8
10000	4.00	0.079	0.161	0.494	49.4	2.5
30000	4.48	0.098	0.214	0.457	45.7	12.0

Tabla 12. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941).
 Réplica 3. Correspondiente a Figura 19

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
20	1.30	0.377	0.346	1.090	109.0	6.3
100	2.00	0.329	0.396	0.831	83.1	8.7
800	2.90	0.231	0.359	0.644	64.4	8.9
2000	3.30	0.215	0.445	0.484	48.4	2.6
5000	3.70	0.189	0.483	0.391	39.1	4.0
10000	4.00	0.180	0.410	0.440	44.0	3.9
30000	4.48	0.174	0.437	0.397	39.7	9.9

Tabla 13. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (GDC-0941) en combinación. Réplica 1. Correspondiente a Figura 20

Concentración	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25(CI50)	0.525	1.343	0.391	39.1	1.4
0.5(CI50)	0.374	1.304	0.287	28.7	2.4
1(CI50)	0.275	1.354	0.203	20.3	1.2
2(CI50)	0.199	1.326	0.150	15.0	0.8
4(CI50)	0.152	1.273	0.119	11.9	0.7

Tabla 14. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941) de manera individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 20

Concentración	IC	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25(CI50)	.25x	1.009	1.412	0.715	71.5	4.7
0.5(CI50)	.5x	0.863	1.295	0.667	66.7	1.4
1(CI50)	1x	0.674	1.298	0.520	52.0	6.1
2(CI50)	2x	0.478	1.203	0.398	39.8	2.7
4(CI50)	4x	0.395	1.217	0.325	32.5	3.3

Tabla 15. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) de manera individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 20

Concentración	IC	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25(CI50)	.25x	1.012	1.389	0.729	72.9	4.6
0.5(CI50)	.5x	0.936	1.364	0.686	68.6	4.4
1(CI50)	1x	0.824	1.235	0.667	66.7	8.8
2(CI50)	2x	0.708	1.370	0.517	51.7	4.1
4(CI50)	4x	0.588	1.341	0.439	43.9	3.9

Tabla 16. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (GDC-0941) en combinación. Réplica 2. Correspondiente a Figura 21

Concentración	IC	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25(CI50)	.25x	0.527	1.403	0.375	37.5	1.6
0.5(CI50)	.5x	0.351	1.324	0.265	26.5	1.6
1(CI50)	1x	0.257	1.365	0.188	18.8	1.2
2(CI50)	2x	0.201	1.320	0.152	15.2	0.5
4(CI50)	4x	0.150	1.113	0.135	13.5	0.4

Tabla 17. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de PI3K (GDC-0941) de manera individual. Réplica 2. Correspondiente a Figura 21

Concentración	IC	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25(CI50)	.25x	0.996	1.346	0.740	74.0	4.5
0.5(CI50)	.5x	0.911	1.273	0.715	71.5	6.9
1(CI50)	1x	0.745	1.189	0.627	62.7	5.5
2(CI50)	2x	0.639	1.308	0.488	48.8	-
4(CI50)	4x	0.568	1.261	0.450	45.0	2.4

Tabla 18. Resultados de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) de manera individual. Réplica 2. Correspondiente a Figura 21

Concentración	IC	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25(CI50)	.25x	0.919	1.401	0.656	65.6	7.2
0.5(CI50)	.5x	0.933	1.235	0.756	75.6	6.2
1(CI50)	1x	0.764	1.346	0.567	56.7	7.0
2(CI50)	2x	0.644	1.285	0.501	50.1	0.4
4(CI50)	4x	0.570	1.348	0.423	42.3	3.3

Tabla 19. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual y en combinación con GDC-0941 de concentración fija (2 μ M). Réplica 1. Correspondiente a figura 22

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.494	1.027	0.481	48.1	2.3
10	1.00	0.459	1.105	0.416	41.6	3.4
100	2.00	0.400	1.073	0.373	37.3	3.6
1000	3.00	0.503	1.603	0.314	31.4	0.7
10000	4.00	0.240	1.108	0.217	21.7	1.5

Tabla 20. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 22

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.4965	0.4730	1.0497	105.0	3.9
10	1.00	0.5320	0.5087	1.0459	104.6	3.8
100	2.00	0.5153	0.5575	0.9244	92.4	6.0
1000	3.00	0.5245	0.4990	1.0511	105.1	7.2
10000	4.00	0.4495	0.5485	0.8195	82.0	10.9

Tabla 21. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual y en combinación con GDC-0941 de concentración fija (2 μ M). Réplica 2. Correspondiente a Figura 23

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.0	0.547	1.054	0.519	51.9	5.7
10	1.0	0.523	1.045	0.501	50.1	2.6
100	2.0	0.417	1.032	0.404	40.4	0.8
1000	3.0	0.280	1.042	0.269	26.9	1.2
10000	4.0	0.283	0.956	0.296	29.6	1.2

Tabla 22. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual. Réplica 2. Correspondiente a figura 23

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.565	0.596	0.947	94.7	3.6
10	1.00	0.588	0.577	1.018	101.8	9.5
100	2.00	0.571	0.654	0.874	87.4	3.7
1000	3.00	0.647	0.601	1.077	107.7	6.0
10000	4.00	0.516	0.560	0.921	92.1	4.4

Tabla 23. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de STAT3 (Stattic). Réplica 1. Correspondiente a Figura 24

[Stattic]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
10	1.00	0.346	0.325	1.066	106.6	13.7
50	1.70	0.356	0.340	1.047	104.7	10.1
200	2.30	0.346	0.336	1.031	103.1	5.7
800	2.90	0.289	0.326	0.888	88.8	6.5
1600	3.20	0.217	0.320	0.678	67.8	7.8
2400	3.38	0.134	0.329	0.406	40.6	6.6
3200	3.51	0.045	0.350	0.129	12.9	2.2
4800	3.68	0.026	0.348	0.075	7.5	1.0
9600	3.98	0.027	0.356	0.077	7.7	1.8
40000	4.60	0.041	0.375	0.109	10.9	0.7

Tabla 24. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de STAT3 (Stattic). Réplica 2. Correspondiente a Figura 25

[Stattic]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
10	1.00	0.327	0.324	1.011	101.1	14.3
50	1.70	0.313	0.311	1.009	100.9	8.4
200	2.30	0.305	0.323	0.942	94.2	5.6
800	2.90	0.271	0.312	0.868	86.8	7.1
1600	3.20	0.243	0.327	0.743	74.3	5.4
2400	3.38	0.203	0.317	0.641	64.1	4.0
3200	3.51	0.095	0.346	0.276	27.6	9.1
4800	3.68	0.023	0.323	0.072	7.2	1.8
9600	3.98	0.016	0.337	0.047	4.7	1.2
40000	4.60	0.034	0.316	0.107	10.7	1.2

Tabla 25. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con inhibidor de STAT3 (Stattic). Réplica 3. Correspondiente a Figura 26

[Stattic]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
10	1.00	0.328	0.265	1.236	123.6	14.7
50	1.70	0.264	0.267	0.989	98.9	3.8
200	2.30	0.262	0.260	1.006	100.6	7.7
800	2.90	0.231	0.285	0.810	81.0	8.0
1600	3.20	0.204	0.273	0.748	74.8	8.5
2400	3.38	0.156	0.305	0.510	51.0	5.9
3200	3.51	0.049	0.286	0.170	17.0	5.5
4800	3.68	0.014	0.305	0.045	4.5	1.0
9600	3.98	0.008	0.275	0.029	2.9	0.8
40000	4.60	0.028	0.315	0.090	9.0	1.0

Tabla 26. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 1. Correspondiente a Figura 27

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.227	0.404	0.563	56.3	9.8
10	1.00	0.233	0.449	0.520	52.0	6.3
100	2.00	0.230	0.413	0.556	55.6	3.0
1000	3.00	0.251	0.453	0.555	55.5	7.9
10000	4.00	0.244	0.432	0.564	56.4	7.7

Tabla 27. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 27

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0	0.535	0.576	0.929	92.9	4.1
10	1	0.541	0.582	0.931	93.1	7.7
100	2	0.553	0.576	0.960	96.0	6.3
1000	3	0.519	0.580	0.896	89.6	6.3
10000	4	0.540	0.602	0.897	89.7	8.2

Tabla 28. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic en concentración constante. Réplica 2. Correspondiente a Figura 28

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.294	0.445	0.660	66.0	6.3
10	1.00	0.254	0.440	0.578	57.8	9.7
100	2.00	0.257	0.425	0.604	60.4	4.7
1000	3.00	0.243	0.425	0.573	57.3	5.6
10000	4.00	0.258	0.520	0.497	49.7	3.9

Tabla 29. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual. Réplica 2. Correspondiente a Figura 28

[AZD6244]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
1	0.00	0.505	0.497	1.015	101.5	6.9
10	1.00	0.477	0.469	1.017	101.7	8.3
100	2.00	0.481	0.484	0.993	99.3	5.5
1000	3.00	0.502	0.514	0.977	97.7	6.6
10000	4.00	0.449	0.537	0.836	83.6	7.8

Tabla 30. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic en concentración constante. Réplica 1. Correspondiente a Figura 29

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
100	2.00	0.203	0.517	0.393	39.3	4.8
800	2.90	0.091	0.482	0.188	18.8	3.2
2000	3.30	0.069	0.443	0.155	15.5	3.5
5000	3.70	0.053	0.421	0.125	12.5	4.4
10000	4.00	0.056	0.491	0.113	11.3	1.9

Tabla 31. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 29

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
100	2.00	0.436	0.441	0.988	98.8	9.2
800	2.90	0.313	0.550	0.568	56.8	9.4
2000	3.30	0.272	0.544	0.501	50.1	8.3
5000	3.70	0.224	0.537	0.416	41.6	3.1
10000	4.00	0.261	0.526	0.496	49.6	5.4

Tabla 32. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic en concentración constante. Réplica 2. Correspondiente a Figura 30

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
100	2.00	0.235	0.421	0.557	51.5	2.5
800	2.90	0.154	0.472	0.326	32.6	3.9
2000	3.30	0.131	0.500	0.263	26.3	3.3
5000	3.70	0.076	0.483	0.157	15.7	2.9
10000	4.00	0.076	0.458	0.167	16.7	3.1

Tabla 33. Resultados de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual. Réplica 2. Correspondiente a Figura 30

[GDC-0941]/nM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
100	2.00	0.466	0.511	0.912	91.2	2.9
800	2.90	0.414	0.537	0.770	77.0	9.4
2000	3.30	0.325	0.660	0.492	49.2	5.2
5000	3.70	0.229	0.547	0.419	41.9	5.8
10000	4.00	0.210	0.510	0.411	41.1	8.3

Tabla 34. Lista de proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0.05$, $-1 > \text{Diferencia} (\log_2) > 1$) en la comparación PANC-1/MIA PaCa-2 mediante proteómica basada en espectrometría de masas

# acceso	Nombre de proteína	Nombre de gen	-log (valor de p)	Diferencia (log2)
P80723	Brain acid soluble protein 1	BASP1	4.74	5.92
O95864	Acyl-CoA 6-desaturase	FADS2	3.80	5.12
P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	5.42	4.97
P31947	14-3-3 protein sigma	SFN	4.57	4.77
Q9BS40	Latexin	LXN	3.36	4.74
P15144	Aminopeptidase N	ANPEP	4.57	4.67
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain	HLA-A	4.51	4.36
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	5.22	4.35
O75368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	SH3BGRL	2.71	4.26
P05362	Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	5.20	4.16
O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	4.88	3.95
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	4.59	3.83
Q08431	Lactadherin	MFGE8	3.52	3.80
Q9UJG1	Motile sperm domain-containing protein 1	MOSPD1	4.49	3.76
P52926	High mobility group protein HMGI-C	HMGA2	3.68	3.62
Q13641	Trophoblast glycoprotein	TPBG	4.01	3.58
Q16658	Fascin	FSCN1	5.62	3.58
Q9C002	Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	NMES1	3.40	3.53
P48681	Nestin	NES	5.01	3.51
Q9Y6N5	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	SQOR	3.95	3.51
Q12765	Secernin-1	SCRN1	3.47	3.48
P13987	CD59 glycoprotein	CD59	3.98	3.42
Q7L5N7	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	LPCAT2	3.08	3.36
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	4.30	3.36
O14683	Tumor protein p53-inducible protein 11	TP53I11	4.41	3.35
P30508	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain	HLA-C	2.72	3.35
Q8N111	Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1	CEND1	2.30	3.34
P02649	Apolipoprotein E	APOE	4.46	3.31
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	PYCARD	2.63	3.26
Q9UM22	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1	2.71	3.25
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	3.91	3.24
Q6PCB0	von Willebrand factor A domain-containing protein 1	VWA1	3.97	3.22
O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	2.61	3.16
P32004	Neural cell adhesion molecule L1	L1CAM	4.77	3.11
P84022	Mothers against decapentaplegic homolog 3	SMAD3	3.42	3.10
O00469	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	3.22	3.08
Q16831	Uridine phosphorylase 1	UPP1	2.75	3.07
P17301	Integrin alpha-2	ITGA2	3.42	3.05
O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2	5.66	3.04
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	2.03	3.01
Q92882	Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1	2.45	3.00
P51636	Caveolin-2	CAV2	3.48	2.99
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	KRT19	4.57	2.92
Q9BV40	Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8	3.55	2.91
Q9UNQ0	ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG2	2.39	2.89
P07339	Cathepsin D	CTSD	7.50	2.89
P35219	Carbonic anhydrase-related protein	CA8	2.68	2.87
P50443	Sulfate transporter	SLC26A2	2.03	2.86
Q969G5	Caveolae-associated protein 3	CAVIN3	3.63	2.86

Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIMM50	4.36	2.84
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	4.91	2.79
O60437	Periplakin	PPL	4.08	2.75
Q8N4X5	Actin filament-associated protein 1-like 2	AFAP1L2	3.96	2.73
Q96A00	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14A	PPP1R14A	3.78	2.72
O43707	Alpha-actinin-4	ACTN4	5.46	2.67
Q9Y2J8	Protein-arginine deiminase type-2	PADI2	2.96	2.67
O00746	Nucleoside diphosphate kinase, mitochondrial	NME4	2.22	2.65
O94851	[F-actin]-monooxygenase MICAL2	MICAL2	1.76	2.64
Q9UK22	F-box only protein 2	FBXO2	4.07	2.61
Q7L9B9	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain-containing protein1	EEPD1	2.16	2.60
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1	4.84	2.59
Q9UGI8	Testin	TES	2.56	2.59
Q2PZI1	Probable C-mannosyltransferase DPY19L1	DPY19L1	3.91	2.55
P07602	Prosaposin	PSAP	4.35	2.54
P33764	Protein S100-A3	S100A3	2.76	2.53
Q99829	Copine-1	CPNE1	2.64	2.53
Q99519	Sialidase-1	NEU1	2.91	2.49
P06756	Integrin alpha-V	ITGAV	3.81	2.49
Q9NPR2	Semaphorin-4B	SEMA4B	2.51	2.48
Q9UHR4	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	BAIAP2L1	4.47	2.48
P33897	ATP-binding cassette sub-family D member 1	ABCD1	3.20	2.48
Q96AB3	Isochorismatase domain-containing protein 2	ISOC2	5.21	2.48
Q86SF2	N-acetylgalactosaminyltransferase 7	GALNT7	2.39	2.47
P50238	Cysteine-rich protein 1	CRIP1	1.95	2.47
O76074	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	PDE5A	3.90	2.47
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	TTC37	2.70	2.45
Q9H4M9	EH domain-containing protein 1	EHD1	4.89	2.44
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	ASPH	4.60	2.42
P31751	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	2.74	2.41
Q9Y666	Solute carrier family 12 member 7	SLC12A7	4.77	2.41
P39060	Collagen alpha-1 (XVIII) chain	COL18A1	3.94	2.40
P49407	Beta-arrestin-1	ARRB1	2.22	2.40
Q9NP81	Serine--tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	3.15	2.39
P30408	Transmembrane 4 L6 family member 1	TM4SF1	1.75	2.36
Q9H223	EH domain-containing protein 4	EHD4	3.61	2.35
P19474	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	TRIM21	2.52	2.34
A0M266	Shootin-1	SHTN1	2.93	2.34
Q9UDY2	Tight junction protein ZO-2	TJP2	5.35	2.34
Q9BUP0	EF-hand domain-containing protein D1	EFHD1	1.55	2.34
O14493	Claudin-4	CLDN4	1.37	2.33
Q9BYG5	Partitioning defective 6 homolog beta	PAR6B	4.02	2.33
Q9NUI1	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	DECR2	3.01	2.33
Q13501	Sequestosome-1	SQSTM1	5.27	2.31
Q03135	Caveolin-1	CAV1	5.06	2.31
Q5PRF9	Protein Smaug homolog 2	SAMD4B	2.82	2.30
Q13423	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	NNT	3.94	2.28
P12830	Cadherin-1	CDH1	4.23	2.28
Q15477	Helicase SKI2W	SKI2L	2.58	2.27
Q02952	A-kinase anchor protein 12	AKAP12	2.61	2.27
Q6DD88	Atlastin-3	ATL3	4.40	2.27
P12277	Creatine kinase B-type	CKB	2.84	2.26
P01033	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	3.26	2.25
Q9Y624	Junctional adhesion molecule A	F11R	4.22	2.24
P56277	Cx9C motif-containing protein 4	CMC4	1.91	2.23
O43291	Kunitz-type protease inhibitor 2	SPINT2	4.92	2.22
Q8IVF2	Protein AHNK2	AHNK2	4.88	2.22
O95749	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	GGPS1	1.36	2.22
A5PLL7	Transmembrane protein 189	TMEM189	2.50	2.18
Q9NUM4	Transmembrane protein 106B	TMEM106B	1.79	2.18
Q13586	Stromal interaction molecule 1	STIM1	3.42	2.17
O15533	Tapasin	TAPBP	2.69	2.17
Q9H936	Mitochondrial glutamate carrier 1	SLC25A22	3.66	2.15
Q9BVG9	Phosphatidylserine synthase 2	PTDSS2	2.18	2.15
Q9UBM7	7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7	2.48	2.15
P45877	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	PPIC	4.62	2.14

P11047	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	2.98	2.13
O95182	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	NDUFA7	3.06	2.13
Q9HCH5	Synaptotagmin-like protein 2	SYTL2	3.78	2.12
O15427	Monocarboxylate transporter 4	SLC16A3	4.94	2.11
P14923	Junction plakoglobin	JUP	3.65	2.11
Q8IUC4	Rhopilin-2	RHPN2	3.38	2.11
O95168	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUFB4	2.76	2.10
O95169	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	NDUFB8	2.10	2.09
Q92785	Zinc finger protein ubi-d4	DPF2	1.94	2.08
P09601	Heme oxygenase 1	HMOX1	2.89	2.05
P33527	Multidrug resistance-associated protein 1	ABCC1	4.83	2.05
Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1	1.86	2.04
O15061	Synemin	SYNM	3.09	2.03
P18084	Integrin beta-5	ITGB5	2.27	2.03
P19971	Thymidine phosphorylase	TYMP	2.49	2.02
Q13232	Nucleoside diphosphate kinase 3	NME3	1.91	2.02
Q96I20	PRKc apoptosis WT1 regulator protein	PAWR	1.63	2.02
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	CPT1A	3.64	2.01
Q9H0E2	Toll-interacting protein	TOLLIP	4.91	2.01
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	2.05	2.00
P08648	Integrin alpha-5	ITGA5	2.26	1.99
P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor	CXADR	2.71	1.99
Q96S97	Myeloid-associated differentiation marker	MYADM	3.91	1.99
P17252	Protein kinase C alpha type	PRKCA	3.57	1.99
P23141	Liver carboxylesterase 1	CES1	2.95	1.98
O15230	Laminin subunit alpha-5	LAMA5	1.70	1.98
Q15165	Serum paraoxonase/arylesterase 2	PON2	2.28	1.98
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	3.85	1.97
O95858	Tetraspanin-15	TSPAN15	2.57	1.96
Q9BRX8	Peroxiredoxin-like 2A	PRXL2A	2.44	1.96
Q658P3	Metalloreductase STEAP3	STEAP3	3.58	1.96
Q14764	Major vault protein	MVP	5.12	1.95
P61224	Ras-related protein Rap-1b	RAP1B	3.95	1.94
Q92544	Transmembrane 9 superfamily member 4	TM9SF4	3.16	1.94
Q86Y46	Keratin, type II cytoskeletal 73	KRT73	1.32	1.94
Q6BCY4	NADH-cytochrome b5 reductase 2	CYB5R2	1.68	1.93
Q14376	UDP-glucose 4-epimerase	GALE	3.62	1.93
O00214	Galectin-8	LGALS8	1.68	1.93
Q9ULH7	Myocardin-related transcription factor B	MRTFB	1.33	1.92
O76024	Wolframin	WFS1	3.09	1.92
Q9Y6M9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	NDUFB9	3.10	1.91
O95298	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	NDUFC2	1.40	1.90
Q9P2K5	Myelin expression factor 2	MYEF2	2.88	1.89
P17568	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	NDUF7	2.84	1.88
Q9NXW2	DnaJ homolog subfamily B member 12	DNAJB12	1.51	1.87
P21333	Filamin-A	FLNA	5.43	1.86
Q9H9H4	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	VPS37B	1.67	1.85
Q5BJD5	Transmembrane protein 41B	TMEM41B	2.64	1.84
P04040	Catalase	CAT	3.27	1.84
Q15599	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2	SLC9A3R2	2.63	1.83
Q14192	Four and a half LIM domains protein 2	FHL2	2.99	1.82
Q53H82	Endoribonuclease LACTB2	LACTB2	3.30	1.81
Q00013	55 kDa erythrocyte membrane protein	MPP1	2.49	1.81
P54619	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1	PRKAG1	2.05	1.80
Q969X5	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	ERGIC1	3.51	1.80
Q9H1C7	Cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein 1	CYSTM1	1.57	1.80
P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1	2.62	1.79
Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	SLC25A24	3.72	1.79
O15162	Phospholipid scramblase 1	PLSCR1	2.03	1.79
Q9BUN8	Derlin-1	DERL1	3.04	1.79
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M	2.85	1.78
Q86XZ4	Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2	SPATS2	1.43	1.78
O94919	Endonuclease domain-containing 1 protein	ENDOD1	2.88	1.77
P35914	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	HMGCL	1.35	1.77
Q8NE62	Choline dehydrogenase, mitochondrial	CHDH	3.26	1.77
O95359	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	1.48	1.74

Q9Y320	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	TMX2	3.29	1.74
Q96B11	Solute carrier family 22 member 18	SLC22A18	3.46	1.74
O15400	Syntaxin-7	STX7	4.03	1.73
P07942	Laminin subunit beta-1	LAMB1	4.20	1.72
Q9NX08	COMM domain-containing protein 8	COMMD8	2.64	1.70
Q96B97	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	SH3KBP1	1.66	1.69
Q16625	Occludin	OCLN	2.40	1.69
P46821	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	2.15	1.69
P09668	Pro-cathepsin H	CTSH	1.91	1.68
Q6DKJ4	Nucleoredoxin	NXN	2.37	1.67
P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	SGSH	2.64	1.67
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	LAMP2	5.38	1.67
Q14651	Plastin-1	PLS1	3.03	1.67
P29218	Inositol monophosphatase 1	IMPA1	1.90	1.67
Q9H2H9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	SLC38A1	1.39	1.66
O95159	Zinc finger protein-like 1	ZFPL1	3.59	1.66
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	4.72	1.66
P48509	CD151 antigen	CD151	2.33	1.65
P26006	Integrin alpha-3	ITGA3	3.88	1.63
Q13740	CD166 antigen	ALCAM	2.57	1.63
P14543	Nidogen-1	NID1	2.41	1.62
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	EHD2	3.26	1.62
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	ATP1B1	3.38	1.62
Q99816	Tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	1.32	1.61
Q14571	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	ITPR2	1.71	1.61
Q9P0J0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	NDUFA13	2.72	1.61
Q96EB6	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	SIRT1	3.25	1.61
O15118	NPC intracellular cholesterol transporter 1	NPC1	3.49	1.60
P29590	Protein PML	PML	3.06	1.59
Q9NS86	LanC-like protein 2	LANCL2	2.60	1.59
O15439	Multidrug resistance-associated protein 4	ABCC4	2.27	1.59
P08962	CD63 antigen	CD63	4.50	1.59
Q96T83	Sodium/hydrogen exchanger 7	SLC9A7	1.42	1.58
Q9Y371	Endophilin-B1	SH3GLB1	2.49	1.58
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	COX6C	3.59	1.58
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	4.20	1.57
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	3.13	1.57
Q9P0V9	Septin-10	SEPTIN10	1.64	1.57
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2	3.06	1.57
Q14061	Cytochrome c oxidase copper chaperone	COX17	2.17	1.56
Q2TAA2	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	IAH1	5.39	1.56
Q9H6S3	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	EPS8L2	2.51	1.56
P10909	Clusterin	CLU	2.64	1.56
Q6Y288	Beta-1,3-glucosyltransferase	B3GLCT	2.38	1.56
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	2.22	1.56
P23229	Integrin alpha-6	ITGA6	1.61	1.56
Q15738	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	NSDHL	4.73	1.55
Q8NBZ7	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1	UXS1	1.55	1.55
Q8NBL1	Protein O-glucosyltransferase 1	POGLUT1	2.36	1.55
Q14139	Ubiquitin conjugation factor E4 A	UBE4A	4.32	1.55
Q10471	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	GALNT2	2.58	1.54
Q96FZ7	Charged multivesicular body protein 6	CHMP6	2.28	1.54
Q9H0W9	Ester hydrolase C11orf54	C11orf54	1.70	1.54
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	2.72	1.54
Q8TAQ2	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	SMARCC2	4.07	1.54
Q9H3Z4	DnaJ homolog subfamily C member 5	DNAJC5	1.38	1.54
Q8WTV0	Scavenger receptor class B member 1	SCARB1	2.27	1.53
O00267	Transcription elongation factor SPT5	SUPT5H	4.17	1.53
P52943	Cysteine-rich protein 2	CRIP2	2.70	1.53
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1;HBA2	1.96	1.53
Q9UI09	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	NDUFA12	3.55	1.53
Q8N556	Actin filament-associated protein 1	AFAP1	2.31	1.52
P08758	Annexin A5	ANXA5	2.27	1.52
Q9NQC3	Reticulon-4	RTN4	5.82	1.52
Q10472	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	GALNT1	1.76	1.52
Q13308	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7	3.30	1.52

Q04206	Transcription factor p65	RELA	1.49	1.51
P98179	RNA-binding protein 3	RBM3	3.19	1.51
P34059	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	GALNS	2.92	1.51
Q14247	Src substrate cortactin	CTTN	3.65	1.50
Q9UK41	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	VPS28	2.36	1.50
P82675	28S ribosomal protein S5, mitochondrial	MRPS5	1.87	1.49
P11117	Lysosomal acid phosphatase	ACP2	1.33	1.47
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	RNF213	4.45	1.47
O43920	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	NDUFS5	2.35	1.46
Q7L7V1	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX32	DHX32	3.55	1.45
Q12929	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	EPS8	2.53	1.45
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B	3.41	1.43
Q8NBX0	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	SCCPDH	3.02	1.43
P30044	Peroxisome oxidoreductase, mitochondrial	PRDX5	2.96	1.43
P17900	Ganglioside GM2 activator	GM2A	2.80	1.43
O43491	Band 4.1-like protein 2	EPB41L2	3.23	1.42
P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	COX6B1	3.19	1.42
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	2.42	1.42
P09525	Annexin A4	ANXA4	2.50	1.42
O43181	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	NDUFS4	4.04	1.42
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	2.55	1.42
O75531	Barrier-to-autointegration factor	BANF1	4.08	1.41
O96013	Serine/threonine-protein kinase PAK 4	PAK4	2.48	1.41
P53004	Biliverdin reductase A	BLVRA	3.78	1.41
P60903	Protein S100-A10	S100A10	4.33	1.40
P07355	Annexin A2	ANXA2	4.27	1.40
O94760	N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1	2.54	1.40
P00533	Epidermal growth factor receptor	EGFR	3.70	1.40
O00767	Acyl-CoA desaturase	SCD	4.02	1.38
Q04941	Proteolipid protein 2	PLP2	2.71	1.38
Q969G3	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1	SMARCE1	2.24	1.38
P42126	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1	3.12	1.38
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	GNG12	3.47	1.38
Q9Y639	Neuroplastin	NPTN	2.64	1.38
Q9H3H3	UPF0696 protein C11orf68	C11orf68	1.59	1.37
Q8TCZ2	CD99 antigen-like protein 2	CD99L2	2.93	1.37
Q9UH65	Switch-associated protein 70	SWAP70	2.67	1.37
Q13636	Ras-related protein Rab-31	RAB31	2.60	1.37
Q01469	Fatty acid-binding protein 5	FABP5	2.75	1.36
Q04721	Neurogenic locus notch homolog protein 2	NOTCH2	1.53	1.36
P35579	Myosin-9	MYH9	4.51	1.36
Q96KP1	Exocyst complex component 2	EXOC2	1.39	1.36
Q86W92	Liprin-beta-1	PPFIBP1	1.32	1.36
P42229	Signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	3.09	1.35
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	5.20	1.35
Q8I2A0	Dyslexia-associated protein KIAA0319-like protein	KIAA0319L	2.22	1.35
P05556	Integrin beta-1	ITGB1	3.82	1.34
Q9BZH6	WD repeat-containing protein 11	WDR11	2.69	1.34
P55327	Tumor protein D52	TPD52	2.83	1.34
Q02818	Nucleobindin-1	NUCB1	3.14	1.34
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	4.04	1.34
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	FKBP2	4.21	1.33
O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	NDUFA4	3.41	1.31
P84095	Rho-related GTP-binding protein RhoG	RHOG	1.50	1.31
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP	3.76	1.31
P16422	Epithelial cell adhesion molecule	EPCAM	2.87	1.30
Q9NX70	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 29	MED29	1.42	1.29
P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	ATP6V0D1	2.66	1.29
P20340	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	2.90	1.29
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1	4.34	1.28
Q9NVD7	Alpha-parvin	PARVA	1.74	1.28
Q6ZSR9	Uncharacterized protein FLJ45252		2.12	1.28
P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	ATP2B1	3.09	1.27
Q724H8	Protein O-glucosyltransferase 3	POGLUT3	2.39	1.27
Q9Y490	Talin-1	TLN1	3.78	1.27

Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	2.99	1.26
Q96RU2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	USP28	2.06	1.26
Q9UM54	Unconventional myosin-VI	MYO6	3.70	1.26
P35241	Radixin	RDX	3.03	1.26
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2	3.65	1.26
Q9NZM1	Myoferlin	MYOF	3.99	1.26
Q92974	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	2.41	1.26
Q9BQE5	Apolipoprotein L2	APOL2	2.78	1.25
Q9Y394	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	DHRS7	2.54	1.25
P14927	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	UQCRB	2.78	1.24
P22681	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	CBL	2.02	1.24
Q9Y6M7	Sodium bicarbonate cotransporter 3	SLC4A7	2.38	1.24
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2	2.60	1.24
Q9UHQ9	NADH-cytochrome b5 reductase 1	CYB5R1	2.08	1.24
P61916	NPC intracellular cholesterol transporter 2	NPC2	3.22	1.24
P60033	CD81 antigen	CD81	2.22	1.23
Q12824	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1	SMARCB1	3.36	1.23
O75976	Carboxypeptidase D	CPD	3.34	1.21
Q8NC56	LEM domain-containing protein 2	LEMD2	3.82	1.21
Q96C86	m7GpppX diphosphatase	DCPS	2.15	1.21
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	2.55	1.21
P08240	Signal recognition particle receptor subunit alpha	SRPRA	1.62	1.21
Q9UQB8	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	BAIAP2	3.12	1.21
P53384	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP1	NUBP1	1.80	1.21
P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS	4.28	1.21
Q9NX76	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6	CMTM6	1.31	1.19
Q08209	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	PPP3CA	2.33	1.19
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	3.11	1.19
P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase	ACO1	1.67	1.18
P04062	Lysosomal acid glucosylceramidase	GBA	2.80	1.18
Q9NRX5	Serine incorporator 1	SERINC1	1.41	1.17
Q12965	Unconventional myosin-Ie	MYO1E	3.24	1.17
P07237	Protein disulfide-isomerase	P4HB	5.23	1.17
Q8IXB1	DnaJ homolog subfamily C member 10	DNAJC10	2.42	1.17
Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	CISD1	3.13	1.17
Q8N7H5	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	PAF1	2.83	1.17
P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2	4.50	1.17
Q96DB5	Regulator of microtubule dynamics protein 1	RMDN1	2.25	1.16
Q9HD45	Transmembrane 9 superfamily member 3	TM9SF3	2.17	1.16
Q9UHD8	Septin-9	SEPTIN9	4.58	1.16
P07305	Histone H1.0	H1FO	3.69	1.16
O60716	Catenin delta-1	CTNND1	4.23	1.16
Q6NZI2	Caveolae-associated protein 1	CAVIN1	3.63	1.15
Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	MACF1	1.79	1.14
Q8WVM0	Dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial	TFB1M	1.59	1.13
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUF51	2.80	1.13
P56192	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	MARS	2.17	1.12
Q92925	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2	SMARCD2	1.55	1.12
Q9Y6I9	Testis-expressed protein 264	TEX264	3.13	1.12
Q93052	Lipoma-preferred partner	LPP	1.86	1.12
Q03518	Antigen peptide transporter 1	TAP1	1.52	1.12
Q96BD0	Solute carrier organic anion transporter family member 4A1	SLCO4A1	3.15	1.11
P30519	Heme oxygenase 2	HMOX2	3.29	1.11
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	6.87	1.11
Q6P1M3	Lethal (2) giant larvae protein homolog 2	LLGL2	2.22	1.11
P12107	Collagen alpha-1(XI) chain	COL11A1	2.12	1.10
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4HA1	2.67	1.10
P15121	Aldo-keto reductase family 1 member B1	AKR1B1	1.95	1.10
Q86UV5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	USP48	1.33	1.10
Q9H270	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	VPS11	1.42	1.10
P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	DLAT	3.52	1.09
Q56VL3	OCIA domain-containing protein 2	OCIAD2	2.71	1.08
P01130	Low-density lipoprotein receptor	LDLR	2.45	1.08
Q93034	Cullin-5	CUL5	3.27	1.08

Q93096	Protein tyrosine phosphatase type IVA 1	PTP4A1	2.39	1.08
O15173	Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRMC2	2.85	1.08
A6NDG6	Glycerol-3-phosphate phosphatase	PGP	2.86	1.07
O60488	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	ACSL4	2.76	1.07
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2	2.22	1.06
O75438	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	NDUFB1	4.04	1.06
Q03164	Histone-lysine N-methyltransferase 2A	KMT2A	1.32	1.06
O00468	Agrin	AGRN	2.11	1.05
P63272	Transcription elongation factor SPT4	SUPT4H1	2.84	1.05
P36871	Phosphoglucomutase-1	PGM1	2.70	1.05
P40692	DNA mismatch repair protein Mlh1	MLH1	1.39	1.05
O43678	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	NDUFA2	3.40	1.05
O00560	Syntenin-1	SDCBP	3.77	1.05
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	SEC63	3.46	1.04
P51809	Vesicle-associated membrane protein 7	VAMP7	1.83	1.04
Q9HB40	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	SCPEP1	3.66	1.04
Q15149	Plectin	PLEC	2.19	1.03
Q3ZAQ7	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	VMA21	3.28	1.03
Q96KG9	N-terminal kinase-like protein	SCYL1	1.36	1.03
O60831	PRA1 family protein 2	PRAF2	3.41	1.03
P51948	CDK-activating kinase assembly factor MAT1	MNAT1	2.38	1.02
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	1.91	1.02
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2	MRC2	1.37	1.02
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21	RAB21	2.01	1.02
Q14573	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ITPR3	3.55	1.01
O75962	Triple functional domain protein	TRIO	2.10	1.01
Q9BUP3	Oxidoreductase HTATIP2	HTATIP2	3.40	1.01
P13489	Ribonuclease inhibitor	RNH1	3.22	1.01
Q00765	Receptor expression-enhancing protein 5	REEP5	1.77	1.01
Q01628	Interferon-induced transmembrane protein 3	IFITM3	2.80	1.00
Q9Y2V2	Calcium-regulated heat-stable protein 1	CARHSP1	1.53	1.00
P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	ATP1B3	3.37	-1.00
P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	ATP2B4	2.32	-1.00
Q8NBJ4	Golgi membrane protein 1	GOLM1	1.83	-1.00
Q96D53	Atypical kinase COQ8B, mitochondrial	COQ8B	3.81	-1.00
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB	5.33	-1.01
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B	3.30	-1.01
Q13451	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	FKBP5	2.94	-1.01
P36507	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	1.99	-1.01
Q13823	Nucleolar GTP-binding protein 2	GNL2	2.62	-1.01
P51003	Poly(A) polymerase alpha	PAPOLA	3.16	-1.02
Q14694	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	USP10	1.57	-1.02
Q16774	Guanylate kinase	GUK1	2.08	-1.02
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	5.21	-1.02
Q8WTT2	Nucleolar complex protein 3 homolog	NOC3L	1.95	-1.02
Q9Y3D0	Cytosolic iron-sulfur assembly component 2B	CIAO2B	3.43	-1.02
Q96PZ0	Pseudouridylate synthase 7 homolog	PUS7	1.30	-1.02
Q9HB71	Calcyclin-binding protein	CACYBP	2.86	-1.02
Q06203	Amidophosphoribosyltransferase	PPAT	1.72	-1.03
Q9HBH1	Peptide deformylase, mitochondrial	PDF	2.72	-1.03
Q15257	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	PTPA	3.10	-1.03
O43172	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	PRPF4	2.78	-1.03
Q92620	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	DHX38	2.57	-1.03
P26447	Protein S100-A4	S100A4	1.48	-1.04
Q9H5Q4	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial	TFB2M	2.72	-1.04
P16157	Ankyrin-1	ANK1	1.54	-1.05
O75153	Clustered mitochondria protein homolog	CLUH	2.77	-1.05
Q03188	Centromere protein C	CENPC	1.99	-1.05
P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	ME2	2.02	-1.05
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	2.46	-1.05
P51116	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	1.94	-1.06
P52292	Importin subunit alpha-1	KPNA2	3.62	-1.06
P13639	Elongation factor 2	EEF2	3.40	-1.06
Q9H7E9	UPF0488 protein C8orf33	C8orf33	3.67	-1.07
P21953	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	BCKDHB	2.94	-1.07
Q8WVJ2	NudC domain-containing protein 2	NUDCD2	2.48	-1.07

P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	3.05	-1.07
P04183	Thymidine kinase, cytosolic	TK1	2.63	-1.07
P10599	Thioredoxin	TXN	1.68	-1.08
Q8IZL8	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	PELP1	2.95	-1.08
Q9NR45	Sialic acid synthase	NANS	2.80	-1.09
Q9BXW7	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 5	HDHD5	2.45	-1.09
Q9NZ63	Telomere length and silencing protein 1 homolog	C9orf78	1.43	-1.09
P16949	Stathmin	STMN1	3.00	-1.09
O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	ECI2	2.32	-1.09
Q14671	Pumilio homolog 1	PUM1	1.52	-1.09
Q9HA77	Probable cysteine--tRNA ligase, mitochondrial	CARS2	2.34	-1.09
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	3.57	-1.10
Q9UKN8	General transcription factor 3C polypeptide 4	GTF3C4	2.08	-1.10
Q9P258	Protein RCC2	RCC2	3.40	-1.10
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3	3.77	-1.10
Q9H0C8	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	ILKAP	3.23	-1.11
Q9HD20	Manganese-transporting ATPase 13A1	ATP13A1	2.60	-1.11
Q9Y508	E3 ubiquitin-protein ligase RNF114	RNF114	1.41	-1.11
O95363	Phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial	FARS2	1.53	-1.11
Q9BZE4	Nucleolar GTP-binding protein 1	GTPBP4	2.77	-1.12
P00374	Dihydrofolate reductase	DHFR	3.49	-1.12
Q8NFV4	Protein ABHD11	ABHD11	3.11	-1.12
Q8IY67	Ribonucleoprotein PTB-binding 1	RAVER1	2.21	-1.12
P18583	Protein SON	SON	2.98	-1.12
Q9H2G2	STE20-like serine/threonine-protein kinase	SLK	3.36	-1.12
Q96T51	RUN and FYVE domain-containing protein 1	RUFY1	3.27	-1.12
O00268	Transcription initiation factor TFIID subunit 4	TAF4	2.19	-1.13
Q969U7	Proteasome assembly chaperone 2	PSMG2	3.88	-1.13
Q8WZA9	Immunity-related GTPase family Q protein	IRGQ	1.61	-1.13
P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	3.76	-1.13
Q9BVQ7	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1	SPATA5L1	1.50	-1.13
O14777	Kinetochore protein NDC80 homolog	NDC80	1.40	-1.13
Q5J554	Proteasome assembly chaperone 4	PSMG4	2.11	-1.14
Q92614	Unconventional myosin-XVIIIa	MYO18A	3.18	-1.14
O95235	Kinesin-like protein KIF20A	KIF20A	1.83	-1.14
P30825	High affinity cationic amino acid transporter 1	SLC7A1	2.66	-1.14
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	4.95	-1.14
Q9NYY8	FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial	FASTKD2	3.43	-1.14
P11387	DNA topoisomerase 1	TOP1	4.65	-1.14
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	2.44	-1.14
Q9UNQ2	Probable dimethyladenosine transferase	DIMT1	2.33	-1.15
P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	PPP2CA	2.68	-1.15
Q9BQ61	Telomerase RNA component interacting RNase	TRIR	1.80	-1.15
Q96G46	tRNA-dihydrouridine (47) synthase	DUS3L	2.53	-1.16
P27708	CAD protein	CAD	3.06	-1.16
O14976	Cyclin-G-associated kinase	GAK	1.56	-1.16
P21589	5'-nucleotidase	NT5E	1.90	-1.16
Q14181	DNA polymerase alpha subunit B	POLA2	1.70	-1.17
O15116	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM1	LSM1	2.06	-1.18
Q9H4A3	Serine/threonine-protein kinase WNK1	WNK1	2.06	-1.18
Q70CQ2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34	USP34	1.42	-1.18
Q9Y315	Deoxyribose-phosphate aldolase	DERA	2.05	-1.18
Q9NX18	Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial	SDHAF2	4.51	-1.19
Q9UMY1	Nucleolar protein 7	NOL7	2.67	-1.19
Q9UKF6	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	CPSF3	4.85	-1.19
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	3.21	-1.19
Q14011	Cold-inducible RNA-binding protein	CIRBP	2.85	-1.19
P61966	AP-1 complex subunit sigma-1A	AP1S1	3.17	-1.19
P53701	Cytochrome c-type heme lyase	HCCS	2.64	-1.19
Q96KQ7	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2	EHMT2	1.67	-1.19
O95297	Myelin protein zero-like protein 1	MPZL1	3.97	-1.20
P20839	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	IMPDH1	1.74	-1.20
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	DNAJA2	3.56	-1.20
Q8TEQ6	Gem-associated protein 5	GEMIN5	4.54	-1.20
Q8TF05	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 1	PPP4R1	2.48	-1.20
Q15276	Rab GTPase-binding effector protein 1	RABEP1	1.62	-1.20

P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	RRM2	2.70	-1.20
O94992	Protein HEXIM1	HEXIM1	2.19	-1.21
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1	3.29	-1.21
Q9GZR7	ATP-dependent RNA helicase DDX24	DDX24	1.70	-1.21
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	YARS	3.52	-1.21
P08579	U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	SNRNP2	2.49	-1.22
P20962	Parathyrosin	PTMS	2.10	-1.22
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	3.95	-1.22
Q9UPT8	Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	ZC3H4	2.56	-1.22
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	MIF	3.52	-1.22
P55957	BH3-interacting domain death agonist	BID	3.27	-1.23
Q8IYU8	Calcium uptake protein 2, mitochondrial	MICU2	1.67	-1.23
Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1	RAB11FIP1	2.58	-1.23
P54764	Ephrin type-A receptor 4	EPHA4	1.68	-1.23
P56559	ADP-ribosylation factor-like protein 4C	ARL4C	2.71	-1.23
Q969X6	U3 small nucleolar RNA-associated protein 4 homolog	UTP4	1.38	-1.23
Q96C90	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	PPP1R14B	1.63	-1.25
Q9BV38	WD repeat-containing protein 18	WDR18	1.76	-1.25
O60885	Bromodomain-containing protein 4	BRD4	3.65	-1.26
Q15398	Disks large-associated protein 5	DLGAP5	1.59	-1.26
Q8IYW3	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	ANKHD1	1.59	-1.26
P51648	Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2	ALDH3A2	3.95	-1.26
Q53EU6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	GPAT3	1.32	-1.26
Q9P2I0	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	CPSF2	2.98	-1.26
P29084	Transcription initiation factor IIE subunit beta	GTF2E2	1.84	-1.27
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 [Includes: Phosphoribosylamine--glycine ligase	GART	3.70	-1.27
Q5QJE6	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	DNTTIP2	2.28	-1.27
P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3	3.67	-1.27
P34896	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	SHMT1	2.10	-1.28
Q15645	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13	3.60	-1.28
O95571	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	ETHE1	1.56	-1.28
P31483	Nucleolysin TIA-1 isoform p40	TIA1	2.63	-1.28
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	5.38	-1.28
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	3.36	-1.28
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	SORD	1.96	-1.29
Q9NUU7	ATP-dependent RNA helicase DDX19A	DDX19A	2.09	-1.29
P16989	Y-box-binding protein 3	YBX3	3.42	-1.29
Q96LR5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E2	UBE2E2	1.57	-1.29
Q9UKK9	ADP-sugar pyrophosphatase	NUDT5	3.35	-1.30
Q9H814	Phosphorylated adapter RNA export protein	PHAX	2.09	-1.32
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	2.59	-1.32
Q8IVD9	NudC domain-containing protein 3	NUDCD3	1.94	-1.33
P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	SNRNPB	3.08	-1.33
O95336	6-phosphogluconolactonase	PGLS	3.98	-1.33
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	3.34	-1.33
Q96B54	Zinc finger protein 428	ZNF428	2.07	-1.33
Q96SB4	SRSF protein kinase 1	SRPK1	2.98	-1.34
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP	4.44	-1.34
Q14790	Caspase-8	CASP8	3.50	-1.34
Q15154	Pericentriolar material 1 protein	PCM1	1.55	-1.34
Q10713	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	PMPCA	3.71	-1.35
P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	5.51	-1.35
P23434	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	GCSH	3.74	-1.35
O60256	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	PRPSAP2	2.74	-1.37
Q99797	Mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	1.64	-1.37
P57772	Selenocysteine-specific elongation factor	EEFSEC	1.56	-1.38
Q9H5H4	Zinc finger protein 768	ZNF768	1.56	-1.38
Q96HQ2	CDKN2AIP N-terminal-like protein	CDKN2AIPN L	3.21	-1.38
Q5VTL8	Pre-mRNA-splicing factor 38B	PRPF38B	1.43	-1.38
P49711	Transcriptional repressor CTCF	CTCF	1.61	-1.38
P04637	Cellular tumor antigen p53	TP53	3.38	-1.40
O75347	Tubulin-specific chaperone A	TBCA	2.33	-1.40
Q8NBT2	Kinetochore protein Spc24	SPC24	2.54	-1.41
P22676	Calretinin	CALB2	2.00	-1.42
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	4.82	-1.42

Q8N543	Prolyl 3-hydroxylase OGFOD1	OGFOD1	1.82	-1.43
Q99615	DnaJ homolog subfamily C member 7	DNAJC7	2.65	-1.44
O95163	Elongator complex protein 1	ELP1	2.23	-1.44
Q9NUQ3	Gamma-taxilin	TXLNG	3.37	-1.45
O95433	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1	2.40	-1.45
P57678	Gem-associated protein 4	GEMIN4	1.82	-1.45
Q99623	Prohibitin-2	PHB2	3.19	-1.46
Q7L2Z9	Centromere protein Q	CENPQ	1.47	-1.46
P30041	Peroxiredoxin-6	PRDX6	3.66	-1.46
P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	EIF1AX	2.84	-1.46
Q9HD15	Steroid receptor RNA activator 1	SRA1	2.31	-1.46
Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	TOMM34	2.19	-1.46
P08243	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	ASNS	2.32	-1.47
Q15773	Myeloid leukemia factor 2	MLF2	1.35	-1.47
Q15654	Thyroid receptor-interacting protein 6	TRIP6	2.94	-1.47
P35232	Prohibitin	PHB	3.81	-1.48
Q9BRK5	45 kDa calcium-binding protein	SDF4	4.80	-1.48
P78330	Phosphoserine phosphatase	PSPH	2.21	-1.49
P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	2.74	-1.49
Q9NRV9	Heme-binding protein 1	HEBP1	3.50	-1.50
P17858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	PFKL	3.23	-1.50
Q9Y3C1	Nucleolar protein 16	NOP16	4.54	-1.50
P36268	Inactive glutathione hydrolase 2	GGT2	1.93	-1.51
O75794	Cell division cycle protein 123 homolog	CDC123	4.15	-1.53
Q9NPJ6	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4	MED4	3.76	-1.53
O00273	DNA fragmentation factor subunit alpha	DFFA	2.76	-1.54
P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	LONP1	4.74	-1.54
Q9Y314	Nitric oxide synthase-interacting protein	NOSIP	2.80	-1.55
P53634	Dipeptidyl peptidase 1	CTSC	3.60	-1.57
Q86X55	Histone-arginine methyltransferase CARM1	CARM1	3.99	-1.57
Q02252	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	ALDH6A1	4.24	-1.59
P25116	Proteinase-activated receptor 1	F2R	2.65	-1.59
Q9GZU8	PSME3-interacting protein	FAM192A	2.03	-1.59
Q04760	Lactoylglutathione lyase	GLO1	3.37	-1.59
P25685	DnaJ homolog subfamily B member 1	DNAJB1	3.66	-1.59
Q96HY7	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial	DHTKD1	2.57	-1.59
P32456	Guanylate-binding protein 2	GBP2	2.20	-1.60
Q8I283	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	ALDH16A1	3.16	-1.60
Q13017	Rho GTPase-activating protein 5	ARHGAP5	1.65	-1.61
Q15031	Probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial	LARS2	1.45	-1.61
Q14331	Protein FRG1	FRG1	3.09	-1.62
P06737	Glycogen phosphorylase, liver form	PYGL	2.56	-1.62
Q9BV86	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	NTMT1	3.17	-1.63
P04818	Thymidylate synthase	TYMS	2.98	-1.64
O15084	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunitA	ANKRD28	3.91	-1.64
P22570	NADPH: adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	FDXR	2.89	-1.65
Q05682	Caldesmon	CALD1	2.54	-1.65
Q01433	AMP deaminase 2	AMPD2	2.10	-1.65
Q8I2Q5	Selenoprotein H	SELENOH	3.37	-1.65
O75208	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	COQ9	2.52	-1.65
P62328	Thymosin beta-4	TMSB4X	2.88	-1.66
Q13951	Core-binding factor subunit beta	CBFB	3.43	-1.66
O00592	Podocalyxin	PODXL	3.08	-1.67
Q96HR9	Receptor expression-enhancing protein 6	REEP6	4.35	-1.67
P49354	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	FNTA	4.01	-1.69
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein	PSIP1	6.20	-1.69
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	4.79	-1.69
Q0VDF9	Heat shock 70 kDa protein 14	HSPA14	1.45	-1.69
P14209	CD99 antigen	CD99	3.30	-1.70
Q99622	Protein C10	C12orf57	2.24	-1.71
O15382	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	BCAT2	2.79	-1.71
P25490	Transcriptional repressor protein YY1	YY1	2.46	-1.72
Q96EK6	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	GNPNAT1	2.14	-1.72
Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	TUBB6	3.02	-1.73
P04156	Major prion protein	PRNP	2.20	-1.74
P04792	Heat shock protein beta-1	HSPB1	3.99	-1.74

Q722K6	Endoplasmic reticulum metallopeptidase 1	ERMP1	5.03	-1.75
P30043	Flavin reductase	BLVRB	2.66	-1.77
Q99961	Endophilin-A2	SH3GL1	2.91	-1.77
P11171	Protein 4.1	EPB41	2.46	-1.79
Q6IAN0	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	DHRS7B	1.93	-1.81
P12532	Creatine kinase U-type, mitochondrial	CKMT1A	1.50	-1.82
Q9UQR1	Zinc finger protein 148	ZNF148	2.24	-1.82
P52758	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	RIDA	1.90	-1.82
Q70E73	Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1	RAPH1	1.45	-1.83
P53985	Monocarboxylate transporter 1	SLC16A1	2.38	-1.85
O43597	Protein sprouty homolog 2	SPRY2	1.35	-1.86
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	4.67	-1.86
Q724W1	L-xylulose reductase	DCXR	3.29	-1.87
P51532	Transcription activator BRG1	SMARCA4	4.00	-1.87
Q13576	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2	2.59	-1.88
Q92896	Golgi apparatus protein 1	GLG1	3.18	-1.88
Q08174	Protocadherin-1	PCDH1	2.26	-1.89
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	4.62	-1.90
Q96RU3	Formin-binding protein 1	FBNP1	3.01	-1.90
P09488	Glutathione S-transferase Mu 1	GSTM1	4.65	-1.91
O00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	UBE2C	2.27	-1.92
Q9UIA9	Exportin-7	XPO7	3.17	-1.92
Q96IV0	Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase	NGLY1	3.56	-1.92
P04350	Tubulin beta-4A chain	TUBB4A	5.10	-1.92
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	PCK2	3.31	-1.92
P08133	Annexin A6	ANXA6	4.19	-1.93
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	GBE1	3.69	-1.93
Q9Y619	Mitochondrial ornithine transporter 1	SLC25A15	1.38	-1.94
Q9UEE9	Craniofacial development protein 1	CFDP1	3.68	-1.96
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3	3.02	-1.98
Q07812	Apoptosis regulator BAX	BAX	2.38	-1.98
Q96BK5	PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1	PINX1	2.24	-1.98
Q96T88	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1	UHRF1	2.90	-1.99
P07203	Glutathione peroxidase 1	GPX1	4.15	-1.99
Q98T22	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	DHRS4	5.29	-2.00
Q9Y2Y0	ADP-ribosylation factor-like protein 2-binding protein	ARL2BP	1.67	-2.01
P08237	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	PFKM	3.02	-2.03
Q9GZT4	Serine racemase	SRR	1.70	-2.03
O95671	Probable bifunctional dTTP/UTP pyrophosphatase/methyltransferase protein	ASMTL	3.26	-2.03
O43583	Density-regulated protein	DENR	3.46	-2.04
P52789	Hexokinase-2	HK2	2.35	-2.05
Q16799	Reticulon-1	RTN1	4.11	-2.05
Q9UJ68	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	MSRA	3.34	-2.06
O94822	E3 ubiquitin-protein ligase listerin	LTN1	1.40	-2.07
Q16222	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	UAP1	4.74	-2.07
Q9BRT9	DNA replication complex GINS protein SLD5	GINS4	2.78	-2.08
P05534	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain	HLA-A	1.78	-2.11
Q8IVL6	Prolyl 3-hydroxylase 3	P3H3	2.99	-2.11
P50151	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-10	GNG10	3.56	-2.11
P09417	Dihydropteridine reductase	QDPR	4.63	-2.12
Q9H9T3	Elongator complex protein 3	ELP3	2.76	-2.13
P35520	Cystathionine beta-synthase	CBS	4.01	-2.16
Q5JSL3	Dedicator of cytokinesis protein 11	DOCK11	2.74	-2.16
Q9C004	Protein sprouty homolog 4	SPRY4	4.58	-2.18
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	3.88	-2.19
P27144	Adenylate kinase 4, mitochondrial	AK4	4.45	-2.19
Q69YL0	Protein NCBP2AS2	NCBP2AS2	3.05	-2.19
Q96KB5	Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase	PBK	1.67	-2.20
P36969	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	GPX4	3.23	-2.20
Q14166	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	TTL12	3.17	-2.22
Q9Y248	DNA replication complex GINS protein PSF2	GINS2	2.50	-2.24
P05549	Transcription factor AP-2-alpha	TFAP2A	4.38	-2.26
Q722K8	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	GPRIN1	1.82	-2.27
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	3.44	-2.28
P13807	Glycogen [starch] synthase, muscle	GYS1	3.05	-2.30
Q96GW9	Methionine--tRNA ligase, mitochondrial	MARS2	1.69	-2.32

Q724Q2	HEAT repeat-containing protein 3	HEATR3	3.51	-2.32
Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1	4.68	-2.32
P49419	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	5.72	-2.42
P63151	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	PPP2R2A	7.92	-2.42
P23381	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	WARS	5.98	-2.42
Q16626	Male-enhanced antigen 1	MEA1	3.25	-2.43
O75828	Carbonyl reductase [NADPH] 3	CBR3	3.03	-2.45
Q15847	Adipogenesis regulatory factor	ADIRF	4.40	-2.45
O75781	Paralemmin-1	PALM	2.27	-2.47
O43824	Putative GTP-binding protein 6	GTPBP6	1.50	-2.49
Q5U5X0	Complex III assembly factor LYRM7	LYRM7	3.53	-2.50
Q92876	Kallikrein-6	KLK6	2.20	-2.50
P50453	Serpin B9	SERPINB9	3.30	-2.57
Q96MW1	Coiled-coil domain-containing protein 43	CCDC43	1.34	-2.58
Q14249	Endonuclease G, mitochondrial	ENDOG	2.03	-2.59
Q8IYS1	Peptidase M20 domain-containing protein 2	PM20D2	2.59	-2.64
P32119	Peroxisome oxidoreductin-2	PRDX2	6.17	-2.67
Q14012	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	CAMK1	1.74	-2.71
Q5T7N3	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4	KANK4	2.15	-2.71
P61225	Ras-related protein Rap-2b	RAP2B	3.95	-2.72
P0CG30	Glutathione S-transferase theta-2B	GSTT2B	5.45	-2.81
Q9UJM3	ERBB receptor feedback inhibitor 1	ERRFI1	2.62	-2.81
Q13541	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	EIF4EBP1	2.30	-2.88
Q9BV57	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	ADI1	4.40	-3.03
Q04828	Aldo-keto reductase family 1 member C1	AKR1C1	3.87	-3.08
Q9UEG4	Zinc finger protein 629	ZNF629	1.99	-3.12
Q99541	Perilipin-2	PLIN2	2.72	-3.19
P80297	Metallothionein-1X	MT1X	4.60	-3.19
O00194	Ras-related protein Rab-27B	RAB27B	4.21	-3.24
P04083	Annexin A1	ANXA1	5.64	-3.47
O95810	Caveolae-associated protein 2	CAVIN2	4.14	-3.47
Q8N684	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7	CPSF7	3.53	-3.50
Q0VAQ4	Small cell adhesion glycoprotein	SMAGP	2.16	-3.57
P04732	Metallothionein-1E	MT1E	5.42	-3.82
P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	3.94	-4.32
Q13885	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	2.73	-4.51
P02795	Metallothionein-2	MT2A	5.97	-4.52
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	4.17	-5.55

Tabla 35. Lista de procesos biológicos representados por las proteínas diferencialmente expresadas entre las células PANC-1 y MIA PaCa-2. Resultados obtenidos con el programa ClueGO 2.5.4

Término GO	Valor de p	% Genes asociados	# genes	Genes asociados encontrados
Oxidoreductase activity	3.00E-09	27.56	105	[ABCC4, ADI1, AKR1B1, AKR1C1, ALDH16A1, ALDH1A1, ALDH3A2, ALDH6A1, ALDH7A1, APOE, ASPH, ATP2B4, BCKDHB, BLVRA, BLVRB, C15orf48, CAT, CAV1, CAV2, CBR1, CBR3, CHDH, COX17, COX5B, COX6B1, COX6C, CYB5R1, CYB5R2, DCXR, DDAH1, DECR2, DHCR7, DHFR, DHRS4, DHRS7, DHRS7B, DHTKD1, DLAT, DNAJC10, DUS3L, EGFR, ETHE1, FADS2, FDXR, G6PD, GAPDH, GPX1, GPX4, HBA1, HMOX1, HMOX2, HSD17B10, HSP90AA1, HTATIP2, IDH2, IMPDH1, KMT2A, LDHB, ME2, MICAL2, MSRA, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA7, NDUFB1, NDUFB4, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC2, NDUFS1, NDUFS4, NDUFS5, NNT, NOSIP, NQO1, NSDHL, NXN, OGFOD1, P3H3, P4HA1, P4HB, PDIA3, PHGDH, PLOD2, PMPCA, PRDX2, PRDX5, PRDX6, QDPR, RRM2, SCARB1, SCCPDH, SCD, SOD2, SORD, SQOR, STEAP3, TAP1, TIMP1, TXN, UGDH, UQCRB]

Response to drug	9.08E-08	25.00	100	[ABCC1, ABCC4, ABCD1, ABCG2, ADIRF, AGRN, AK4, ANKHD1, ANXA1, ARHGEF2, ARRB1, ASNS, ATP2B4, B2M, BANF1, CA8, CACYBP, CAD, CASP8, CAT, CAV1, CAV2, CBL, CDH1, CES1, CLDN4, CLU, COL18A1, CPT1A, DCPS, DHFR, EEF2, EGFR, EHMT2, EIF4EBP1, ENDOG, EPS8, ERRF1, F2R, G6PD, GBA, GGH, GOT2, GPRIN1, GPX1, GTPBP4, HBA1, HMGA2, HMOX1, HSD17B10, HSP90AA1, ICAM1, ITGA2, ITGA3, ITPR2, JUP, KMT2A, MIF, MT2A, MYO6, NDUFA2, NPC1, NQO1, NUCB1, PAWR, PBK, PCK2, PLIN2, PNP, PPAT, PPP1R14A, PPP2R2A, PPP3CA, PRAF2, PRDX2, PRDX5, PRNP, PRPF38B, PSAP, QDPR, RANBP1, RAP1B, RELA, S100A10, SDF4, SIRT1, SLC22A18, SLC25A15, SLC25A22, SLC25A24, SLC38A1, SLC7A1, SORD, SRR, TIMP1, TOP1, TP53, TPI1, TXN, TYMS]
Chemical homeostasis	4.68E-07	24.79	90	[ABCD1, ABCG2, ACO1, AKR1B1, AKR1C1, ANXA2, ANXA5, ANXA6, APOE, ARRB1, ATP13A1, ATP1B1, ATP1B3, ATP2A2, ATP2B1, ATP2B4, ATP6V0D1, B2M, BANF1, BAX, CALB2, CAV1, CAV2, CES1, CKB, CLDN4, CLU, CTSH, DCXR, DHRS4, EGFR, EHD1, ENDOG, F2R, FABP5, FHL1, GBA, GPRIN1, HEXIM1, HK2, HMOX1, HMOX2, ICAM1, ITGAV, ITPR2, ITPR3, LDLR, MICU2, MT1E, MT1X, MT2A, NNT, NPC1, NPC2, NPTN, NUBP1, PAWR, PCK2, PFKM, PLP2, PML, PMPCA, PPP3CA, PRDX2, PRKCA, PRNP, PSAP, PYGL, RTN4, SCARB1, SFN, SIRT1, SLC12A7, SLC16A1, SLC4A7, SLC9A7, SMAD3, SMARCA4, SMARCB1, SOD2, STEAP3, STIM1, STMN1, SWAP70, SYTL2, TIMP1, TMSB4X, TPP1, WFS1, WNK1]
Inorganic ion transmembrane transport	6.74E-06	26.15	68	[ABCC4, ACTN4, AHNAK, ANXA2, ANXA5, ANXA6, ARL2BP, ATP13A1, ATP1B1, ATP1B3, ATP2A2, ATP2B1, ATP2B4, ATP6V0D1, BAX, C15orf48, CAV1, CAV2, CD63, CLDN4, CLU, COX17, COX5B, COX6B1, COX6C, CUL5, CXADR, DCXR, DENR, EHD2, F2R, FHL1, FLNA, G6PD, GPRIN1, HSPA2, ITGAV, ITPR2, ITPR3, MICU2, NDUFA4, NNT, NQO1, PAWR, PGP, PHB, PHB2, PMPCA, PRDX2, PRKCA, PRNP, PRPF38B, PSAP, SLC12A7, SLC22A18, SLC26A2, SLC38A1, SLC4A7, SLC9A7, SQSTM1, STEAP3, STIM1, STOM, STX7, SYTL2, TMSB4X, VAMP8, WNK1]
Cofactor catabolic process	9.61E-06	53.13	17	[ABCD1, ACOT7, BLVRA, BLVRB, CAT, CBR3, CES1, GGT2, GPX1, HBA1, HMOX1, HMOX2, NNT, PRDX2, PRDX5, PRDX6, TIMP1]
Cell migration	2.46E-05	24.24	119	[ABCC1, ACTN4, AKT2, ANKHD1, ANXA1, ANXA6, APOE, ARHGEF2, ATP1B1, ATP1B3, BAX, BRD4, C1QBP, CACYBP, CAV1, CAV2, CAVIN3, CD151, CD63, CD81, CD99L2, CDH1, CEND1, CLU, COL18A1, CTNND1, CTSH, CTTN, CXADR, DCPS, EGFR, ELP1, ELP3, EPCAM, EPHA4, EPS8, F11R, F2R, FLNA, FSCN1, GLG1, GPX1, GPX4, GTPBP4, HEXIM1, HMGCL, HMOX1, HSPB1, ICAM1, IDH2, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB5, JUP, L1CAM, LAMA5, LAMB1, LAMC1, LGALS8, LLGL2, MACF1, MAP1B, MARS, MIF, MPP1, MYADM, MYH9, MYO18A, MYO1E, PADI2, PAK4, PARD6B, PARVA, PBK, PCM1, PDLIM1, PLP2, PML, PMPCA, PODXL, PPP3CA, PRKCA, PRPF38B, PTK7, PTP4A1, PYCARD, RAP2B, RCC2, RDX, RHOG, RTN4, S100A3, SCARB1, SDCBP, SEMA4B, SGSH, SH3KBP1, SHTN1, SIRT1, SLC16A1, SLC16A3, SLC9A3R2, SLK, SMAD3, SOD2, SPRY2, STAT5A, STRAP, SWAP70, TIMP1, TMSB4X, TPI1, TPP1, TRIP6, WNK1]

Triglyceride metabolic process	3.20E-05	48.28	14	[ACSL4, APOE, CAT, CAV1, CAV2, CPT1A, FABP5, GPAT3, GPX1, LDLR, PCK2, PMPCA, SCARB1, SIRT1]
Import into cell	5.30E-05	25.65	69	[ABCD1, ACTN4, AKT2, ANXA2, AP1S1, APOE, ARRB1, ATP1B1, ATP1B3, ATP2B4, B2M, BRD4, CAV1, CAV2, CBL, CD151, CD63, CD81, CLU, CTTN, CXADR, DENR, EGFR, EHD1, EHD2, EHD4, FNBP1, GAK, HBA1, HEXIM1, HSP90AA1, HSPG2, HYOU1, IGF2R, ITGA2, ITGB1, LDLR, LGALS3BP, MFGE8, MRC2, MYH9, MYO1E, MYO6, NDUFA2, NPC1, PLP2, PMPCA, PPP3CA, PRDX2, PRNP, PRPF38B, PYCARD, RAB21, RAB27B, RAB31, RABEP1, RUFY1, SCARB1, SDCBP, SH3GL1, SH3KBP1, SLC12A7, SLC38A1, SLC7A1, SLC9A7, TSG101, VAMP7, VPS28, WNK1]
Protein localization to cell periphery	6.41E-05	29.22	45	[ABCD1, AGR2, AKR1B1, AKT2, ANK1, ANPEP, ANXA2, ATP1B1, ATP1B3, CAV1, CAV2, CD81, CDH1, EGFR, EHD2, EPB41, EPB41L2, F11R, FLNA, GAK, GPRIN1, ITGA3, ITGB1, JUP, KRT18, LAMA5, MACF1, MYADM, NUBP1, PALM, PLS1, PRDX2, PRNP, RAB31, RABEP1, RDX, RHOG, S100A10, SQSTM1, STX7, SYTL2, TAP1, TSPAN15, VAMP7, VAMP8]
Cell-cell adhesion	8.05E-05	25.50	64	[ALCAM, ANPEP, ANXA1, ANXA2, BAIAP2, BAIAP2L1, CALB2, CAV1, CAV2, CAVIN3, CBFB, CD81, CDH1, CLDN4, CTNND1, CXADR, DHRS4, EGFR, EPCAM, FLNA, GTPBP4, HLA-A, HMGCL, HSPB1, ICAM1, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB5, JUP, KRT18, L1CAM, LAMB1, MPP1, MYADM, MYH9, NEU1, NPTN, NT5E, PAK4, PAPOLA, PARVA, PAWR, PCDH1, PDE5A, PDLIM1, PNP, PODXL, PPP3CA, PRDX2, PRKCA, PRNP, PYCARD, RAP2B, RDX, RELA, SCYL1, SPINT2, SWAP70, TIMP1, TLN1, TPP1, WNK1]
Oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor	8.41E-05	41.30	19	[AKR1C1, CBR1, DCXR, DHRS4, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA7, NDUFB1, NDUFB4, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC2, NDUFS1, NDUFS4, NDUFS5, NQO1]
Extracellular structure organization	8.92E-05	29.32	39	[AGRN, ANXA2, APOE, CDH1, CES1, COL11A1, COL18A1, F11R, FSCN1, HSPG2, ICAM1, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB5, LAMA5, LAMB1, LAMC1, MYO1E, NID1, P4HA1, P4HB, PLOD2, PLP2, PMPCA, PPP3CA, PRKCA, SCARB1, SDCBP, SMAD3, SPINT2, TIMP1, TLN1, TPP1, TSG101, VWA1]
Lipid localization	9.13E-05	30.40	38	[ABCC1, ABCC4, ABCD1, ACSL4, AKR1C1, AKT2, ANXA1, ANXA2, APOE, APOL2, CAV1, CAV2, CES1, CLU, CPT1A, EHD1, GM2A, GOT2, HEBP1, ITGAV, LDLR, MIF, NME4, NPC1, NPC2, PHGDH, PLIN2, PLSCR1, PMPCA, PRDX2, PSAP, SCARB1, SCRIN1, SIRT1, SLCO4A1, SYTL2, TPP1, VAMP7]

Tabla 36. Resultados de viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 1. Correspondiente a Figura 34

[6AN]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.1	-1.00	0.428	0.513	0.834	83.4	5.3
1	0.00	0.477	0.555	0.858	85.8	8.8
5	0.70	0.419	0.463	0.906	90.6	7.9
50	1.70	0.260	0.432	0.603	60.3	9.3
200	2.30	0.214	0.541	0.395	39.5	3.8
400	2.60	0.150	0.494	0.304	30.4	2.9
700	2.85	0.134	0.515	0.260	26.0	6.4
1000	3.00	0.089	0.532	0.168	16.8	4.2
5000	3.70	0.032	0.447	0.071	7.1	1.1
7000	3.85	0.016	0.243	0.066	6.6	1.8

Tabla 37. Resultados de viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 2. Correspondiente a Figura 35

[6AN]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.1	-1.00	0.453	0.467	0.969	96.9	7.2
1	0.00	0.482	0.515	0.935	93.5	8.4
5	0.70	0.452	0.503	0.899	89.9	3.5
50	1.70	0.285	0.511	0.557	55.7	5.5
200	2.30	0.268	0.534	0.502	50.2	7.4
400	2.60	0.174	0.539	0.323	32.3	4.3
700	2.85	0.139	0.550	0.252	25.2	2.4
1000	3.00	0.107	0.572	0.187	18.7	3.8
5000	3.70	0.040	0.550	0.073	7.3	1.1
7000	3.85	0.021	0.527	0.040	4.0	0.9

Tabla 38. Resultados de viabilidad de las células PANC-1 tratadas con 6AN. Réplica 3. Correspondiente a Figura 36

[6AN]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.1	-1.00	0.218	0.208	1.051	105.1	3.9
1	0.00	0.204	0.225	0.907	90.7	13.0
5	0.70	0.210	0.232	0.905	90.5	12.6
50	1.70	0.147	0.221	0.665	66.5	1.8
200	2.30	0.100	0.228	0.437	43.7	5.3
400	2.60	0.089	0.253	0.350	35.0	2.0
700	2.85	0.065	0.264	0.247	24.7	1.0
1000	3.00	0.057	0.242	0.236	23.6	0.6
5000	3.70	0.018	0.201	0.087	8.7	2.5

Tabla 39. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con el fármaco 6AN. Réplica 1. Correspondiente a la Figura 37

[6AN]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.1	-1.00	1.085	1.142	0.950	95.007	4.391
1	0.00	1.272	1.354	0.939	93.945	5.073
5	0.70	1.059	1.095	0.968	96.787	4.625
50	1.70	0.665	1.125	0.591	59.099	4.435
200	2.30	0.617	1.426	0.433	43.278	3.810
400	2.60	0.590	1.369	0.431	43.121	2.174
700	2.85	0.457	1.133	0.403	40.347	6.284
1000	3.00	0.496	1.262	0.393	39.303	2.689
5000	3.70	0.233	0.858	0.272	27.184	2.025
7000	3.85	0.142	0.507	0.280	28.008	5.184

Tabla 40. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con el fármaco 6AN. Réplica 2. Correspondiente a la Figura 38

[6AN]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.1	-1.00	1.166	1.094	1.066	106.6	6.6
1	0.00	1.140	1.130	1.009	100.9	11.1
5	0.70	1.142	1.180	0.968	96.8	11.4
50	1.70	0.763	1.360	0.561	56.1	3.1
200	2.30	0.562	1.200	0.469	46.9	5.0
400	2.60	0.522	1.158	0.450	45.0	1.4
700	2.85	0.532	1.296	0.411	41.1	4.9
1000	3.00	0.619	1.419	0.436	43.6	3.5
5000	3.70	0.294	1.313	0.224	22.4	3.1
7000	3.85	0.224	1.520	0.148	14.8	2.6

Tabla 41. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con el fármaco 6AN. Réplica 3. Correspondiente a Figura 39

[6AN]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.1	-1.00	0.547	0.494	1.108	110.8	1.3
1	0.00	0.481	0.491	0.980	98.0	7.8
5	0.70	0.475	0.507	0.938	93.8	7.1
50	1.70	0.317	0.517	0.613	61.3	4.1
200	2.30	0.206	0.498	0.413	41.3	5.7
400	2.60	0.215	0.538	0.399	39.9	2.5
700	2.85	0.200	0.531	0.376	37.6	2.5
1000	3.00	0.183	0.504	0.363	36.3	3.0
5000	3.70	0.084	0.344	0.245	24.5	4.3

Tabla 42. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con metformina. Réplica 1. Correspondiente a Figura 40

[Metformina]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
2.34	0.37	0.209	0.270	0.773	77.3	9.3
4.7	0.67	0.188	0.254	0.741	74.1	5.3
9.4	0.97	0.171	0.245	0.699	69.9	8.5
18.8	1.27	0.109	0.259	0.421	42.1	2.6
37.5	1.57	0.052	0.261	0.199	19.9	2.8
75	1.88	0.017	0.257	0.066	6.6	1.5
150	2.18	-0.005	0.230	-0.023	-2.3	-0.7

Tabla 43. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con metformina. Réplica 2. Correspondiente a Figura 41

[Metformina]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
2.34	0.37	0.684	0.879	0.778	77.9	4.4
4.7	0.67	0.625	0.943	0.663	66.3	4.0
9.4	0.97	0.534	0.869	0.614	61.4	2.1
18.8	1.27	0.317	0.884	0.358	35.9	3.5
37.5	1.57	0.126	0.845	0.149	14.9	0.8
75	1.88	0.074	0.865	0.085	8.6	1.3
150	2.18	0.044	1.083	0.040	4.0	5.4

Tabla 44. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con metformina. Réplica 3. Correspondiente a Figura 42

[Metformina]/ μM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
2.34	0.37	1.307	1.697	0.770	77.0	5.9
4.7	0.67	1.258	1.543	0.814	81.5	5.2
9.4	0.97	1.048	1.597	0.656	65.6	6.2
18.8	1.27	0.737	1.582	0.465	46.6	3.4
37.5	1.57	0.464	1.487	0.312	31.2	1.6
75	1.88	0.238	1.377	0.172	17.3	2.2
150	2.18	0.097	1.523	0.064	6.4	1.2

Tabla 45. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG. Réplica 1. Correspondiente a Figura 43

[2DG]/mM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.2	-0.81	1.038	1.066	0.973	97.3	2.3
0.3	-0.51	0.843	0.889	0.949	94.9	6.7
0.9	-0.03	0.864	0.905	0.955	95.5	6.3
2.5	0.40	0.729	0.904	0.806	80.6	8.6
5.0	0.70	0.599	0.891	0.672	67.2	6.3
10.0	1.00	0.447	0.892	0.501	50.1	3.5
40.0	1.60	0.218	0.968	0.226	22.6	1.2
80.0	1.90	0.194	0.992	0.195	19.5	0.8
160.0	2.20	0.143	0.885	0.161	16.1	0.8

Tabla 46. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG. Réplica 2. Correspondiente a Figura 44

[2DG]/mM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.2	-0.81	1.319	1.348	0.979	97.9	6.1
0.3	-0.51	1.322	1.423	0.929	92.9	5.1
0.9	-0.03	1.337	1.437	0.931	93.1	4.6
2.5	0.40	1.118	1.449	0.772	77.2	3.6
5.0	0.70	1.007	1.430	0.704	70.4	6.4
10.0	1.00	0.803	1.393	0.576	57.6	5.0
20.0	1.30	0.625	1.423	0.439	43.9	2.2
40.0	1.60	0.502	1.526	0.329	32.9	1.8
80.0	1.90	0.364	1.513	0.241	24.1	4.2
160.0	2.20	0.273	1.436	0.190	19.0	2.2

Tabla 47. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG. Réplica 3. Correspondiente a Figura 45

[2DG]/mM	Log[]	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.2	-0.81	0.620	0.649	0.956	95.6	7.7
0.3	-0.51	0.655	0.616	1.063	106.3	4.3
0.9	-0.03	0.612	0.626	0.977	97.7	14.1
2.5	0.40	0.521	0.647	0.806	80.6	5.5
5.0	0.70	0.506	0.674	0.751	75.1	8.8
10.0	1.00	0.364	0.678	0.537	53.7	5.0
20.0	1.30	0.297	0.671	0.443	44.3	4.0
40.0	1.60	0.256	0.678	0.378	37.8	3.7
80.0	1.90	0.207	0.685	0.302	30.2	4.5
160.0	2.20	0.146	0.733	0.199	19.9	2.6

Tabla 48. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic en combinación. Réplica 1. Correspondiente a Figura 46

Combinación	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25 (CI50)	0.775	0.959	0.808	80.8	7.6
0.5 (CI50)	0.470	0.889	0.528	52.8	5.3
1 (CI50)	0.307	0.881	0.348	34.8	1.1
2 (CI50)	0.118	1.069	0.110	11.0	3.5
4 (CI50)	0.067	0.871	0.077	7.7	0.5

Tabla 49. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con Stattic de manera individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 46

Stattic	T	C	T/C	% Viabilidad	S (%)
0.25 (CI50)	0.750	0.861	0.871	87.1	5.6
0.5 (CI50)	0.682	0.850	0.802	80.2	5.8
1 (CI50)	0.389	0.889	0.438	43.8	2.7
2 (CI50)	0.062	0.915	0.068	6.8	0.5
4 (CI50)	0.051	0.920	0.055	5.5	0.6

Tabla 50. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG de manera individual. Réplica 1. Correspondiente a Figura 46

2DG	T	C	T/C	%Viabilidad	S (%)
0.25 (CI50)	0.765	0.941	0.813	81.3	6.6
0.5 (CI50)	0.674	0.915	0.736	73.6	9.5
1 (CI50)	0.475	0.922	0.515	51.5	3.8
2 (CI50)	0.326	0.886	0.368	36.8	1.8
4 (CI50)	0.254	0.930	0.273	27.3	2.7

Tabla 51. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic en combinación. Réplica 2. Correspondiente a Figura 47

Combinación	T	C	T/C	%Viabilidad	S (%)
0.25 (CI50)	0.877	1.043	0.840	84.0	7.7
0.5 (CI50)	0.527	0.954	0.553	55.3	2.4
1 (CI50)	0.323	0.859	0.375	37.5	2.4
2 (CI50)	0.081	0.871	0.093	9.3	1.2
4 (CI50)	0.072	0.879	0.082	8.2	0.6

Tabla 52. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con Stattic de manera individual. Réplica 2. Correspondiente a Figura 47

Stattic	T	C	T/C	%Viabilidad	S (%)
0.25 (CI50)	0.825	0.947	0.871	87.1	5.3
0.5 (CI50)	0.667	0.891	0.748	74.8	1.1
1 (CI50)	0.457	0.878	0.521	52.1	4.2
2 (CI50)	0.070	0.899	0.078	7.8	1.0
4 (CI50)	0.060	0.856	0.070	7.0	0.5

Tabla 53. Resultados de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG de manera individual. Réplica 2. Correspondiente a Figura 47

2DG	T	C	T/C	%Viabilidad	S (%)
0.25 (CI50)	0.747	0.864	0.864	86.4	6.1
0.5 (CI50)	0.649	0.869	0.747	74.7	2.5
1 (CI50)	0.473	0.922	0.513	51.3	6.3
2 (CI50)	0.469	1.174	0.399	39.9	4.2
4 (CI50)	0.272	0.976	0.279	27.9	2.1

Tabla 54. Análisis de índice de combinación a partir de la curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (GDC-0941) en combinación. Réplica 1. Correspondiente a Figura 20

CI50	Concentración	Índice de combinación	Efecto
0.25	GDC-0941 (450.3 nM) + AZD6244 (83.45 nM)	0.386613	Sinergismo
0.50	GDC-0941 (900.6 nM) + AZD6244 (166.9 nM)	0.267017	Sinergismo
1.00	GDC-0941 (1801.2 nM) + AZD6244 (333.8 nM)	0.38334	Sinergismo
2.00	GDC-0941 (3602.4 nM) + AZD6244 (667.6 nM)	0.1833	Sinergismo
4.00	GDC-0941 (7204.8 nM) + AZD6244 (1335.2 nM)	0.3633	Sinergismo

Tabla 55. Análisis de índice de combinación a partir de la curva de viabilidad de células MIA PaCa-2 tratadas con inhibidor de MEK (AZD6244) y de PI3K (GDC-0941) en combinación. Réplica 2. Correspondiente a Figura 21

CI50	Concentración	Índice de combinación	Efecto
0.25	GDC-0941 (450.3 nM) + AZD6244 (83.45 nM)	0.280554	Sinergismo
0.50	GDC-0941 (900.6 nM) + AZD6244 (166.9 nM)	0.196355	Sinergismo
1.00	GDC-0941 (1801.2 nM) + AZD6244 (333.8 nM)	0.372916	Sinergismo
2.00	GDC-0941 (3602.4 nM) + AZD6244 (667.6 nM)	0.183299	Sinergismo
4.00	GDC-0941 (7204.8 nM) + AZD6244 (1335.2 nM)	0.363299	Sinergismo

Tablas de análisis estadístico

Tabla 56. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual en combinación con GDC-0941 de concentración fija. Réplica 1. GDC-0941 vs. Combinación. Correspondiente a Figura 22

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 1 nM]	4.4	No	0.2521
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 10 nM]	11	Sí	0.0018
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 100 nM]	15	Sí	0.0001
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 1000 nM]	21	Sí	0.0001
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 10000 nM]	31	Sí	0.0001

Tabla 57. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 individual en combinación con GDC-0941 de concentración fija. Réplica 2. GDC-0941 vs. Combinación. Correspondiente a Figura 23

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 1 nM]	0.6	No	0.9989
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 10 nM]	2.4	No	0.7978
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 100 nM]	12	Sí	0.0018
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 1000 nM]	26	Sí	0.0001
GDC-0941 2 μ M vs. [GDC-0941 2 μ M + AZD6244 10000 nM]	23	Sí	0.0001

Tabla 58. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 1. Stattic vs. Combinación. Correspondiente a Figura 27

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1 nM]	7.7	No	0.5186
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10 nM]	12	No	0.169
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 100 nM]	8.4	No	0.4428
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1000 nM]	8.5	No	0.4324
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10000 nM]	7.6	No	0.5299

Tabla 59. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 1. AZD6244 vs. Combinación. Correspondiente a Figura 27

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
AZD6244 1 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1 nM]	36.6	Sí	0.0118
AZD6244 10 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10 nM]	41.1	Sí	0.0081
AZD6244 100 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 100 nM]	40.4	Sí	0.0028
AZD6244 1000 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1000 nM]	34.1	Sí	0.0118
AZD6244 10000 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10000 nM]	33.3	Sí	0.0118

Tabla 60. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 2. Stattic vs. Combinación. Correspondiente a Figura 28

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1 nM]	1.1	No	0.9997
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10 nM]	9.3	No	0.3816
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 100 nM]	6.7	No	0.6593
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1000 nM]	9.8	No	0.3377
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10000 nM]	17	Sí	0.0371

Tabla 61. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con AZD6244 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 2. AZD6244 vs. Combinación. Correspondiente a Figura 28

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
AZD6244 1 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1 nM]	36	Sí	0.0076
AZD6244 10 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10 nM]	44	Sí	0.0076
AZD6244 100 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 100 nM]	39	Sí	0.0037
AZD6244 1000 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 1000 nM]	40	Sí	0.0051
AZD6244 10000 nM uM vs. [Stattic 2.2 μ M + AZD6244 10000 nM]	34	Sí	0.0076

Tabla 62. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 1. Stattic vs. Combinación. Correspondiente a Figura 29

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 100 nM]	25	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 800 nM]	45	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 2000 nM]	48	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 5000 nM]	51	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 10000 nM]	53	Sí	0.0001

Tabla 63. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 1. GDC-0941 vs. Combinación. Correspondiente a Figura 29

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
GDC-0941 100 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 100 nM]	60	Sí	0.0023
GDC-0941 800 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 800 nM]	38	Sí	0.0053
GDC-0941 2000 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 2000 nM]	35	Sí	0.0053
GDC-0941 5000 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 5000 nM]	29	Sí	0.0023
GDC-0941 10000 nM vs. [Stattic 2.2 μ M + GDC-0941 10000 nM]	38	Sí	0.0016

Tabla 64. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 2. Stattic vs. Combinación. Correspondiente a Figura 30

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 100 nM]	16	Sí	0.0072
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 800 nM]	34	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 2000 nM]	41	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 5000 nM]	51	Sí	0.0001
Stattic 2.2 μ M vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 10000 nM]	50	Sí	0.0001

Tabla 65. Análisis estadístico de la curva de viabilidad de células PANC-1 tratadas con GDC-0941 de manera individual y en combinación con Stattic de concentración constante. Réplica 2. GDC-0941 vs. Combinación. Correspondiente a Figura 30

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de P ajustado
GDC-0941 100 nM vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 100 nM]	40	Sí	0.0003
GDC-0941 800 nM vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 800 nM]	44	Sí	0.0066
GDC-0941 2000 nM vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 2000 nM]	23	Sí	0.0066
GDC-0941 5000 nM vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 5000 nM]	26	Sí	0.0066
GDC-0941 10000 nM vs. [Stattic 2.2 uM + GDC-0941 10000 nM]	24	Sí	0.0088

Tabla 66. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic de manera individual y en combinación. Réplica 1. Stattic vs. Combinación. Correspondiente a Figura 46

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de P ajustado
Stattic 550 nM vs. [Stattic 550 nM + 2DG 3.25 mM]	6.3	No	0.3118
Stattic 1100 nM vs. [Stattic 1100 nM + 2DG 6.50 mM]	27	Sí	0.0189
Stattic 2200 nM vs. [Stattic 2200 nM + 2DG 13.0 mM]	8.9	Sí	0.0230
Stattic 4400 nM vs. [Stattic 4400 nM + 2DG 26.0 mM]	-4.2	No	0.2042
Stattic 8800 nM vs. [Stattic 8800 nM + 2DG 52.0 mM]	-2.2	Sí	0.0230

Tabla 67. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic de manera individual y en combinación. Réplica 1. 2DG vs. Combinación. Correspondiente a Figura 46

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
2DG 3.25 mM vs. [Stattic 550 nM + 2DG 3.25 mM]	0.51	No	0.9343
2DG 6.50 mM vs. [Stattic 1100 nM + 2DG 6.50 mM]	21	No	0.0576
2DG 13.0 mM vs. [Stattic 2200 nM + 2DG 13.0 mM]	17	Sí	0.0059
2DG 26.0 mM vs. [Stattic 4400 nM + 2DG 26.0 mM]	26	Sí	0.0014
2DG 52.0 mM vs. [Stattic 8800 nM + 2DG 52.0 mM]	20	Sí	0.0012

Tabla 68. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic de manera individual y en combinación. Réplica 2. Stattic vs. Combinación. Correspondiente a Figura 47

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de p ajustado
Stattic 550 nM vs. [Stattic 550 nM + 2DG 3.25 mM]	3.1	No	0.5971
Stattic 1100 nM vs. [Stattic 1100 nM + 2DG 6.50 mM]	20	Sí	0.0010
Stattic 2200 nM vs. [Stattic 2200 nM + 2DG 13.0 mM]	15	Sí	0.0262
Stattic 4400 nM vs. [Stattic 4400 nM + 2DG 26.0 mM]	-1.5	No	0.2781
Stattic 8800 nM vs. [Stattic 8800 nM + 2DG 52.0 mM]	-1.2	No	0.1914

Tabla 69. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad (método violeta cristal) de células PANC-1 tratadas con 2DG y Stattic de manera individual y en combinación. Réplica 2. 2DG vs. Combinación. Correspondiente a Figura 47

Comparación	Diferencia de promedios	Diferencia significativa	Valor de P ajustado
2DG 3.25 mM vs. [Stattic 550 nM + 2DG 3.25 mM]	2.4	No	0.6933
2DG 6.50 mM vs. [Stattic 1100 nM + 2DG 6.50 mM]	19	Sí	0.0019
2DG 13.0 mM vs. [Stattic 2200 nM + 2DG 13.0 mM]	14	Sí	0.0477
2DG 26.0 mM vs. [Stattic 4400 nM + 2DG 26.0 mM]	31	Sí	0.0010
2DG 52.0 mM vs. [Stattic 8800 nM + 2DG 52.0 mM]	20	Sí	0.0005