

**ESTUDIO
DE LOS MECANISMOS DE
REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA
ASOCIADA A RESISTENCIA
A MULTIDROGAS 4 (MRP4)
Y SUS IMPLICANCIAS EN
ADENOCARCINOMAS
DUCTALES PANCREÁTICOS**

**PRESENTADO POR:
FARMACÉUTICO
ALEJANDRO ENRIQUE CAROZZO**

**DIRECTOR: PROF. DR. CARLOS DAVIO
DIRECTORA ADJUNTA: DRA. NATALIA FERNÁNDEZ**

**LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA
Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

**CÁTEDRA DE QUÍMICA MEDICINAL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
FARMACOLÓGICAS - ININFA - UBA- CONICET**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

ARGENTINA 2015

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a todos aquellos que me han acompañado y apoyado, haciendo posible la realización de este trabajo:

A la Universidad de Buenos Aires, el CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por su apoyo a través de las becas y los proyectos financiados.

A la Cátedra de Química Medicinal, al Ibyme y al ININFA, por brindarme un cálido y armonioso lugar de trabajo.

A Davio, por darme la oportunidad de hacer y disfrutar de la ciencia. Por rescatarme incontables veces, por tu apoyo incondicional, por motivarme y orientarme siempre. Por generar y compartir un espacio especial, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Nati, por enseñarme a trabajar y a pensar. Por estar siempre, sin importar las circunstancias. Por hacerme crecer como persona y hacerme enfrentar mis limitaciones, en vez de evadirlas. Por ser una amiga incondicional.

A Cari, por guiarme desde el comienzo de este camino. Por la mirada aguda, el apoyo constante y la eterna paciencia y armonía.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio. Por ser mi familia. Porque el sólo hecho de ir al laboratorio y estar con ustedes puso una sonrisa constante en mi cara los últimos cinco años. Por quererme, aceptarme y soportarme. Los quiero.

A Dani, por ser especial.

A los laboratorios de Beta, Lili, Franchi y Vatta. Por recibirme siempre con las puertas y los brazos abiertos. Por hacerme sentir que somos un único gran grupo.

A Patto, por recibirme junto a Carlos como a un hijo y por compartir conmigo tu arte.

A mi familia y amigos, por apoyarme en todas las decisiones y entender mis ausencias. Por compartir las alegrías de mis logros y las tristezas de mis frustraciones. Por estar siempre.

Publicaciones

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis se encuentran en la siguiente publicación:

Carozzo, A.; Diez, F.; Gomez, N.; Cabrera, M.; Shayo, C.; Davio, C.; Fernandez, N. (2015). "Dual Role of cAMP in the Transcriptional Regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4) in Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines." *PLoS One* **10**(3): e0120651. doi: 10.1371.

Durante el desarrollo de mi carrera de doctorado he colaborado con diversos proyectos de investigación, parte de los cuales han dado lugar a la siguiente publicación:

Ventimiglia, M. S.; Najenson, A. C.; Perazzo, J. C.; **Carozzo, A.**; Vatta, M. S.; Davio, C. A.; Bianciotti, L. G. (2015). "Blockade of Multidrug Resistance Associated Proteins Aggravates Acute Pancreatitis and Blunts Atrial Natriuretic Factor Beneficial Effect in Rats: Role of Mrp4/Abcc4." *Mol Med.* **21**(1):58.67. doi: 10.2119.

Resumen

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de tumores más letales, representando la cuarta causa de muerte relacionada con cáncer en los países desarrollados. Los adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC), son el subtipo histológico más frecuente, comprendiendo más del 90% de los casos de este tipo de neoplasias. Estos tumores son altamente invasivos y frecuentemente presentan metástasis a distancia, incluso en etapas tempranas de la enfermedad. Esta elevada agresividad se refleja en su pobre prognosis, con una tasa de supervivencia media menor al 5%. Actualmente, la intervención quirúrgica representa la única opción de tratamiento para PDAC, sin embargo, el 80% de los pacientes se consideran inoperables al momento de su diagnóstico. Las quimioterapias y las quimioradioterapias disponibles, con 5-FU, gemcitabina, cisplatino o erlotinib, han demostrado producir una reducción de los tumores y un aumento en la prognosis, pero sus efectos son aún muy limitados.

Por lo tanto, el desarrollo de nuevos biomarcadores de detección temprana y la validación de nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de PDAC es altamente necesario, requiriendo una aproximación tanto a nivel de investigación básica como clínica.

Con el avance del proyecto genoma humano y mediante los esfuerzos en la secuenciación del genoma de diferentes tipos de tumores, recientemente, se ha demostrado que distintos componentes de la cascada del AMPc se encuentran frecuentemente alterados en PDAC, incluso en sus lesiones previas, haciendo promisorio el estudio de los mismos en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

Los resultados emergentes del presente trabajo de tesis demuestran la existencia del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 en líneas celulares de PDAC, y la implicancia de la actividad de este transportador en la regulación de los niveles de este segundo mensajero. Más aún, junto a otros reportes bibliográficos, indican una correlación entre una elevada expresión de MRP4 y una menor diferenciación celular y, por ende, una mayor malignidad de las células tumorales, sugiriendo que el aumento diferencial en la expresión de este transportador conferiría una ventaja selectiva a una subpoblación de células, participando en el desarrollo o mantenimiento del cáncer.

Asimismo, indican que el balance entre los niveles de AMPc intra- y extracelular regula, de forma diferencial, la expresión de MRP4. Esta observación no sólo aumenta

el conocimiento sobre la transducción de señal del AMPc, sino que podría vincular los elevados niveles de MRP4 observado en células tumorales de PDAC con la exacerbación de la cascada del AMPc descrita en estos tejidos.

Por otra parte, demuestran, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la actividad de este transportador es crítica para la proliferación de las células tumorales y que su inhibición conduce a una marcada disminución de la malignidad y capacidad de invasión de las células de PDAC. Teniendo en cuenta que estas son dos de las razones principales de la dificultad del tratamiento de esta patología, los resultados obtenidos resultan muy promisorios.

Más aún, en los ensayos realizados se observó que estos efectos no fueron producto de aumentos globales en los niveles intracelulares de AMPc, sino consecuencia de la disminución de este segundo mensajero en el compartimiento extracelular. En tal sentido, nuestros resultados demostraron que el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 participa de un circuito mitogénico, en dónde este segundo mensajero es capaz de estimular la proliferación celular por acción directa sobre un receptor de membrana aún no identificado.

En la validación de un blanco molecular, no sólo resulta fundamental relacionar su expresión al proceso patológico, sino que es crítica la comprensión del mecanismo molecular de acción y los mecanismos que regulan dicha alteración en la expresión. En tal sentido, los resultados experimentales descritos en este trabajo de tesis, junto a los reportes bibliográficos analizados, permiten fuertemente postular a MRP4 y al proceso de exclusión de AMPc como un blanco validado para futuras intervenciones terapéuticas en PDAC.

Tabla de contenido

Agradecimientos	3
Publicaciones	4
Resumen.....	5
Tabla de contenido	7
1. Marco teórico	10
2. Introducción	12
2.1. El páncreas y los adenocarcinomas ductales pancreáticos.....	12
2.2 Características moleculares de los PDAC: la cascada del AMPc como posible blanco terapéutico	18
2.3 La vía de señalización del AMPc.....	20
2.4 Regulación de la vía de señalización del AMPc	22
2.5 El AMPc como mediador extracelular.....	27
2.6 MRP4: un emergente blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer.....	30
2.7 La validación de nuevos blancos terapéuticos y/o biomarcadores para el tratamiento del cáncer de páncreas	38
Hipótesis	40
Objetivo general.....	40
Desarrollo de los objetivos.....	41
3. Resultados	43
3.1. Selección racional del modelo de estudio	43
3.2. Caracterización del proceso de exclusión de AMPc en células de adenocarcinoma ductal pancreático.....	44
3.3. Participación de las Proteínas Asociadas a Resistencia a Multidrogas (MRP) en el proceso de exclusión de AMPc en células de adenocarcinoma ductal pancreático	48
3.4. Expresión de MRP4 en células de adenocarcinoma ductal pancreático humano	53

3.5. Efecto del silenciamiento de MRP4 sobre el proceso de exclusión de AMPc en células PANC-1	54
3.6. Efecto de la inhibición farmacológica de MRPs sobre la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático	61
3.7. Efecto del silenciamiento de MRP4 sobre la proliferación de células PANC-1	65
3.8. Efecto de la inhibición de MRP4 sobre la capacidad migratoria de las células PANC-1	66
3.9. Papel del AMPc intracelular en el efecto inhibitorio de MRP4 sobre la proliferación de células PANC-1	68
3.10 Papel del AMPc extracelular en el efecto de MRP4 sobre la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático	70
3.11 Regulación de la expresión de MRP4 mediada por AMPc	82
3.12 Efecto del silenciamiento de MRP4 en el crecimiento de las células PANC-1 <i>in vivo</i>	101
4. Discusión.....	106
El proceso de exclusión del AMPc regula los niveles de este nucleótido cíclico en líneas celulares de PDAC	106
Los MRPs, y en particular MRP4, son responsables de la exclusión del AMPc en las células de PDAC humanas	108
La inhibición de MRP4 lleva a un bloqueo de la proliferación de células de PDAC <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	111
El proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 provee una señal mitogénica al espacio extracelular.....	114
El balance intra/extracelular de AMPc modula la expresión de MRP4.....	118
MRP4 y la exclusión de AMPc: nuevos blancos para el tratamiento del cáncer de páncreas	123
Yin y Yang	128
5. Perspectivas futuras	130

6. Metodología	134
6.1. Mantenimiento de líneas celulares	134
6.2. Caracterización del proceso de exclusión de AMPc	134
6.3. Ensayos de unión de PKA para el dosaje de AMPc	136
6.4. Detección de proteínas por Western Blot	137
6.5. Cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real (qPCR)	139
6.6. Silenciamiento de MRP4 utilizando ARN de interferencia (ARNi).....	143
6.7. Ensayo de citotoxicidad	147
6.8. Ensayos de proliferación celular por conteo celular	147
6.9. Análisis del ciclo celular	147
6.10. Ensayos de cierre de herida.....	148
6.11. Ensayos de migración en <i>transwells</i>	148
6.12. Ensayos de estabilidad del AMPc	149
6.13. Ensayos de unión a [³ H]-AMPc	149
6.14. Plásmidos y transfecciones transientes	150
6.15. Análisis <i>in silico</i> del promotor de MRP4.....	150
6.16. Construcción del vector reportero MRP4-Luc.....	151
6.17. Ensayo de gen reportero de luciferasa	154
6.18. Animales	154
6.19. Experimentos <i>in vivo</i>	154
6.20. Estudios morfológicos	155
6.21. Análisis estadístico.....	155
6.22. Materiales.....	155
7. Abreviaturas	156
8. Referencias.....	159

1. Marco teórico

Los cánceres pancreáticos son un grupo de enfermedades heterogéneas que consisten en la formación de células malignas en los tejidos del páncreas endocrino o exocrino. De ellos, los adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC, del inglés *pancreatic ductal adenocarcinoma*) son el subtipo histológico más común, representando más del 90% de todos los cánceres pancreáticos. A pesar de ser un tumor relativamente raro (2% de todos los casos de cáncer), los PDAC son la cuarta causa de muerte por cáncer en países desarrollados; con una tasa de supervivencia media luego de su diagnóstico menor a 6 meses y una tasa de supervivencia a 5 años menor al 4%. La mala prognosis de los PDAC es el resultado de su diagnóstico tardío, su alto potencial metastásico y su elevada resistencia a terapias convencionales. Aunque en la última década se han logrado avances significativos en la comprensión de la biología y fisiopatología de los PDAC, estos no han sido acompañados de mayores avances en el tratamiento clínico de esta patología, siendo uno de los pocos cánceres sin una mejora substancial en la supervivencia de los pacientes en los últimos 40 años. Es así que en el 2013 los PDAC son catalogados como cánceres recalcitrantes por el gobierno de los Estados Unidos, estableciendo en consecuencia un marco de trabajo para los siguientes años cuyos ejes son la definición de biomarcadores de detección temprana y la validación de nuevos blancos farmacológicos, entre otros.

En este sentido, dado que en cáncer, las vías de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación celular se encuentran casi invariablemente alteradas, las mismas han sido profundamente diseccionadas a fin de determinar novedosas estrategias de tratamiento. A pesar de ello, la comprensión sobre cuáles son las alteraciones que conducen al cáncer y como corregirlas es aún un reto considerable. Recientemente, ha sido descrito que el 72% de los PDAC estudiados presentan una expresión de moderada a alta de sustratos de PKA fosforilados (principal efector de la cascada del AMPc) y que el 59% de los mismos presenta una expresión elevada de la subunidad Gas (proteína que induce la síntesis de AMPc). A su vez, con el avance del proyecto genoma humano y mediante los esfuerzos en la secuenciación del genoma de diferentes tipos de tumores, se ha demostrado una alta frecuencia de mutaciones en las proteínas G y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) en la mayoría de las neoplasias. Particularmente, en el 11,8% de los tumores secuenciados de PDAC se

encontraron mutaciones activantes del gen que codifica para la proteína G α s. En consecuencia, estos antecedentes ponen de manifiesto una frecuente alteración de la cascada del AMPc en PDAC y, por ende, el potencial oncogénico de su circuito de señalización en esta patología.

Desde su descubrimiento en 1960, este nucleótido cíclico ha sido uno de los segundos mensajeros más estudiados en células eucariontes y numerosos reportes indican que se encuentra involucrado en la regulación del crecimiento y la diferenciación de células normales y malignas. Por lo tanto, no es sorprendente que sus niveles intracelulares se encuentren finamente regulados tanto de forma positiva como negativa. En los últimos años, a la complejidad de los mecanismos regulatorios de la señalización del AMPc conocidos, se ha sumado la exclusión de este segundo mensajero al compartimiento extracelular, proceso mediado por la familia de proteínas asociadas a resistencia a multidrogas (MRPs, del inglés *multidrug resistance associated proteins*) y, en particular, por el miembro denominado MRP4. Antecedentes recientes de nuestro laboratorio describieron que la inhibición de esta proteína en líneas celulares leucémicas incrementa los niveles de AMPc en el espacio intracelular e induce la diferenciación celular y el consiguiente arresto de la proliferación. En consecuencia, aportaron la primera evidencia experimental que MRP4 y la exclusión de AMPc representan un nuevo blanco para terapias diferenciantes en leucemias.

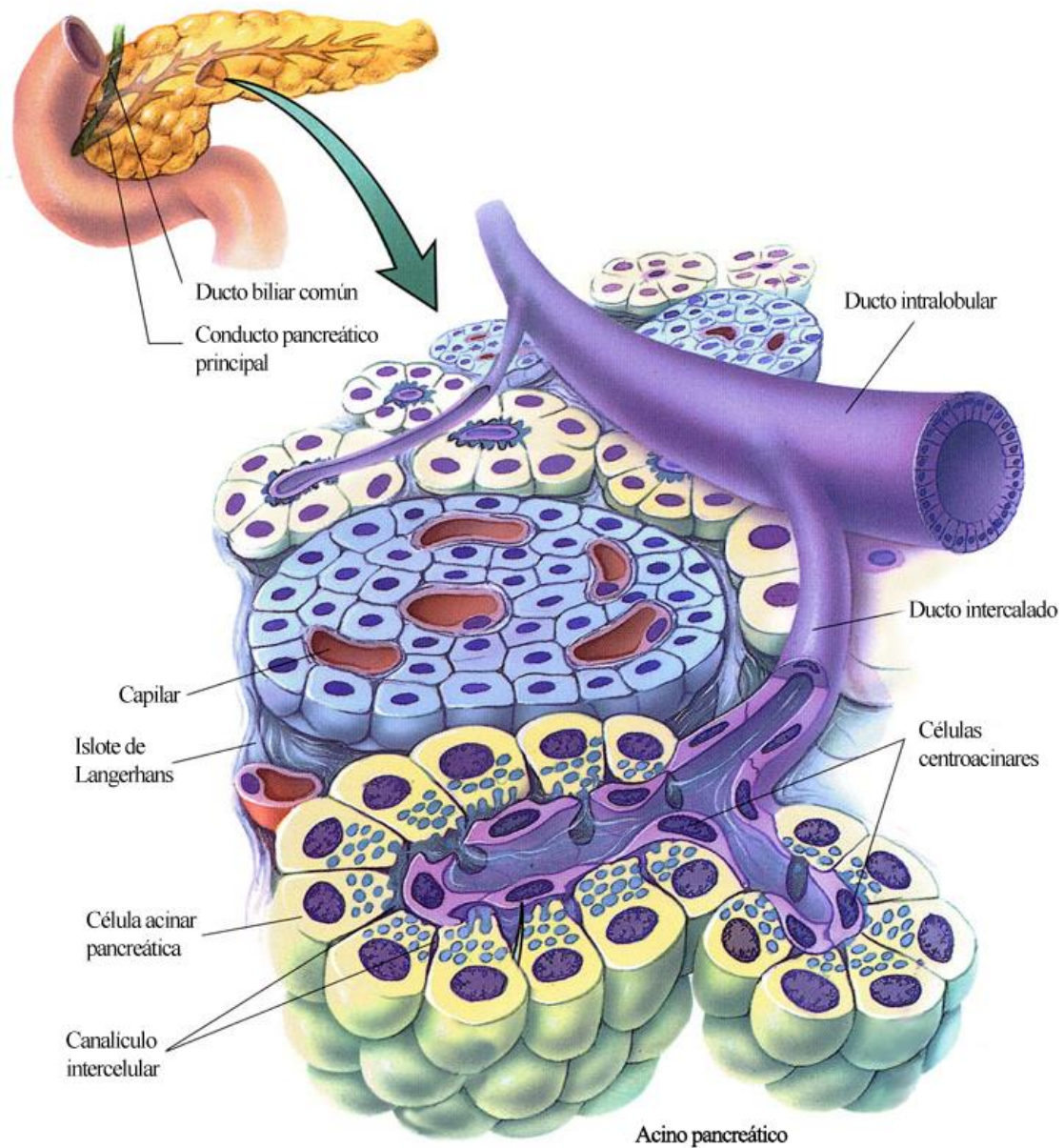
Recientemente ha sido descrito que la expresión de la proteína MRP4 es significativamente mayor en tejidos de cáncer de páncreas en comparación con el tejido pancreático normal. Por lo tanto, en base a los antecedentes mencionados, *el presente trabajo de tesis se enmarca dentro del propósito de validar a MRP4 y al proceso de exclusión de AMPc como posibles biomarcadores y/o blancos terapéuticos para el diagnóstico y tratamiento de adenocarcinomas ductales pancreáticos.*

2. Introducción

2.1. El páncreas y los adenocarcinomas ductales pancreáticos

El páncreas es un órgano glandular del sistema digestivo y endocrino presente en vertebrados. Este órgano se encuentra formado por dos unidades funcionales independientes que regulan dos procesos fisiológicos importantes: la digestión de proteínas e hidratos de carbono; y el metabolismo de la glucosa. La unidad estructural básica del páncreas endocrino, encargado de la homeostasis de la glucosa, es el islote de Langerhans. En el mismo pueden encontrarse al menos cuatro tipos celulares de acuerdo a su secreción; las células α y las β , encargadas de la secreción de glucagón e insulina respectivamente; las células δ que secretan somatostatina; y las células γ o PP que se ocupan de la secreción del polipéptido pancreático. Por otra parte, el componente exocrino del páncreas, que constituye más del 80% de la masa tisular del órgano, consiste en ductos que se organizan en grupos llamados acinos. Los mismos se encuentran formados por dos tipos celulares; las células basófilas o acinares (que secretan enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina, amilasas y lipasas) y las centro-acinares (encargadas de la secreción de bicarbonato con el fin de regular el pH luminal para lograr una actividad enzimática óptima). Estas secreciones pancreáticas son excretadas al lumen de los acinos y luego se acumulan en los conductos intralobulares que drenan al conducto pancreático principal, el cual culmina finalmente en el duodeno.

Anatómicamente, el páncreas es un órgano retroperitoneal en el que puede distinguirse una porción proximal rodeada por el asa duodenal que se denomina *cabeza*. Hacia la izquierda de la misma, el *cuerpo* del órgano se extiende por debajo de la base del estómago y, finalmente, culmina en la *cola* del páncreas, que se encuentra delante de la glándula suprarrenal izquierda y se extiende hacia el hilio esplénico (Hall and Guyton 2011).



Esquema 1. Representación gráfica del páncreas exocrino y endócrino. Adaptado de Yale Systems Cell Biology.

Como reflejo de la mencionada diversidad fisiológica y celular del páncreas, existe un variado espectro de neoplasias de este órgano cuyas propiedades histológicas y moleculares recuerdan a las características particulares de las distintas células normales que lo constituyen (*Tabla 1*) (Go 2007).

Neoplasia pancreática	Características histológicas
Exocrinos (~99%)	
Adenocarcinoma ductal (PDAC) (>90%)	Morfología ductal, desmoplasia
Variantes de PDAC	
a. Carcinoma medular	Pobrementemente diferenciado, linfocitos intratumorales
b. Carcinoma coloide	Reservorios de mucina
Carcinoma de células acinares	Gránulos de zimógeno
Pancreatoblastoma	Nidos escamosos, diferenciación multilineaje
Tumores sólidos y pseudopapilares	“Pseudo” papilas, áreas sólidas y císticas, glóbulos de hialina
Cistadenoma seroso	Quistes multioculares, epitelio rico en glucógeno
Endocrinos (~1%)	
Insulinoma	Producción de insulina
Glucagonoma	Producción de glucagón
Gastrinoma	Producción de gastrina
Somatostatina	Producción de somatostatina
VIPomas	Producción de VIP
PPomas	Producción de PP

Tabla 1. Tumores exocrinos y endocrinos del páncreas. Adaptado de Go et al. (2007).

En particular, los adenocarcinomas ductales pancreáticos son la neoplasia pancreática más frecuente, representando más del 90% de los tumores de este órgano. Por lo general, los PDAC surgen en la cabeza del páncreas y, a nivel morfológico, están compuestos por células epiteliales con distinto grado de diferenciación ductal y atipia celular (Hezel et al. 2006).

A pesar de que representan menos del 2% de los cánceres detectados, son la cuarta causa de muerte por cáncer en países desarrollados, produciendo aproximadamente 266.000 muertes por año a nivel mundial (Torre et al. 2015). Más aún, se estima que para antes del 2030 el número de casos y muertes por PDAC aumentará a más del doble, transformando a este tipo de neoplasia en la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en los Estados Unidos (Rahib et al. 2014).

En general, los principales factores de riesgo relacionados con el desarrollo de esta patología incluyen antecedentes familiares (7-10% de los casos), edad avanzada (siendo la media de aproximadamente 70 años), pancreatitis hereditaria o crónica, tabaquismo (20% de los casos), obesidad y diabetes mellitus (Vincent et al. 2011).

A pesar de los significativos avances logrados en la última década sobre la comprensión de la biología y fisiopatogenia de los PDAC, estos continúan siendo uno de los tipos de tumores más letales. En concreto, la tasa media de supervivencia es menor a 6 meses y menos del 5% de los pacientes logra sobrevivir a los cinco años luego de su diagnóstico (Torre et al. 2015). Esta mala prognosis es el resultado de su alto potencial metastático, su elevada resistencia a terapias convencionales y su diagnóstico tardío.

Los PDAC son tumores muy agresivos, presentando con frecuencia infiltraciones en los tejidos aledaños. De hecho, en el 80% de los casos se encuentran comprometidos los ganglios linfáticos y, al momento del diagnóstico, más del 80% de los pacientes presenta metástasis a distancia. Los sitios más frecuentes de metástasis son hígado (80%), peritoneo (60%), pulmón y pleura (50-70%) y glándulas adrenales (25%) (Winter et al. 2006).

A la fecha, el único tratamiento efectivo para este tipo de cáncer consiste en la remoción quirúrgica del tumor, la cual aumenta la tasa de supervivencia a 5 años en el 40% de los casos en cuyos tumores hayan sido detectados con un tamaño menor a 20mm y en el 75% de los casos con tumores menores a 10mm. Desafortunadamente este procedimiento es únicamente viable en un 15-20% de los individuos al momento de su diagnóstico, debido principalmente a la detección tardía del tumor, a las condiciones generales del paciente o a la presencia de metástasis. De esta forma, una vez que la enfermedad ha progresado a una etapa avanzada se aplican varios regímenes de tratamiento, los cuales tienen una función principalmente paliativa, produciendo un mínimo aumento en la sobrevivencia de los pacientes. Desde finales de la década de 1990 la primera línea de tratamiento quimioterápico para PDAC fue el tratamiento con gemcitabina. Recientemente, tanto la radioterapia conjunta con 5-fluoruracilo, la combinación de 5-fluoruracilo, irinotecan y oxalilplatino (Folfirinox®) como el co-tratamiento de gemcitabina con erlotinib, han logrado reducir exitosamente los tumores y prolongar la supervivencia de los pacientes con PDAC, pero su beneficio aún continúa siendo limitado (Kleger et al. 2014). Debido a esto, aún es necesaria una mejor comprensión de la biología del cáncer pancreático y la identificación de nuevos blancos moleculares terapéuticos.

A su vez, otra de las problemáticas claves de estas neoplasias es la mencionada dificultad para detectarlas de forma temprana. Esta complejidad es, en parte,

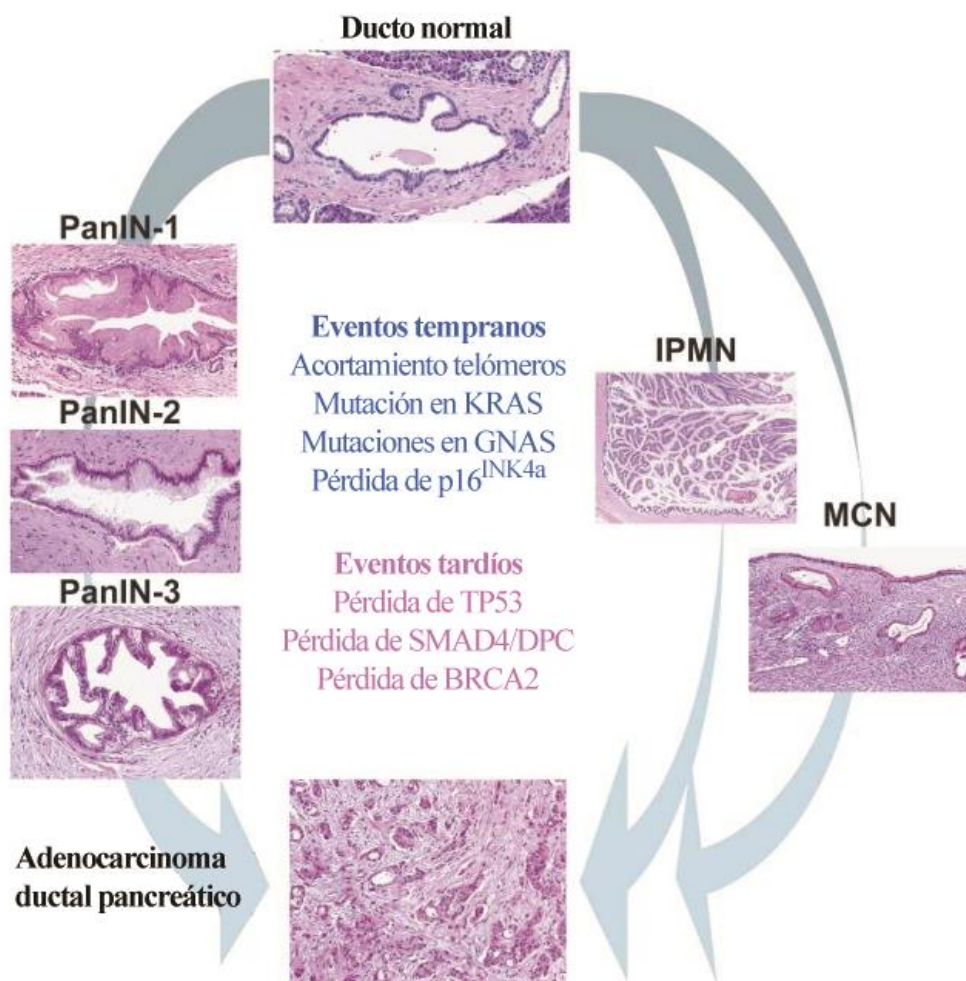
consecuencia de la disposición anatómica del páncreas, el cual se localiza en la profundidad de la cavidad abdominal, y, a su vez, de la ausencia de pruebas de detección eficientes en la clínica. Por otro lado, los PDAC son asintomáticos en sus etapas tempranas y, una vez que se presentan, la sintomatología es vaga (dolor abdominal, pérdida de peso, pérdida de apetito, náuseas y diabetes), pudiendo ser indicativa de muchos tipos de trastornos gastrointestinales. Dado que, como fue mencionado anteriormente, el diagnóstico temprano es un determinante crítico de la tasa de supervivencia de los pacientes, existe una necesidad urgente de encontrar biomarcadores sensibles y específicos para PDAC (Chan et al. 2013).

Otra característica de estas lesiones es la existencia de una fuerte reacción desmoplásica, consistente en un crecimiento fibrótico denso que rodea a las células tumorales. Esta reacción estromal exacerbada se encuentra compuesta por proteínas de matriz extracelular (ECM), células estrelladas pancreáticas (PaSC) y células inmunes. El microambiente generado por estos componentes es crítico para la biología de los PDAC, dado que proveen de soporte para el crecimiento de las células tumorales pancreáticas, a la vez que promueven su proliferación mediante el aporte de factores de crecimiento, compuestos inmunomoduladores y factores angiogénicos (Pandol et al. 2009).

A nivel clínico, se han podido identificar tres tipos de lesiones precursoras pancreáticas a partir de las cuales evolucionan los PDAC: las neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN), las neoplasias intraductales papilares mucinosas (IPMN) y las neoplasias císticas mucinosas (MCN). De ellas, las más comunes y extensamente estudiadas son las PanINs, las cuales se forman en los ductos intralobulares pancreáticos de pequeño calibre. Estas neoplasias han sido observadas en el 82% de los páncreas con cáncer como lesiones multifocales que rodean al tumor. Dado que estas lesiones son microscópicas (<5mm diámetro) y asintomáticas, las mismas no son visibles mediante técnicas tradicionales, dificultando su detección temprana. Estas neoplasias se subclasifican, a su vez, en tres grupos que reflejan los cambios histológicos progresivos que ocurren desde el epitelio normal hasta alcanzar el adenocarcinoma. En una primera instancia, las PanIN-1A y 1B, se presentan como lesiones planas o papilares respectivamente de bajo grado, con ausencia de atipia o polaridad nuclear. Este tipo de lesiones son muy comunes en adultos mayores, observándose en al menos el 30% de los individuos. Las lesiones PanIN-2 muestran un grado intermedio de atipia citológica y

arquitectónica, con frecuentes elementos papilares, atipias nucleares e infrecuentes mitosis. Las PanIN de alto grado, denominadas PanIN-3 o carcinomas *in situ*, se caracterizan por presentar pérdida de polaridad, severas atipias nucleares y mitosis frecuentes. Todas las PanINs son lesiones no invasivas y, actualmente, se cree que únicamente el 1% de las mismas evoluciona a PDAC, con la consiguiente invasión más allá de la membrana basal. Esta progresión histológica se encuentra acompañada por una acumulación de cambios genéticos (*Figura 2*) (Hruban et al. 2000).

Por otro lado, las IPMNs son histológica y molecularmente similares a las PanINs pero difieren principalmente en su tamaño y localización. Las mismas comprometen regiones mayores a 1cm y se originan principalmente en el ducto principal o en sus ramas secundarias. A pesar de ser menos frecuentes (3-5% de las lesiones precursoras), se considera que del 70% de las mismas derivan a carcinomas invasivos (Delpu et al. 2011).



Esquema 2. Modelo de progresión de las lesiones precursoras de PDAC y sus alteraciones genéticas más frecuentes (Hruban et al. 2000)

2.2 Características moleculares de los PDAC: la cascada del AMPc como posible blanco terapéutico

Durante el curso de la progresión tumoral, las células cancerosas adquieren una serie de alteraciones características. Estas incluyen la autosuficiencia de señales de crecimiento, la insensibilidad a señales antiproliferativas, la capacidad de evadir la apoptosis, un ilimitado potencial replicativo, la habilidad de provocar una respuesta angiogénica y de invadir tejidos y realizar metástasis (Hanahan and Weinberg 2000). Estas propiedades reflejan alteraciones genéticas y epigenéticas en las vías de señalización de las células normales, vinculadas al control de la proliferación celular, la motilidad y la supervivencia. Por lo tanto, muchas de las proteínas actualmente bajo investigación como posibles dianas para la terapia del cáncer son proteínas de señalización que participan en estas vías.

En el caso particular de los PDAC, en las últimas décadas varios estudios han determinado una serie de alteraciones genéticas características que incluso se encuentran presentes en las lesiones precursoras. Más aún, la frecuencia de estas anomalías aumentan conforme progresa el grado de atipia citológica y arquitectónica de las lesiones, lo que llevó a suponer que las mismas son críticas en la fisiopatología de la enfermedad.

Las primeras anomalías observadas en las lesiones precursoras son mutaciones en el oncogén KRAS y, menos frecuentemente, en p16/CDKN2A, GNAS o BRAF. Es así que, en su conjunto, estas alteraciones se encuentran presentes en más del 99% de los PanINs de bajo grado, sugiriendo que estas mutaciones somáticas son necesarias para las etapas tempranas del desarrollo de estas lesiones (Kanda et al. 2012). A la par de las mismas, se observa el acortamiento de los telómeros en más del 90% de las lesiones PanIN, independientemente de su grado, sin embargo, se postula que este fenotipo sería una consecuencia de la activación de programas de senescencia inducidos por estrés mediado por estos oncogenes y no un evento iniciador de estas lesiones. Posteriormente, en PanINs más avanzados y carcinomas invasivos, se observa con frecuencia la inactivación de genes supresores como p53 (50-85%), DPC4/SMAD4 (50%) y BRCA2 (10%) (Vincent et al. 2011).

La mutación activante de KRAS constituye la principal alteración genética asociada con el cáncer de páncreas desde hace ya décadas. Varios estudios han

demostrado un incremento gradual en la frecuencia de mutaciones en este oncogén que correlaciona con la progresión de las neoplasias pancreáticas (siendo 36% en PanIN-1A, 44% en PanIN-1B, 87% en PanIN-2/3 y mayor al 90% en PDAC) (Lohr et al. 2005). Estas observaciones son consistentes con la hipótesis sobre una selección y expansión gradual de clones con KRAS mutado durante la progresión de estas lesiones, lo que orientó al desarrollo de fármacos para el tratamiento de PDAC hacia la modulación de esta molécula y sus efectores. Sin embargo, todos los intentos de atacar KRAS directamente han fracasado en la clínica y actualmente se ha asumido ampliamente que es una molécula “no drogable” (Eser et al. 2014). A su vez, KRAS no es un buen biomarcador de cáncer ya que se ha observado que con la edad se van adquiriendo este tipo de mutaciones oncogénicas en pulmón, páncreas y otros tejidos, aún sin que se encuentren asociadas al desarrollo del cáncer (Parsons and Meng 2009). Por otra parte, la mutación de KRAS *per se* no es determinante, dado que se necesita otros factores que incrementen la actividad de la proteína K-Ras para iniciar la oncogénesis y su progresión. Teniendo en cuenta esta problemática, es interesante remarcar que recientemente se ha identificado que en el 11,8% de las muestras de PanIN y en más del 60% de las IPMNs evaluadas existen mutaciones del oncogén GNAS, gen que codifica para la subunidad α de la proteína G estimuladora (Gas) (Wu et al. 2011, Kanda et al. 2012, O'Hayre et al. 2013). Las mutaciones somáticas más frecuentemente identificadas en GNAS son R201C y R201H, las cuales producen una alteración de la actividad hidrolítica de Gas, resultando en una activación constitutiva de su función y en consecuencia en una producción incrementada de AMPc. En adición a esto, se ha identificado en muestras de pacientes de PDAC que la proteína Gas se encuentra elevada en el 59% de los tumores evaluados, indicando que la alteración de esta proteína es un evento frecuente en este tipo de patología. Más aún, dado que en varios PanIN las mutaciones en GNAS parecen haber ocurrido como un evento anterior a KRAS, actualmente se sugiere que las mismas se encuentran asociadas a la iniciación de estas lesiones y, en menor medida, a su progresión. Curiosamente, ninguna de las muestras de PDAC evaluadas presentaron mutaciones en este gen (Furukawa et al. 2011).

Por otra parte, recientemente se ha determinado que el 72% de las muestras de pacientes de PDAC evaluadas presentan una expresión de moderada a alta de sustratos fosforilados de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA, del inglés *cyclic-AMP*-

dependent protein kinase), siendo este aumento de la actividad de PKA independiente de las mutaciones en GNAS. Más aún, la elevada expresión de sustratos fosforilados de PKA se encontró asociada a un mayor grado tumoral en lesiones IPMN y a una menor tasa de supervivencia, sugiriendo que la exacerbación de la cascada de PKA puede ser necesaria para la progresión de estas neoplasias.

En consecuencia, estos antecedentes ponen de manifiesto que tanto en la iniciación como en la progresión de los PDAC son frecuentes las alteraciones de la cascada del AMPc y, por ende, sugieren el potencial oncogénico de su circuito de señalización en esta patología.

2.3 La vía de señalización del AMPc

En 1958 Earl Sutherland identifica al AMPc dando comienzo al estudio de las vías de señalización y al concepto de “segundos mensajeros” (Sutherland and Rall 1958). Desde entonces, esta molécula ha sido uno de los segundos mensajero más estudiados en células eucariotas. El AMPc participa en los procesos de transducción de señales de múltiples moléculas como hormonas, neurotransmisores, citoquinas y factores de crecimiento. Como consecuencia de la gran variedad de moléculas que median su acción vía AMPc, éste se encuentra implicado en procesos tan diversos como contracción muscular, exocitosis, procesos metabólicos, neurotransmisión, agregación plaquetaria, transformación de fibroblastos, síntesis de esteroides, movilización de glucosa, desarrollo embrionario y regulación del crecimiento y diferenciación tanto de células normales como malignas (Cho-Chung et al. 1991, Hartwell 1994, Iyengar 1996, Houslay 1998).

La síntesis de este segundo mensajero es iniciada por la unión de ligandos a receptores acoplados a proteína G (GPCR), también conocidos como receptores de siete pasos transmembrana, los cuales constituyen la familia más grande y ubicua de moléculas de superficie celular involucradas en la transmisión de señales. Los mismos se encuentran codificados por aproximadamente 1000 genes y, en mamíferos, regulan prácticamente todos los procesos fisiológicos (Foord et al. 2005).

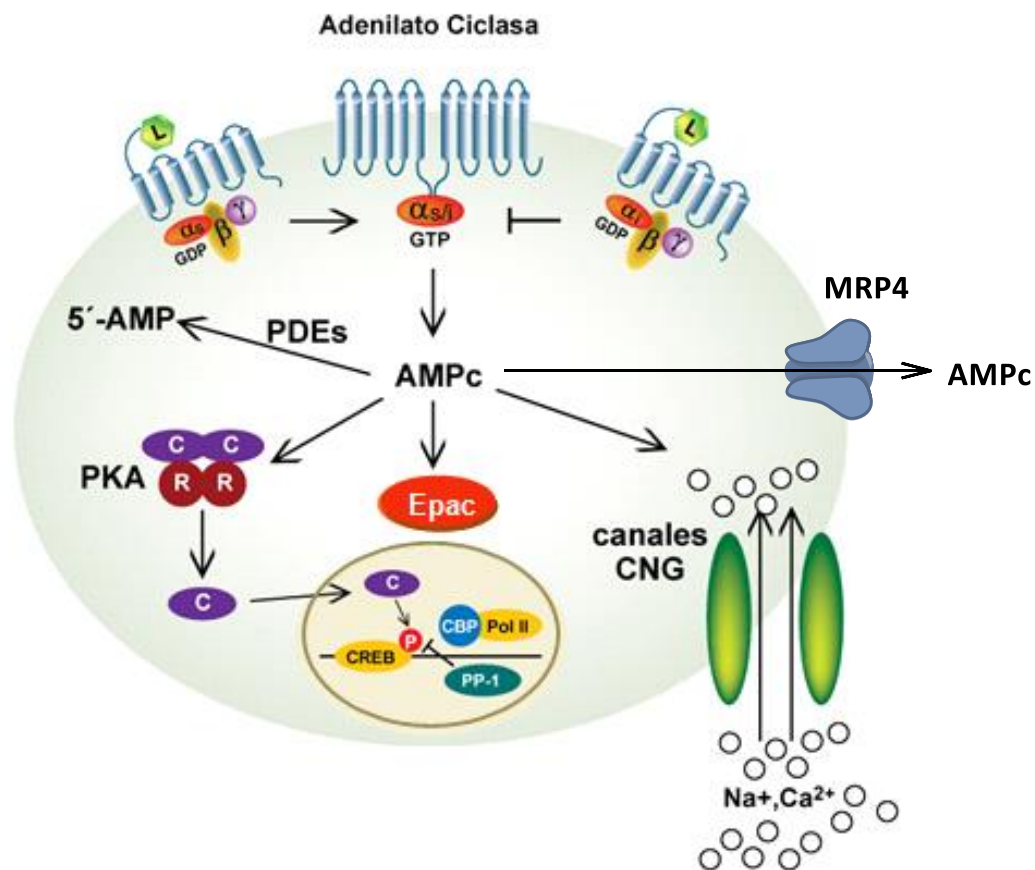
Los miembros de esta familia se asocian a proteínas G heterotriméricas, capaces de unir e hidrolizar GTP, por medio de las cuales transmiten la señal al interior celular. A pesar de que en mamíferos existen alrededor de 20 tipos distintos de proteína G, estas pueden dividirse típicamente en 4 clases principales en base a la homología de

secuencia de la subunidad α : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$ (Oldham and Hamm 2008). En particular, la subunidad $G\alpha_s$ activa la adenilato ciclasa (AC) que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática conduciendo a la síntesis de AMPc a partir de ATP. Alternativamente, la actividad de la AC puede ser inhibida por ligandos que estimulan GPCRs asociados a $G\alpha_i$. Por lo tanto, la proteína $G\alpha_s$ y la $G\alpha_i$ tienen efectos opuestos sobre los niveles de este segundo mensajero.

Una vez que los niveles de AMPc se elevan dentro de la célula, diferentes blancos dependientes de este nucleótido cíclico pueden ser activados. La primera proteína efectora en describirse fue la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), formada por dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas (Krebs et al. 1968). El AMPc se une a las subunidades regulatorias permitiendo la liberación y la activación de las subunidades catalíticas de la PKA. Esta activación mediada por AMPc da lugar a la fosforilación de un gran número de sustratos citoplasmáticos. Además, la subunidad catalítica de la PKA puede translocar al núcleo y regular la transcripción, a través de la fosforilación directa de los factores de transcripción CREB (del inglés *cAMP response element binding protein*), CREM (del inglés *cAMP responsive modulator*) y ATF1 (del inglés *activating transcription factor 1*) (Beavo and Brunton 2002).

Más recientemente, otras familias de proteínas capaces de unir nucleótidos cíclicos fueron identificadas (Dremier et al. 1997). Entre ellas se encuentran, los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG) y las proteínas Epac-1 y -2.

Las proteínas Epac (del acrónimo en inglés *exchange protein activated by cAMP*), a diferencia de las distintas isoformas de PKA, no fosforilan proteínas efectoras sino que actúan como intercambiadores de nucleótidos de guanina de las GTPasas pequeñas de la familia de Ras Rap1 y Rap2, mediante su dominio GEF (del inglés *guanine exchange factor*). Las distintas isoformas de Epac se encuentran expresadas en varios tejidos, incluyendo cerebro, vasos sanguíneos, riñón, glándula adrenal y páncreas, en dónde se ha descrito que median muchos de los efectos del AMPc relacionados a proliferación, diferenciación y migración celular, anergia de linfocitos T, activación plaquetaria y secreción de insulina (de Rooij et al. 1998, Breckler et al. 2011). Las dos isoformas de Epac identificadas se encuentran estrechamente relacionadas, siendo su principal diferencia la presencia en Epac-2 de un segundo sitio de unión al AMPc (CBD, del inglés *cAMP-binding domain*) de baja afinidad ($K_d=40\mu\text{M}$ del dominio A de Epac-2 contra $K_d=1-5\mu\text{M}$ del sitio B de Epac-1 y-2).



Esquema 3. Vía de señalización del AMPc. Adaptado de Beavo y Brunton, 2002.

2.4 Regulación de la vía de señalización del AMPc

A la luz del conocimiento acumulado a lo largo de los años, resulta evidente que la especificidad de la señal del AMPc está dada por una compleja regulación a distintos niveles. En tal sentido, la compartimentalización de la señal de AMPc, la fina regulación de sus niveles intracelulares y de la duración de la respuesta, así como la expresión diferencial de GPCRs, proteínas G y AC, resultan claves en el efecto específico receptor/órgano y en el procesamiento de la información generada en la membrana (Tasken and Aandahl 2004).

Compartimentalización de la señal

Inicialmente, el AMPc fue considerado como un segundo mensajero que difunde libremente dentro de la célula con un rango teórico de acción de 220µm (Kasai and Petersen 1994). Sin embargo, el avance de las técnicas de imagen en células vivas permitió detectar gradientes de AMPc más que una distribución homogénea de este segundo mensajero, indicando la existencia de sitios subcelulares específicos. En estos microdominios las proteínas que producen, degradan y son activadas por AMPc se

organizan en complejos multiproteicos, a través de proteínas de andamiaje denominadas AKAPs (del inglés *A-kinase anchoring proteins*) que se encuentran distribuidas de forma no azarosa dentro de la célula (Michel and Scott 2002, Baillie 2009). Estas últimas constituyen una amplia familia de proteínas de más de 50 miembros capaces de anclar PKA a sitios específicos, asegurando la fosforilación preferencial de determinados blancos. Más aún, las AKAPs sirven también de andamiaje para fosfodiesterasas (PDEs), fosfatasa 1 y 2, Epac, AC y sustratos de PKA (Mika et al. 2012). Por consiguiente, esta organización subcelular de los componentes de la vía del AMPc es crucial tanto para la especificidad como para la regulación temporal de la señal.

Regulación de los niveles intracelulares por fosfodiesterasas

El primer mecanismo de regulación de los niveles de AMPc en describirse fue la degradación del mismo mediada por las fosfodiesterasas (PDEs). Estas, son enzimas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos a sus correspondientes 5'-nucleósidos monofosfato en presencia de cationes divalentes. Pueden ser específicas de AMPc, GMPc o bien pueden utilizar ambos sustratos. Existen 11 familias de PDEs que incluyen 50 isoformas, las cuales han sido clasificadas en base a su secuencia de aminoácidos, propiedades bioquímicas, mecanismos reguladores y por sus afinidades por el AMPc o el GMPc. Aunque las familias de PDEs presentan propiedades diferentes, todas ellas comparten una estructura muy similar que puede dividirse en tres dominios: un extremo amino (NH₂), una región central o dominio catalítico y un extremo carboxílico (COOH). El dominio catalítico se encuentra altamente conservado entre los miembros de una misma familia y contiene los elementos específicos causantes de las diferencias de afinidades por el sustrato y de la sensibilidad a distintos inhibidores. La hidrólisis del AMPc puede ser llevada a cabo por miembros de las familias de PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE7, PDE8, PDE10 y PDE11.

Debido a su capacidad de regular los niveles de este segundos mensajero, las PDEs controlan numerosos procesos celulares y están implicadas en el control espacio-temporal de los componentes de la vía de señalización del AMPc (Houslay and Milligan 1997, Houslay 1998, Beavo and Brunton 2002).

Desensibilización de GPCRs

Además de modular la actividad de proteínas G, los GPCRs desencadenan una serie de mecanismos autoregulatorios de corte de la señal que incluyen desde la

fosforilación del receptor y el desacople de la proteína G hasta la internalización y *down-regulación* de los mismos. El conjunto de procesos que conducen a la atenuación de la respuesta evocada por un receptor luego de una exposición prolongada o repetida al estímulo, recibe el nombre de desensibilización.

Así como las PDEs regulan los niveles de AMPc favoreciendo su degradación, el proceso de desensibilización, en particular al inactivar un GPCR acoplado a Gs, impide que se eleven los niveles de AMPc y, por ende, regula la concentración de este segundo mensajero. Por el contrario, al desensibilizarse un GPCR acoplado a Gi se produce el efecto opuesto.

Este proceso puede clasificarse según distintos criterios en diferentes categorías que no son excluyentes, sino complementarias. De acuerdo al tiempo transcurrido, se divide en rápida (segundos o minutos) o lenta (horas o días). Dependiendo del mecanismo desensibilizante, se clasifica en desacople, cuando el receptor pierde su capacidad de activar a la proteína G o *downregulation*, con disminución del número de receptores, ya sea por internalización, degradación o disminución de su síntesis (Hausdorff et al., 1990). Por otro lado, la desensibilización puede estar mediada por quinasas de receptores acoplados a proteína G (GRKs, del inglés *G protein-coupled receptor kinase*) en cuyo caso es específica del receptor que ha sido activado, o ser consecuencia de la fosforilación generalizada de receptores mediada por quinasas dependientes de segundos mensajeros, como PKA o PKC (Pitcher et al. 1992).

Independientemente que el proceso de desensibilización sea consecuencia de uno u otro mecanismo, resulta evidente que esta respuesta adaptativa no sólo disminuye la sensibilidad del sistema a la llegada de un nuevo estímulo sino que también condiciona la duración e intensidad de la respuesta de segundos mensajeros evocada por un receptor. De esta forma, aunque distintos GPCRs desencadenen la misma señal intracelular, por ejemplo el incremento en los niveles de AMPc, la susceptibilidad que posean estos receptores a los mecanismos de atenuación de la respuesta así como cual sea la maquinaria desensibilizante que se exprese en un determinado sistema, van a resultar determinantes de la respuesta final evocada por cada uno de estos GPCR (Fernandez et al. 2002).

Exclusión de AMPc al espacio extracelular mediada por MRPs

En 1963, 5 años después del descubrimiento del papel del AMPc como segundo mensajero, Sutherland y Davoren reportaron la existencia de un mecanismo de

exclusión de este nucleótido cíclico fuera de la célula (Davoren and Sutherland 1963). Más aún, demostraron que el AMPc no podía atravesar la membrana por difusión simple y aportaron evidencias de que este mecanismo consistía en un transporte activo específico, sobre la base experimental que dicho proceso ocurría en contra de un gradiente de concentración y resultaba inhibido por la droga probenecid. A lo largo de los años siguientes, muchos trabajos describieron que la síntesis de AMPc y de GMPc era acompañada por su exclusión en un proceso dependiente de energía en diversos tipos celulares (Brunton and Heasley 1988, Fehr et al. 1990, Billiar et al. 1992). En tal sentido, estudios clínicos demostraron que pacientes con trastornos hiperproliferativos, leucemias y tumores sólidos, presentaban incrementos significativos respecto a individuos sanos en los niveles plasmáticos y urinarios de AMPc, postulando a este segundo mensajero como biomarcador de prognosis para estas patologías (Scavennec et al. 1981). Curiosamente, estos estudios fueron olvidados, debido probablemente al desconocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a este proceso. No fue sino hacia finales del siglo XX que se pudieron identificar las proteínas responsables del transporte de este nucleótido cíclico. Hasta la fecha, se han descrito tres miembros de la familia de proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas (MRPs, del inglés *multidrug resistance-associated protein*), capaces de transportar nucleótidos cíclicos hacia el espacio extracelular: MRP4, MRP5 y MRP8 (Jedlitschky et al. 2000, Guo et al. 2003, Wielinga et al. 2003).

Utilizando vesículas de membrana de células V79 transfectadas con MRP5 o de células Sf9 transfectadas con MRP4, se demostró que estas proteínas eran las responsables del transporte de nucleótidos cíclicos dependiente de ATP (Jedlitschky et al. 2000, van Aabel et al. 2002). Ambos transportadores tienen la capacidad de transportar tanto AMPc como GMPc, sin embargo, existen diferencias significativas en sus parámetros cinéticos. La afinidad del MRP4 por AMPc ($K_m=44,5\mu\text{M}$) es nueve veces mayor que la del MRP5 ($K_m=379\mu\text{M}$). Por el contrario, la afinidad del MRP4 por GMPc ($K_m=9,7\mu\text{M}$) es cinco veces menor que la reportada para MRP5 ($K_m=2,1\mu\text{M}$) (Jedlitschky et al. 2000, Chen et al. 2001). Posteriormente, a este grupo de transportadores capaces de excluir nucleótidos cíclicos se sumó el MRP8. Utilizando células LLC-PK1 transfectadas con dicho transportador se demostró su capacidad de excluir tanto AMPc como GMPc (Guo et al. 2003, Kruh et al. 2007). Hasta el momento, no ha sido reportada su constante de afinidad.

Dado que MRP4 posee una afinidad significativamente mayor por el AMPc que el resto de los transportadores, actualmente es considerado el principal miembro involucrado en el transporte de este segundo mensajero.

A pesar de ello, el papel fisiológico de la exclusión de nucleótidos cíclicos al presente no ha sido completamente dilucidado. La implicancia de este proceso como medio de regulación de la señal del AMPc intracelular ha sido muy discutida, en parte, debido a la relativa baja afinidad de los MRPs por estos nucleótidos (Wielinga et al. 2003, Borst et al. 2007) sumado al potente y rápido control dado por la degradación mediada por PDEs (Kruh et al. 2007). Por otra parte, se ha argumentado que la exclusión de AMPc es una estrategia demasiado desfavorable energéticamente para ser un modelo viable de regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos dentro de la célula, a la vez que conduciría a la depleción de las reservas de purinas (Jackson and Raghvendra 2004). De hecho, esta controversia encuentra fundamento en que no se han observado cambios sustanciales en la concentración intracelular de estos nucleótidos al inhibir o sobreexpresar MRP4. Por lo que, diversos reportes señalan que el transporte de AMPc mediado por MRPs actúa como un mecanismo accesorio de regulación, sólo en casos en que los niveles de AMPc sean muy elevados (Adachi et al. 2002, Wielinga et al. 2003). Sin embargo, en estudios realizados en líneas celulares deficientes en MRP4 se observó un incremento significativo de los niveles de AMPc intracelular (AMPc-i), indicando que MRP4 cumple un papel fundamental en la regulación basal del AMPc en algunos sistemas (Lin et al. 2008). A su vez, dado que la señalización del AMPc se encuentra altamente compartimentalizada, se ha observado que los MRPs, y en particular MRP4, a pesar de no afectar la concentración global de este segundo mensajero, se encuentran involucradas en la modulación local de los niveles de AMPc-i en microdominios submembrana (Russel et al. 2008, Xie et al. 2011). En relación a lo anterior, nuestro laboratorio demostró la relevancia de estos transportadores, y en particular MRP4, en el proceso de exclusión de AMPc y en la regulación de sus niveles intracelulares en modelos de leucemia mieloide aguda y su relación con los procesos de proliferación y diferenciación celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Copsel et al. 2011). Más aún, describimos como el bloqueo de este transportador conduce a la diferenciación de células madre leucémicas, postulándolo como un novedoso blanco terapéutico en terapia diferenciante (Copsel et al. 2014). Además, hemos reportado que el eflujo de AMPc mediado por MRP4 es crítico en la regulación de los niveles

intracelulares de este segundo mensajero en células acinares pancreáticas, por lo que la actividad o expresión alterada de este transportador puede tener repercusiones en el inicio, el curso y/o el resultado de la pancreatitis aguda (Rodríguez et al. 2011, Ventimiglia et al. 2015).

Finalmente, la otra posible función postulada para el transporte de este nucleótido fuera de la célula es la de proveer AMPc al espacio extracelular, en donde cumpliría un papel en la señalización intercelular.

2.5 El AMPc como mediador extracelular

Distintas hipótesis han sido propuestas respecto a la función del AMPc en el compartimiento extracelular. Algunos investigadores han sugerido que este nucleótido cíclico podría actuar como un “tercer mensajero” proporcionando una señal intercelular, o bien, a través de su metabolización en el espacio extracelular que lleva a la producción de adenosina (*Esquema 4*) (Hofer and Lefkimmatis 2007). Estas ideas se encuentran fundamentadas en las observaciones mencionadas a continuación:

- El AMPc extracelular es capaz de modular funciones celulares específicas en determinados tejidos

Uno de los sistemas donde más se ha estudiado la acción del AMPc extracelular es en la denominada cascada pancreato-hepatorenal. En este sistema, la hormona glucagón, liberada por el páncreas en el sistema porta, produce un incremento de la señal del AMPc en los hepatocitos, causando un sustancial eflujo de este nucleótido cíclico a la circulación general. El AMPc en plasma es captado por el túbulo proximal renal, en donde posee un efecto natriurético y fosfatúrico, además de incrementar la tasa de filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal (Bankir et al. 2002).

Por otra parte, en estudios realizados en humanos, se registró un aumento de la frecuencia cardíaca segundos después de administrar AMPc, mientras que el gasto cardíaco aumentó unos minutos más tarde (Levine and Vogel 1965). *In vitro*, se ha observado que el AMPc en cardiomiocitos de diferentes vertebrados modula la actividad de los canales de sodio de manera rápida (<50ms), reversible y concentración-dependiente. Este último efecto parecería estar mediado por la interacción del AMPc con sitios específicos en la membrana plasmática, que involucrarían a un receptor acoplado a proteína G α i (Sorbera and Morad 1991).

En cambio, en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar, se ha observado que el AMPc modula la expresión de la prostaglandina H sintasa, proponiendo a las ecto-fosfodiesterasas como blancos específicos para el AMPc en la membrana plasmática (Elalamy et al. 2000).

Así mismo, se ha documentado que el AMPc extracelular estimula la eritropoyesis en ratones (Peschle et al. 1973, Schooley and Mahlmann 1975) y la síntesis de hemoglobina en la médula ósea de humanos (Brown and Adamson 1977). Más aún, Detrick y colaboradores demostraron que concentraciones nanomolares de AMPc y GMPc, pero no de adenosina o guanosina, estimulan la formación de colonias de progenitores mieloides (Detrick et al. 1992). A su vez, el AMPc excluido en forma sostenida por parte de linfocitos T CD4+ puede cumplir funciones inmunoregulatorias en forma paracrina, presentando un significativo efecto sobre la proliferación de células T vecinas (Vendetti et al. 2006). Además se ha observado en células de médula ósea de ratón que el AMPc induce la expresión del receptor de lipopolisacárido CD14 (Pedron et al. 1999).

- El AMPc extracelular se une específicamente a la membrana plasmática de distintos tipos celulares

En paralelo a los trabajos anteriormente mencionados en los cuales se describen diversas funciones asociadas al AMPc extracelular, distintos estudios demostraron que el AMPc presenta sitios de unión a la membrana plasmática de ciertos tipos celulares. En 1975 se demostró que el AMPc se une a la membrana de células de la corteza renal de conejo, en forma reversible y dependiente de la temperatura (Insel et al. 1975). Ese mismo año, fueron reportados hallazgos similares en células renales de cerdo (Forte et al. 1975). Por otra parte, en células de carcinoma de colon, el AMPc se une a la membrana plasmática, proponiendo los autores una ecto-PKA como responsable de esta interacción (Kondrashin et al. 1999). También se han detectado sitios de unión específicos en la membrana de células de médula ósea de ratón. Esta unión fue saturable, reversible y prevenida por tripsina. Ensayos con varios análogos llevaron a concluir que el AMPc posiblemente estaría interactuando con receptores purinérgicos no convencionales (Pedron et al. 1999).

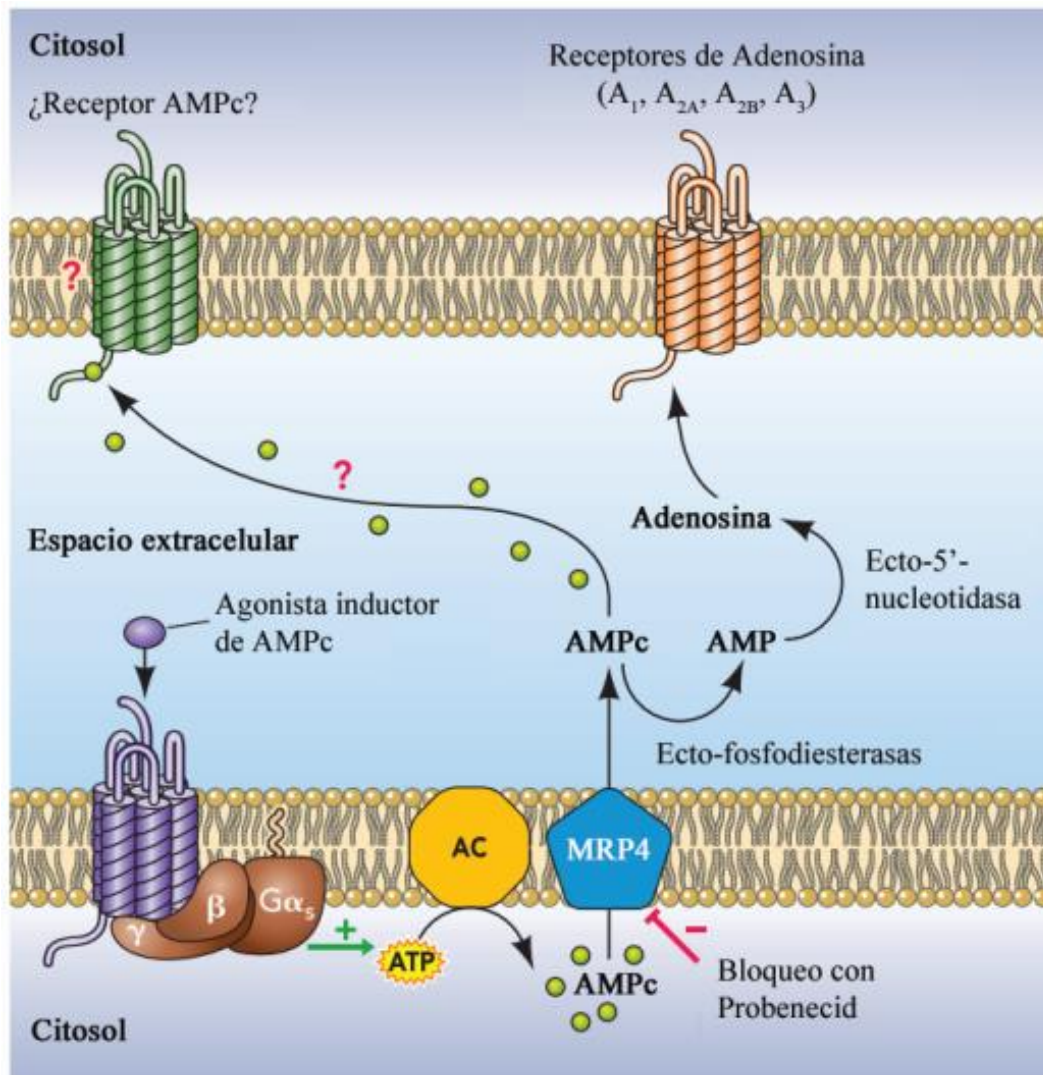
*- Han sido identificados receptores a AMPc en la ameba social *Dyctiostellium discoideum**

En adición las observaciones anteriores, la teoría de un posible receptor de AMPc en mamíferos encuentra sustento en la existencia de los mismos en la ameba *Dictyostelium discoideum*. En este organismo eucariota, el AMPc extracelular actúa como un quimioattractante, interactuando sobre receptores específicos denominados cAR (del inglés *cyclic AMP receptors*). De esta forma, en condiciones de estrés, la señalización del AMPc desencadena la agregación de células individuales en un organismo multicelular (Sun et al. 1990). Los receptores cAR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y hasta el momento se han identificado cuatro subtipos: cAR1, cAR2, cAR3 y cAR4; cuyas afinidades van del orden nanomolar a micromolar (Kim and Devreotes 1994). Hasta la fecha, no se han reportado homólogos en mamíferos de estos receptores, sin embargo, cabe destacar que estos receptores comparten una débil homología con la familia de receptores de secretina, que incluye a los receptores de calcitonina y la paratohormona. Si bien estos antecedentes permitieron especular con que esta clase de GPCRs podría mediar las acciones del AMPc extracelular en vertebrados, nunca pudo probarse dicha interacción (Bankir et al. 2002).

- *En numerosos tejidos se ha demostrado que el AMPc excluido puede actuar como sustrato de una vía enzimática que lleva a la producción secuencial de 5'-AMP y adenosina*

Una amplia serie de experimentos con animales llevados a cabo por Jackson y colaboradores han dado una vuelta de tuerca más al proceso de exclusión de AMPc. Estos investigadores mostraron que este nucleótido cíclico, al entrar en la circulación general desde el hígado, es capaz de sufrir una conversión enzimática a adenosina una vez que alcanza el riñón. La adenosina tiene una vida media corta en la circulación (~1s); por lo tanto, el AMPc (que es estable en plasma) puede considerarse como una especie de prohormona para la adenosina. Una vez producida, ya sea de forma local o en un sitio distante, la adenosina puede activar uno de los cuatro subtipos de receptores purinérgicos diferentes (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3). Esta vía metabólica, denominada vía extracelular AMPc-adenosina, está mediada por tres procesos: la exclusión de AMPc al espacio extracelular, la hidrólisis de AMPc a 5'-AMP por parte de ecto-fosfodiesterasas (ecto-PDE) y, finalmente, la conversión de 5'-AMP a adenosina por una 5'-nucleotidasa; siendo este último el paso limitante de la vía. En los últimos años, se ha documentado la existencia de esta vía extracelular en numerosos tejidos extra-renales,

incluyendo musculatura lisa vascular, fibroblastos cardíacos, corteza cerebral, hipocampo, microvasculatura cerebral, tejido adiposo e hígado, entre otros (Jackson and Dubey 2001, Jackson and Raghvendra 2004).



Esquema 4. El AMPc como mediador extracelular. Adaptado de Hofer y Lefkimmiatis 2007.

En resumen, la exclusión de AMPc mediada por MRP4 puede representar un mecanismo que, más allá de sus efectos sobre la regulación de sus niveles intracelulares, es capaz de proporcionar moléculas capaces de señalizar en forma autocrina y/o paracrina, ya sea mediante un efecto directo de este nucleótido cíclico o alguno de sus metabolitos.

2.6 MRP4: un emergente blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer

El gen de MRP4 fue identificado en 1997 (Kool et al. 1997). Se encuentra localizado en humanos en el cromosoma 13q32, y codifica para 3 isoformas distintas,

producto de su *splicing* alternativo: la isoforma 1 de MRP4 que posee la secuencia más larga (1325aa); la isoforma 2 que carece de los aminoácidos 679 al 725 (largo: 1248aa); y la isoforma 3, aún no confirmada experimentalmente, que presenta un cambio de secuencia entre los aa 846 y 859 y la delección de los aa 860-1325 (largo: 859aa) (Schuetz et al. 1999). Inicialmente, la expresión de MRP4 fue detectada en un número reducido de tejidos. Sin embargo, estudios subsiguientes demostraron que esta proteína se expresa de modo ubicuo en muchos tejidos, incluyendo próstata, riñón (van Aubel et al. 2002), tracto genital femenino (Gori et al. 2013), ovario, testículo (Robillard et al. 2012), hígado (Rius et al. 2003), intestino, músculo liso (Sassi et al. 2008), tracto urogenital, cerebro (Nies et al. 2004), glándula adrenal (Zelcer et al. 2003) y páncreas (Konig et al. 2005). A su vez, se encuentra presente en algunas células de la sangre, como células madre hematopoyéticas, plaquetas, eritrocitos, células dendríticas y macrófagos (Jedlitschky et al. 2004, van de Ven et al. 2008, Oevermann et al. 2009). Una característica única frente a otros transportadores ABC es su localización dual en células polarizadas, ya que puede encontrarse presente tanto en la membrana apical como en la basolateral en función del tejido o del tipo celular. Es así que ha sido detectada en células acinares de próstata, hepatocitos en la membrana basolateral, mientras que en los túbulos proximales de riñón y en el endotelio capilar cerebral se expresa en la membrana apical (Ritter et al. 2005, Borst et al. 2007, Russel et al. 2008).

Además de transportar AMPc y GMPc, como ya fue mencionado, MRP4 transporta una gran variedad tanto de sustratos biológicos involucrados en señalización como de drogas antivirales y antineoplásicas (*Tabla 2*).

MRP4/ABCC4	
Sustratos Fisiológicos	AMPc, GMPc, ADP, urato, ácido fólico, PGE ₁ , PGE ₂ , PGF _{2α} , TBX ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , esteroides conjugados (DHEAS, E ₂ 17βG)
	Formas conjugadas con GSH de taurocolato, colato, colilglicina, coliltaurina, deoxicolilglicina
	<i>ANTIVIRALES</i>
Sustratos Farmacológicos	PMEA, PMEG, ganciclovir, AZT, adefovir, tenofovir
	<i>ANTINEOPLASICOS</i>
	6-mercaptopurina, 6-tioguanina, metotrexato, topotecan
	<i>ANTIBIOTICOS</i>
	ceftizoxima, cefazolin, cefotaxima, cefmatazola

Tabla 2. Especificidad de sustratos de MRP4. Adaptado de Russel et al. 2008, Ritter et al 2005, Kruh et al 2007. Abreviaciones: DHEAS, sulfato de dehidroepiandrosterona; E₂17βG, estradiol-17β -D-glucuronido; LT, leucotrieno; PG, prostaglandina; TXB₂, tromboxano B₂; GSH, glutatión.

La importancia fisiológica y farmacológica de MRP4 se puso en evidencia con el desarrollo de ratones *knock-out* para este transportador (Kruh et al. 2007). Esta proteína está implicada en la distribución tisular, entrada al cerebro y toxicidad de análogos de nucleósidos, compuestos ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer, infecciones virales y enfermedades inflamatorias. Además, protege al hígado de la sobrecarga de ácidos biliares y contribuye a la secreción tubular de varias drogas, ya que se posee en una elevada expresión en el túbulo proximal del riñón. (Russel et al. 2008).

Si bien MRP4 no ha sido validado aún como un posible blanco terapéutico, su especificidad para moléculas de señalización y su perfil de localización en tejidos sugieren que los inhibidores específicos de este transportador proporcionarían nuevos enfoques terapéuticos para inhibir la nocicepción y la inflamación, prevenir el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular, y mejorar la penetración en el cerebro de los nucleósidos antivirales. A su vez, los inductores o potenciadores alostéricos podrían ser útiles en el tratamiento de la hiperuricemia, colestasis y diarrea secretora. Sin embargo, el enfoque terapéutico de MRP4 aún requiere del diseño de compuestos más potentes y específicos que los actualmente disponibles. Dado que los ratones *knock-out* de *Mrp4* no presentan anormalidades evidentes, se espera que los efectos secundarios de los inhibidores sean limitados (Russel et al. 2008).

Desde su descubrimiento, la investigación sobre MRP4 se ha centrado en dilucidar su papel en la fisiología y la fisiopatología humana, así como en la identificación de sus sustratos, inhibidores y el perfil de resistencia asociado al mismo. Dada su capacidad para transportar agentes quimioterapéuticos, el estudio del papel de MRP4 en cáncer ha tenido un rol central.

En el cáncer de próstata, por ejemplo, MRP4 ha sido descrito como uno de los transcritos más frecuentemente sobre-expresados, observándose mayores niveles de ARNm en células malignas con respecto al tejido benigno (Ho et al. 2008, Montani et

al. 2013). Los andrógenos cumplen un papel importante en la fisiología de la próstata, tanto en células normales como tumorales. De hecho, se ha descrito que alteraciones genéticas en la señalización de estas hormonas esteroideas a nivel de sus receptores se encuentran relacionados con el desarrollo de células malignas de próstata (Shand and Gelmann 2006). En este contexto, se ha detectado que MRP4 es un gen regulado por andrógenos, en particular dihidro-testosterona, tanto en células tumorales dependiente como independientes de andrógenos. Más aún, la disminución de MRP4 en estas células las sensibiliza a los efectos citotóxicos del metotrexato, un análogo de nucleótido. A pesar de ello, dado que MRP4 no transporta ninguna de los quimioterápicos utilizados de rutina para el tratamiento del cáncer de próstata, se considera improbable su participación en su resistencia a drogas. Por lo tanto, se ha sugerido que su rol en la progresión tumoral podría estar mediado por la exclusión de PGE-1 y -2, promoviendo procesos inflamatorios, los cuales son reconocidos promotores de la carcinogénesis (Ho et al. 2008). A su vez, en estas neoplasias, menores niveles de MRP4 fueron asociados a una mejor prognosis y a un avance en el grado de progresión tumoral (Montani et al. 2013).

En el caso de los neuroblastomas, el tipo de neoplasia maligna más común de la niñez, se ha detectado que el transportador MRP4 se encuentra sobre-expresado. Estos tumores se caracterizan por presentar frecuentemente alteraciones en el oncogén MYCN, que se encuentran asociadas a una rápida progresión tumoral, grado tumoral avanzado y mala prognosis. En relación a esto, la expresión de MRP4 correlacionó con la amplificación de MYCN y con una mala prognosis, y, mediante estudios de inmunoprecipitación, se determinó que MYCN es capaz de regular la expresión de ARNm de este transportador (Norris et al. 2005). Más aún, tanto el silenciamiento como la inhibición farmacológica de MRP4 disminuyeron la proliferación celular, la clonogenicidad e indujeron cambios morfológicos de diferenciación en líneas celulares de neuroblastoma. De forma similar a lo observado en próstata, dado que ninguna de los quimioterápicos utilizados de rutina para el tratamiento de estas neoplasias eran sustratos de MRP4, las observaciones indicaron que este transportador contribuye a la biología tumoral más allá de sus capacidades de excluir drogas (Henderson et al. 2011). En su conjunto, los estudios *in vitro* y los datos clínicos determinaron la importancia de MRP4 como un factor pronóstico independiente y como un potencial blanco terapéutico para los neuroblastomas (Huynh et al. 2012).

Los glioblastomas, en cambio, son los tumores malignos del sistema nervioso central más frecuente en adultos, y continúan asociados a una mala prognosis y a una tasa de supervivencia menor a 1 año a pesar de los recientes avances terapéuticos (Louis et al. 2007). Uno de los motivos principales para este fenómeno es la elevada resistencia a quimioterápicos, que se correlaciona con la expresión y actividad de los transportadores ABC. Dado que MRP4 no excluye ni vincristina ni etopósido, drogas de primera línea para el tratamiento de este tipo de tumores, a la fecha únicamente dos trabajos investigaron su expresión en glioblastomas. En una primer instancia, Decleves y colaboradores identificaron su expresión en líneas celulares de este tipo de tumores cerebrales (Decleves et al. 2002). Posteriormente, Rama y colaboradores, determinaron que su expresión es de baja a nula en las células madre tumorales (CSC, del inglés *cancer stem cells*) de glioblastoma, mientras que la misma aumenta conforme avanza el grado de diferenciación. Dadas estas observaciones se sugirió que la inhibición de MRP4 podría servir para disminuir la masa tumoral alrededor de estas CSC, las cuales serían más sensibles a drogas citotóxicas dada su baja expresión de transportadores ABC (Rama et al. 2014).

En líneas celulares de cáncer de colon también se ha identificado la expresión de MRP4 (Lin-Lee et al. 2001). Actualmente, el tratamiento sugerido para cáncer rectal localmente avanzado consiste en radioterapia en combinación con 5-FU. En estos pacientes, la expresión de este transportador fue asociada con mala respuesta al esquema de radioterapia neoadyuvante mencionado y a mala prognosis. Más aún, el silenciamiento de MRP4 aumentó la supresión tumoral inducida por la radioterapia *in vivo*, indicando su participación en la radiosensibilidad de estas células (Yu et al. 2013, Yu et al. 2014).

Como fue mencionado para otros tipos de tumores, en cáncer gástrico la quimioresistencia a través de transportadores ABC es una causa común de falla terapéutica. A la fecha, el régimen de referencia para su tratamiento consiste en la combinación de 5-FU con cisplatino (Nishiyama 2008). En las líneas celulares de cáncer gástrico resistentes a cisplatino, se detectó una mayor expresión de MRP4 y su silenciamiento aumentó la sensibilidad de estas líneas a este quimioterápico. Esta reversión del fenotipo de resistencia se produjo incluso a pesar de que el cisplatino no es sustrato de este transportador, lo cual sugiere que una molécula de señalización

endógena transportada por MRP4 podría ser la responsable de este fenómeno (Zhang et al. 2010).

Los compuestos en base a platino son comúnmente utilizados para el tratamiento de otros tumores sólidos incluyendo cáncer de ovario y pulmón. En el caso del cáncer de ovario, el tratamiento estándar consiste en la combinación platino/paclitaxel (Herzog 2006). A pesar del fuerte éxito de esta quimioterapia, la aparición de resistencia mediada por MRPs es la principal causa de falla terapéutica. En relación a esto, líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a compuestos de platino presentaron niveles aumentados de MRP1 y MRP4 (Beretta et al. 2010). Al igual que en otros tipos de tumores, la transformación neoplásica del cáncer de ovario es, en parte, accionada por el oncogén KRAS, y su desregulación se encuentra vinculada con la aparición de resistencia a distintas terapias (Chong and Janne 2013). Por lo tanto, es interesante remarcar que en células epiteliales de ovario de rata, la mutación de KRAS conduce a la sobre-expresión de MRP4 (Tchernitsa et al. 2004). Más aún, en un estudio retrospectivo usando muestras de pacientes con carcinoma de ovario epitelial se determinó que la expresión de MRP4 es un indicador desfavorable sobre el riesgo de relapso de la enfermedad (Bagnoli et al. 2013).

Por otro lado, tanto el cisplatino como el carboplatino se han estudiado extensamente para el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non-small cell lung cancer*). Estos agentes pueden ser conjugados con glutatión dentro de la célula tumoral y luego ser excluidos por varios transportadores, incluyendo MRP4, lo cual conlleva a la falla terapéutica. En particular, un polimorfismo de nucleótido simple dentro del gen de MRP4 ha sido asociado con la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón tratados con estos agentes, indicando el rol de este transportador en el fenotipo de MDR para estos compuestos (Moyer et al. 2010). A su vez, en líneas celulares de cáncer de pulmón y en tejidos de cáncer pulmonar de células pequeñas y NSCLC se determinaron elevados niveles de MRP4, a pesar de no haberse podido determinar una asociación entre su expresión y características clínicas (Young et al. 1999, Torky et al. 2005). El silenciamiento de MRP4 en las líneas celulares de cáncer de pulmón A549 y 801D produjo una inhibición en su proliferación, mientras que su sobre-expresión promovió su proliferación mediante la inducción del ciclo celular mediada por la fosforilación de la proteína pRb; indicando su importancia en la biología de estos tumores independientemente de su rol

como exportador de xenobióticos (Zhao et al. 2014). Además, en estos sistemas se observó que la sobre-expresión de COX-2 aumenta los niveles de MRP4 mediante la activación de la cascada de PGE₂ (Maeng et al. 2014). Sin embargo, la inhibición de esta enzima mediante el tratamiento con celecoxib también fue capaz de sobre-expresar a este transportador, lo cual implicaría una falta de sinergia de este compuesto con la quimioterapia convencional (Gradilone et al. 2007, Gradilone et al. 2008).

En el caso del carcinoma escamoso de esófago (CEE), cáncer con un fuerte componente hereditario, el análisis del genoma de hermanos discordantes indicó que la amplificación de MRP4 correlacionaba con el riesgo de CEE (Sun et al. 2014).

Por otro lado, la expresión de MRP4 en leucemias humanas tiene la capacidad de conferir resistencia a análogos de nucleósidos (6-mercaptopurina y 6-tioguanina), que son importantes agentes citostáticos utilizados en el tratamiento de las leucemias mieloides agudas (LMA). En pacientes adultos con distintos tipos de LMA (M0/M1, M2, M4 y M5), se detectó la presencia de MRP4 con considerable variabilidad. Mayores niveles de MRP4 se detectaron en los subtipos de leucemias menos diferenciadas M0/M1 en comparación con M2 (Guo et al. 2009). A su vez, nuestro laboratorio ha demostrado en líneas celulares de LMA que MRP4 inhibe la proliferación e induce diferenciación celular y apoptosis mediante la regulación de su sustrato endógeno AMPc (Copsel et al. 2011, Copsel et al. 2014).

Por último, la relevancia de MRP4 en adenocarcinomas ductales pancreáticos actualmente no se encuentra bien definida. Como se mencionó anteriormente, una de las principales causas de la mala prognosis de esta enfermedad es su elevada resistencia a agentes quimioterápicos. Gemcitabina fue durante varias décadas el tratamiento estándar, y actualmente se sigue utilizando en combinación con otras drogas. A pesar de no ser sustrato de MRP4, ha sido descrito que este transportador aumenta la sensibilidad a este quimioterápico en células de cáncer pancreático humano mediante un mecanismo desconocido (Skrypek et al. 2013). Por otra parte, en células de páncreas Capan-1 resistentes a 5-FU, ampliamente utilizado como neoadyuvante en radioterapia, se observó la sobreexpresión de MRP4, a pesar de que este transportador no confiere resistencia a esta droga, ni este nucleósido es sustrato del mismo (Hagmann et al. 2009). Por otra parte, MRP4 fue identificado en varias líneas celulares tumorales de PDAC aunque no pudo determinarse una asociación entre su expresión y los niveles normales de muestras de páncreas humanos o el grado de diferenciación tumoral (Konig et al.

2005). Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo de tesis, Zhang y colaboradores determinaron mayores niveles de proteína de MRP4 en tejidos de cáncer de páncreas con respecto a tejidos pancreáticos normales y pudieron establecer una correlación entre los niveles de expresión de esta proteína y el nivel de diferenciación de las células tumorales, sugiriendo que altos niveles de MRP4 pueden contribuir al desarrollo de PDAC de alto riesgo. Más aún, el silenciamiento de MRP4 en las células de PDAC PANC-1 y BxPC-3 condujo a una inhibición de la proliferación mediante la inducción de un arresto el ciclo celular en la fase G0/G1, a la vez que disminuyó la clonogenicidad de las células (Zhang et al. 2012). Por lo tanto, aún se requieren más evidencias con el fin de dilucidar el mecanismo subyacente que involucran a MRP4 en el desarrollo y progresión del cáncer de páncreas.

En resumen, MRP4 cumple un rol importante en la biología tumoral, vinculado en parte al fenómeno de resistencia a drogas, dada su capacidad de excluir una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, los distintos fenotipos que se observan al disminuir o bloquear la expresión de estos transportadores, su capacidad de transportar compuestos que actúan como promotores tumorales y su incremento en ciertas neoplasias, señalan que MRP4 tienen otra función en la biología tumoral más allá de la exclusión de drogas citotóxicas.

Más aún, los antecedentes mencionados muestran que los eventos involucrados en la carcinogénesis y las vías desreguladoras asociadas a proliferación pueden alterar la expresión constitutiva de MRP4 e incluso inducirla en tejidos que previamente no lo expresaban.

Sumado a lo anterior, ha sido demostrado que numerosos sustratos de este transportador, ya sean xenobióticos (como análogos de nucleósidos) o sustancias endógenas (como prostaglandinas y esteroides), tienen la capacidad de inducir su expresión, en una suerte de mecanismo de retroalimentación. En este sentido, dado que MRP4 tiene la capacidad de transportar AMPc, ha sido frecuentemente sugerido que este segundo mensajero podría modular la expresión de su transportador. Esta hipótesis encuentra sustento en base a la observación de que el tratamiento tanto con IBMX, un inhibidor no selectivo de fosfodiesteras, como con sildenafil, un inhibidor de PDE5, pueden inducir la expresión de MRP4, pero a la fecha este mecanismo no ha sido confirmado ni descrito (Sassi et al. 2008, Hara et al. 2011).

2.7 La validación de nuevos blancos terapéuticos y/o biomarcadores para el tratamiento del cáncer de páncreas

Como se mencionó anteriormente, los PDAC poseen un índice de supervivencia muy bajo como resultado de su elevada resistencia a terapias convencionales, su diagnóstico tardío y su alto potencial metastático. Sobre la base que en casi 40 años apenas se han producido avances en su tratamiento, sumado al aumento en su incidencia, resulta crítica y adquiere una alta relevancia biomédica la identificación de nuevos blancos terapéuticos efectivos y de biomarcadores adecuados para este tipo de tumores.

En los últimos años, los rápidos avances en el descubrimiento de la bases moleculares del cáncer, así como la disponibilidad de la información producto del proyecto genoma humano, han conducido a la expectativa de que el descubrimiento y desarrollo de medicamentos contra el cáncer podría ser más predecible y eficiente, logrando así el diseño de terapias más efectivas y seguras. Actualmente, se cree que la clave del éxito está en la terapia dirigida, es decir, en el desarrollo de fármacos que influyan en la acción o en la actividad de una vía de señalización específica o sobre algún constituyente de la misma. De esta forma, la definición actual de la validación de dianas consiste en evaluar el potencial terapéutico de un nuevo blanco en función de su relevancia causal con el cáncer, los efectos de la modulación de su actividad en los modelos experimentales disponibles y, por último, a partir del impacto clínico de su intervención. Por lo tanto, la validación de blancos, en el sentido más estricto, es simplemente un proceso de generación de hipótesis y contrastación de las mismas.

En base a lo anterior, Benson y colaboradores clasifican al proceso de validación de dianas en tres estrategias (Benson et al. 2006):

- Validación genética: engloba la evaluación de mutaciones somáticas o amplificación del gen, así como su expresión en tejidos normales en comparación a los tumorales. Cuando tales alteraciones genéticas se producen en genes asociados con cascadas de señalización, tanto el producto del gen mutado como sus efectores río abajo son considerados posibles dianas terapéuticas.

- Validación funcional en sistemas celulares: el uso de líneas celulares ha jugado un papel crítico en el estudio del cáncer en las últimas décadas, dada la posibilidad, entre otras cosas, de silenciar la expresión de un gen mediante la utilización de ARNi (ARN

de interferencia), pudiendo de esta forma predecir, aunque con limitaciones, el resultado de la inhibición específica del blanco en células tumorales.

-Validación en modelos animales: estrategia que incluye la utilización de ratones *knock out* y modelos de xenotransplantes de tumores en ratones. Estos ensayos incrementan en gran medida la capacidad de estudiar la eficacia de un posible tratamiento, al abordar el estudio del crecimiento tumoral en un entorno con mayor similitud al de los tumores originales.

A pesar de que cada estrategia es válida en sí misma, es necesaria una aproximación holística para asegurar el resultado en las etapas clínicas.

Un biomarcador es "una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos que es un signo de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad" (Instituto Nacional del Cáncer o NCI por sus siglas en inglés). En base a esto, los biomarcadores tienen muchas aplicaciones potenciales en oncología, incluyendo la evaluación de riesgos, la detección, el diagnóstico diferencial, la determinación del pronóstico, la predicción de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de la progresión de la enfermedad. Un biomarcador tumoral ideal, por lo tanto, debe ser detectado de forma específica (es decir, debe ser una sustancia secretada por el tumor de forma diferencial en relación a los tejidos normales), no invasiva (suero u orina) y de forma económica.

En el cáncer de páncreas, la detección temprana del mismo, al permitir que sea diagnosticado y tratado en su estado de lesión preinvasiva anterior a la metástasis, puede afectar en gran medida el tratamiento y el pronóstico de los pacientes con esta patología mortal. Desafortunadamente, el único biomarcador aprobado por la FDA, el CA19-9 (del inglés *carbohydrate antigen 19-9*), no es adecuado como marcador de detección precoz. Debido a este escenario, recientemente ha habido una explosión en el campo de biomarcadores para PDAC, con más de 2000 estudios publicados sobre miles de genes. Sin embargo, la mayoría de los mismos carecen de la sensibilidad y especificidad adecuada, indicando la gran necesidad de nuevos biomarcadores para el cáncer pancreático que permitan una detección precoz del mismo (Misek et al. 2007, Fong and Winter 2012).

Hipótesis

En función de los antecedentes mencionados, hemos postulado como hipótesis del presente trabajo de tesis doctoral que *“MRP4 media la exclusión de AMPc al espacio extracelular en células de adenocarcinoma ductal pancreático, siendo este proceso determinante en la capacidad proliferativa de dichas células. Dada la relevancia de este proceso regulatorio de los niveles de AMPc, la expresión de MRP4 se encuentra regulada a su vez por el balance entre el AMPc intra- y extracelular”*.

Objetivo general

Por lo tanto, nos proponemos como objetivo **“estudiar y caracterizar la regulación existente entre MRP4 y los niveles intra y extra celulares de AMPc así como sus implicancias en el proceso de proliferación celular, con el fin de validar un nuevo blanco farmacológico y/o biomarcador para el cáncer de páncreas y aportar al conocimiento en el área de transducción de señales y sus implicancias fisiopatológicas”**.

Con el fin de contrastar la hipótesis formulada y aportar las bases para la construcción del objetivo general propuesto, nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Caracterizar el proceso de exclusión de AMPc en líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático.

Objetivo específico 2: Establecer la relevancia de los MRPs, y en particular MRP4, en el proceso de exclusión de AMPc en este sistema.

Objetivo específico 3: Establecer la importancia de la exclusión de AMPc mediada por MRP4 en el proceso de proliferación celular *in vitro*.

Objetivo específico 4: Estudiar y caracterizar la modulación de la expresión de MRP4 frente al tratamiento con agentes moduladores de AMPc en líneas celulares pancreáticas.

Objetivo específico 5: Establecer la relevancia de la expresión y funcionalidad de MRP4 en el proceso de proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático *in vivo*.

Desarrollo de los objetivos

Objetivo específico 1: *Caracterizar el proceso de exclusión de AMPc en líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático*

A pesar de haber sido caracterizado en numerosos tejidos, el proceso de exclusión de AMPc no ha sido descrito hasta la fecha en células de adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos. En consecuencia, nuestro primer objetivo será determinar su existencia en las líneas celulares de PDAC humano PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II. Con ese fin, se realizarán cinéticas de producción de AMPc y ensayos concentración-respuesta, midiendo los niveles intra- y extracelulares de este nucleótido cíclico frente al tratamiento con los siguientes agentes:

- Activadores de la AC: forskolina.
- Inhibidores de las fosfodiesterasas: metil-isobutil-xantina (MIX).
- Ligandos de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) del tipo Gs: amantamina (ligando del rH2) e isoproterenol (ligando del receptor β -adrenérgico).

Objetivo específico 2: *Establecer la relevancia de los MRPs, y en particular MRP4, en el proceso de exclusión de AMPc en células de adenocarcinoma ductal pancreático*

Para ello, se realizarán cinéticas de los niveles de AMPc tanto intracelulares como extracelular en presencia de inhibidores farmacológicos de MRPs (probenecid y MK571).

A su vez, con el fin de determinar la participación particular de MRP4 en este proceso, se evaluará la expresión de este transportador en las líneas de estudio mediante técnicas de western blot y PCR en tiempo real. Más aún, se evaluará el efecto del silenciamiento de la expresión del mismo en PANC-1 mediante técnicas de ARN de interferencia (iRNA). La caracterización de estas células con menor expresión de MRP4 será llevada a cabo mediante la cuantificación de ARNm y proteína de este transportador por PCR en tiempo real y western blot, respectivamente. A su vez, se realizarán ensayo de exclusión de AMPc para evaluar la correlación entre la expresión de MRP4 y el transporte de este nucleótido cíclico.

Objetivo específico 3: *Establecer la importancia de la exclusión de AMPc mediada por MRP4 en el proceso de proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático in vitro.*

Con el fin de caracterizar el papel del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 sobre la capacidad proliferativa de las células de PDAC, se evaluará el efecto de la inhibición farmacológica de MRPs sobre las células PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II. A su vez, dada la falta de inhibidores selectivos para este transportador, se determinará el efecto del silenciamiento específico de MRP4 sobre la proliferación de las células PANC-1. A continuación, se determinará el papel de los niveles de AMPc intra- y extracelulares sobre los efectos en la proliferación celular de la inhibición de MRP4, con el fin de identificar el mecanismo involucrado.

Objetivo específico 4: *Estudiar y caracterizar la modulación de la expresión de MRP4 frente al tratamiento con agentes moduladores de AMPc en las líneas celulares pancreáticas.*

Dada la frecuente desregulación de la señalización del AMPc en PDAC y el aumento en la expresión de MRP4 observado en tejidos tumorales con respecto a normales, se evaluará la capacidad de esta vía de modular los niveles de proteína y ARNm en células PANC-1. A su vez, se caracterizará el mecanismo involucrado a nivel transcripcional en esta regulación mediante ensayos de gen reportero en la línea celulares de rata de cáncer de páncreas exocrino AR42J.

Objetivo específico 5: *Establecer la relevancia de la expresión y funcionalidad de MRP4 en el proceso de progresión tumoral de células de adenocarcinoma ductal pancreático, in vivo.*

Para ello, se realizarán xenotransplantes de células PANC-1 con diferente grado de silenciamiento de MRP4 en ratones *nude* y *SCID*. Se evaluará la incidencia y el volumen tumoral, junto con sus características histológicas.

3. Resultados

3.1. Selección racional del modelo de estudio

La inaccesibilidad anatómica del páncreas, sumada a la elevada presencia de enzimas degradativas ha obstaculizado el estudio de la biología del páncreas normal y tumoral. A su vez, el establecimiento de cultivos primarios de tumores de páncreas es difícil debido a que los mismos son generalmente pequeños y fibróticos. Por lo tanto, el desarrollo y el uso de líneas celulares pancreáticas ha sido una de las herramientas que ha aportado mayor cantidad de información sobre su fisiopatología y sigue siendo un conveniente punto inicial para el descubrimiento y la prueba de conceptos (Iwamura and Hollingsworth 1999). Distintos reportes indican que las líneas celulares de PDAC recapitulan los acontecimientos genómicos que conducen a los cambios neoplásicos visto en muestras de pacientes, afirmación apoyada por el hecho que las cuatro mutaciones más comunes que ocurren en estos tumores (KRAS, p53, p16 y SMAD4) se encuentran en estas líneas celulares en porcentajes similares (Deer et al. 2010).

Los adenocarcinomas ductales se categorizan según criterios morfológicos que exhiben de acuerdo a su grado de diferenciación. Los tumores bien diferenciados (WD) poseen una formación glandular extensa, células cúbicas o cilíndricas y polaridad definida con actividad secretora; los tumores moderadamente diferenciados (MD) poseen menos estructuras ductales, mayor variación de tamaño y forma y menor evidencia de la polaridad celular típica de las células ductales; los tumores pobremente diferenciados (PD) muestran una proliferación difusa, estructuras ductales escasas o nulas y poca polaridad (Iwamura and Hollingsworth 1999). En función de esta clasificación se ha establecido una correlación entre el grado de diferenciación de las líneas de PDAC y su tasa de duplicación celular, siendo esta menor en las líneas más diferenciadas. A su vez, el grado de diferenciación se relaciona con el grado de malignidad del tumor al trasplantarse en ratones *nude*, donde las líneas PD generan tumores grado 3 (de “alto grado”) mientras que las MD y WD generan tumores grado 2/1 (de “bajo grado”) (Sipos et al. 2003).

Una de las primeras líneas celulares de un adenocarcinoma exocrino humano desarrollada fue la línea PANC-1 (Lieber et al. 1975). Las células PANC-1 se cultivaron a partir de un varón de 56 años con un adenocarcinoma en la cabeza del páncreas que invadió la pared duodenal y realizó metástasis en un ganglio linfático peripancreático. Es una línea pobremente diferenciada que presenta mutaciones en KRAS, p53 y p16.

Más aún, es uno de los modelos *in vitro* de cáncer de páncreas no endocrino más utilizados para estudios de tumorigenicidad.

El resto de las líneas propuestas como modelo de estudio son: BxPC-3 y HPAF-II. Las células BxPC-3 se cultivaron a partir de un adenocarcinoma en el cuerpo del páncreas de una mujer de 61 años de edad sin evidencias de metástasis (Tan et al. 1986). Es una línea medianamente diferenciada que no presenta mutaciones en K-Ras aunque sí en p53, p16 y Smad4. Por otra parte, HPAF-II es una línea bien diferenciada que se obtuvo a partir de la ascitis de un varón de 44 años de edad con adenocarcinoma de páncreas y metástasis en el hígado, el diafragma y los ganglios linfáticos (Metzgar et al. 1982). Al igual que PANC-1, presenta mutaciones en K-ras, p53 y p16.

Por lo tanto, sobre la base de los antecedentes descritos en la literatura científica y en función de su tipificación se puede definir el siguiente grado de diferenciación creciente en las líneas celulares de PDAC humano: PANC-1 < BxPC-3 < HPAF-II. En tal sentido, sobre dicha base racional fueron seleccionadas como modelo de estudio para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

3.2. Caracterización del proceso de exclusión de AMPc en células de adenocarcinoma ductal pancreático

A pesar de haber sido caracterizado en numerosos tejidos, el proceso de exclusión de AMPc no ha sido descrito hasta la fecha en células de adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos. En consecuencia, nuestro primer objetivo fue determinar su existencia en las líneas celulares de PDAC humano PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II. Con ese fin, fueron realizadas tanto cinéticas de producción-exclusión de AMPc, como ensayos concentración-respuesta frente al tratamiento con forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa (AC), en presencia o ausencia de isobutil-metil-xantina (IBMX), un inhibidor general de fosfodiesterasas (PDEs). En cada caso, fueron evaluados los niveles de AMPc intra- (AMPc-i) y extracelular (AMPc-e).

En una primera aproximación experimental realizamos los ensayos en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasas, frente a la exposición a forskolina 33μM. Dicho estímulo de la vía produjo un rápido aumento de los niveles de AMPc-i, llegando a un pico máximo alrededor de los 10min y luego disminuyendo en el tiempo hasta alcanzar nuevamente los niveles basales. Concomitantemente a este fenómeno, se observó en todas las líneas un aumento gradual de los niveles de AMPc-e a expensas del AMPc-i,

los cuales alcanzaron un máximo alrededor de los 60min. Es interesante remarcar que a este tiempo, el AMPc se encontró localizado predominantemente en el espacio extracelular en todas las líneas estudiadas (*Figura 1*).

Este resultado confirma la existencia de un proceso de exclusión de AMPc en las líneas de adenocarcinoma ductal pancreático humano estudiadas e indica que este proceso participa en la regulación de sus niveles intracelulares incluso en presencia de actividad de fosfodiesterasas, consideradas, al presente, las principales reguladoras de los niveles de este segundo mensajero.

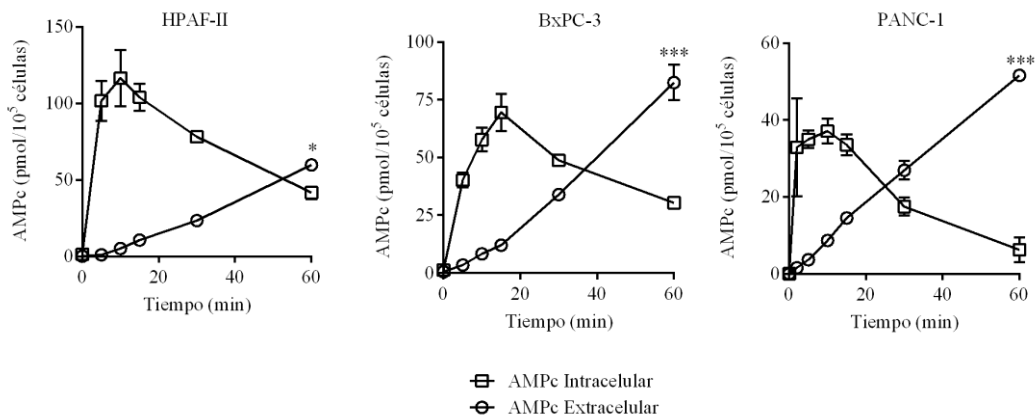


Figura 1. Cinéticas de producción de AMPc en células de PDAC humanas. Las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron tratadas con forskolina 33µM en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasas. Los niveles de AMPc-i (□) y AMPc-e (○) fueron determinados a los distintos tiempos indicados como se describe en la sección *Metodología*. * p<0,05; *** p<0,001 AMPc-e respecto a AMPc-i. Los resultados representan la media ± ESM (n=3).

A continuación, con el fin de caracterizar el vínculo entre el proceso de exclusión de AMPc y la actividad de las fosfodiesterasas, se evaluó la producción de AMPc-i y –e frente al tratamiento con forskolina pero, en esta ocasión, en presencia de IBMX. Ante la inhibición de las PDEs, la estimulación con forskolina indujo una respuesta de AMPc-i de mayor intensidad, manteniendo altos los niveles del mismo durante la duración de todo el ensayo. Del mismo modo, los niveles de AMPc-e aumentaron significativamente con respecto a los obtenidos en ensayos realizados en ausencia de IBMX (*Figura 2*). En función de estos resultados, se observa que, en ausencia de actividad de fosfodiesterasas, el proceso de exclusión de AMPc tiende a compensar la falta de degradación de este segundo mensajero incrementando la velocidad de

exclusión, con el fin de mantener acotados, en un rango determinado, los niveles del mismo dentro de la célula.

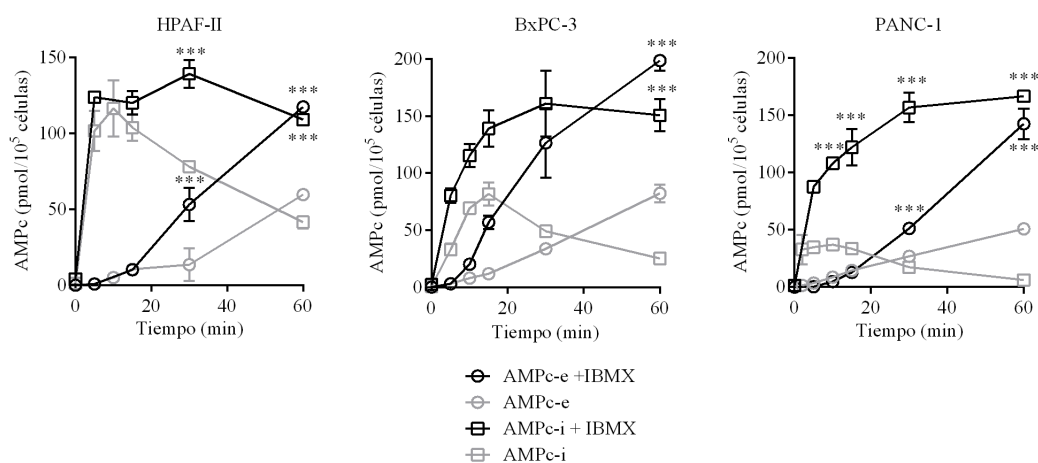


Figura 2. Cinéticas de producción de AMPc en presencia de IBMX en células de PDAC humanas. Las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron tratadas con forskolina 33 μ M en presencia (negro) o ausencia (gris) de IBMX 0,4mM. Los niveles de AMPc-i (\square) y AMPc-e (\circ) fueron determinados a los distintos tiempos indicados como se describe en la sección *Metodología*. *** p<0,001 respecto a células sin tratar con IBMX. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

Seguidamente, con el fin de determinar la capacidad de exclusión de las distintas líneas celulares estudiadas y su dependencia con la concentración del agente de estímulo de la vía, se realizaron ensayos concentración-respuesta a 15min frente al tratamiento con forskolina. En los mismos, se observó un aumento concentración-dependiente de los niveles de AMPc-e, paralelo a los de AMPc-i (*Figura 3A*). Por tal motivo, estos resultados indican la existencia de una correlación entre la concentración de forskolina y los niveles de AMPc-i y -e evocados. Más aún, el proceso de exclusión de AMPc resultó saturable, observándose curvas sigmoideas típicas de concentración-respuesta, en las que pudo estimarse una concentración efectiva (CE50) aparente para cada línea celular. Cabe destacar que este tipo de comportamiento corresponde a todo proceso de transporte mediado por proteínas. Con la intención de facilitar su análisis, se utilizaron los resultados obtenidos en el ensayo anterior para construir curvas de concentración de AMPc-e en función de los niveles de AMPc-i alcanzados (*Figura 3B*). Las curvas, así obtenidas, también siguieron funciones sigmoideas, en donde se observa que al incrementar los niveles de AMPc-i se obtiene una mayor concentración de este nucleótido en el compartimiento extracelular. Es interesante destacar que las tres líneas presentaron CE50 aparentes distintas (en este caso, pmoles de AMPc en el que se

observa 50% de la exclusión máxima), a partir de lo cual se infiere que el proceso de exclusión de AMPc en las células PANC-1 ($\log\text{CE}_{50}=1,31\pm 0,08$) sería más sensible que en las células BxPC-3 ($\log\text{CE}_{50}=1,87\pm 0,06$) y HPAF-II ($\log\text{CE}_{50}=2,6\pm 0,2$). Más aún, estos resultados indican que el transporte de AMPc al espacio extracelular en estas líneas depende de forma directa de los niveles de AMPc-i.

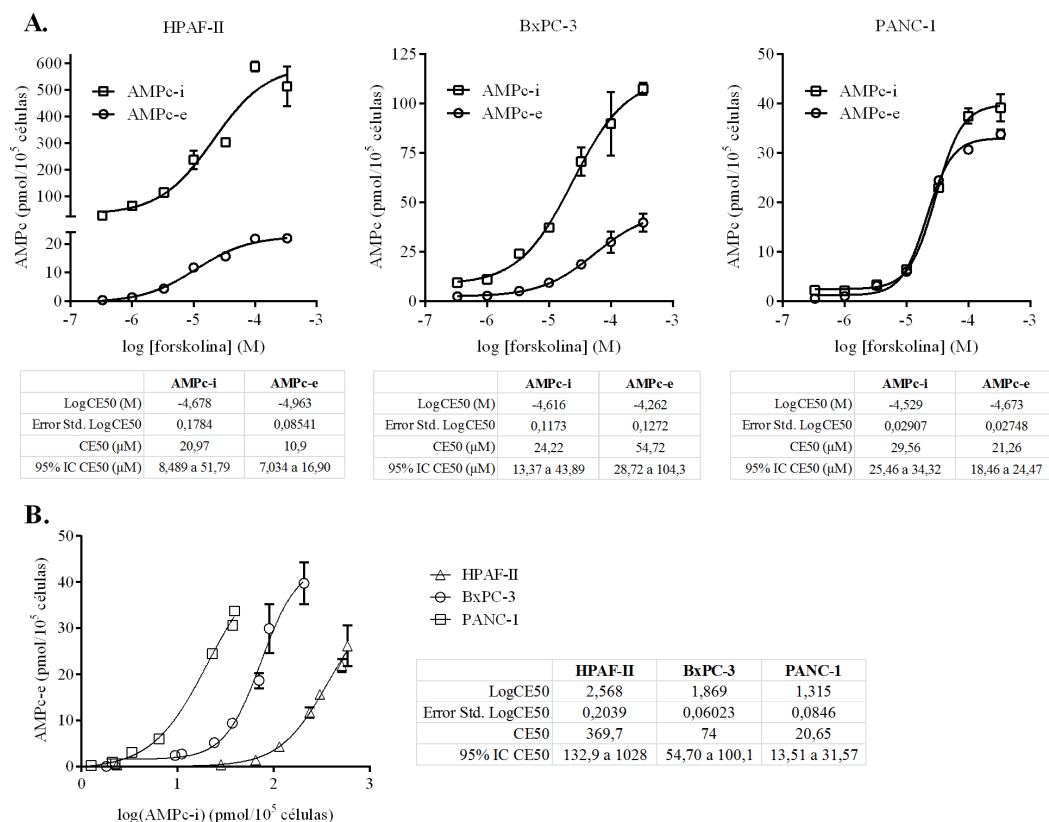


Figura 3. Curva concentración-respuesta de AMPc en células de PDAC humanas. **A.** Las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron tratadas con forskolina durante 15min a las distintas concentraciones señaladas. Los niveles de AMPc-i (\square) y AMPc-e (\circ) y los valores estadísticos fueron determinados como se describe en la sección *Metodología*. **B.** Curvas concentración-respuesta de AMPc-e en función del AMPc-i construidas a partir de los resultados del inciso A. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

Dado que todos los ensayos anteriores habían sido realizados en presencia de forskolina y con el objetivo de profundizar la caracterización del proceso de exclusión en nuestros modelos de estudio, se determinaron los niveles de AMPc frente al tratamiento con ligandos de receptores de siete pasos transmembrana (7TMR) acoplados a proteínas Gs. Para ello, se estimularon las células PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II durante 30min con isoproterenol, agonista de receptores β -adrenérgicos, o amantadina,

agonista de receptores a histamina, (Figura 4). En ambos casos se utilizaron concentraciones de los agentes tales que se obtuviera una respuesta máxima de AMPc. En las tres líneas ensayadas se observó que el tratamiento con los agonistas produce un incremento de los niveles de AMPc-i y, de forma coherente con los resultados anteriores, un incremento concomitante de los niveles de AMPc-e. Por lo tanto, estos resultados indican que el proceso de exclusión de AMPc es independiente de cual sea el agente que aumente los niveles de este segundo mensajero.

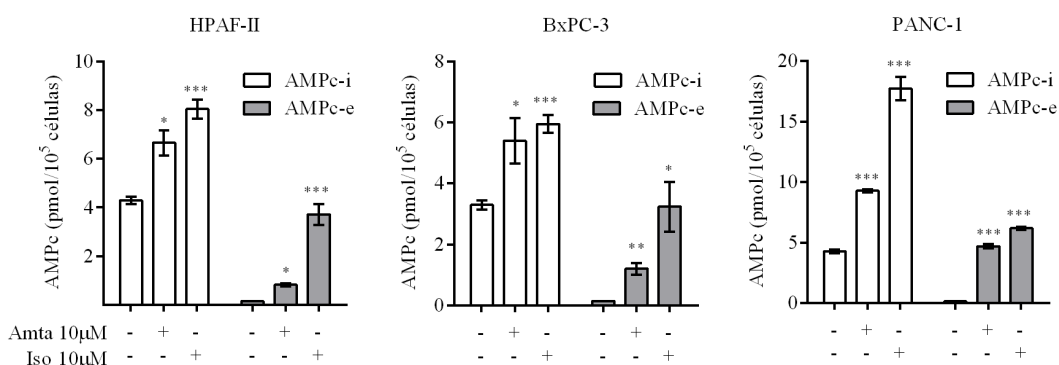


Figura 4. Respuesta de AMPc a agonistas de 7TMR en líneas de PDAC humanas. Las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron tratadas con Amtamina 10μM o Isoproterenol 10μM, según se indica en la figura, durante 30min. Los niveles de AMPc-i (blanco) y AMPc-e (gris) fueron determinados como se describe en la sección Metodología. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). Amta, Amtamina; Iso, Isoproterenol.

En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran la existencia del proceso de exclusión de AMPc al espacio extracelular en las líneas de adenocarcinoma ductal pancreático estudiadas y su participación en la regulación de los niveles intracelulares de este segundo mensajero.

3.3. Participación de las Proteínas Asociadas a Resistencia a Multidrogas (MRP) en el proceso de exclusión de AMPc en células de adenocarcinoma ductal pancreático

A continuación, decidimos determinar la relevancia de los MRPs en el transporte de AMPc en células de PDAC. Con este fin, las células HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron expuestas a dosis subtóxicas de Probenecid (0,5mM), un inhibidor general de MRPs, y a continuación, fueron realizadas las cinéticas de producción-exclusión de AMPc, frente al estímulo con forskolina en presencia de IBMX. El bloqueo de los

transportadores produjo una disminución significativa de los niveles de AMPc-e en todas las líneas, alcanzando valores menores en un 75% a los 60min (*Figura. 5A*). Por otra parte, es interesante destacar que en ninguna de las líneas evaluadas fue posible determinar una variación significativa de los niveles de AMPc-i. Teniendo en cuenta que la actividad de fosfodiesterasas se encontraba inhibida en estas condiciones, podemos suponer que el bloqueo del proceso de exclusión de AMPc resultó suficiente para modificar los niveles globales del segundo mensajero en el interior celular, sugiriendo la existencia de otros mecanismos compensatorios tendientes a regular los niveles intracelulares independientes de la actividad de PDEs.

De forma similar, en ensayos concentración-respuesta a forskolina en presencia de probenecid 0,5mM, la incubación con el inhibidor produjo una disminución en la exclusión del segundo mensajero en todas las concentraciones de forskolina ensayadas, a pesar de no modificar significativamente los niveles de AMPc-i en ninguna de las tres líneas (*Figura. 5B*).

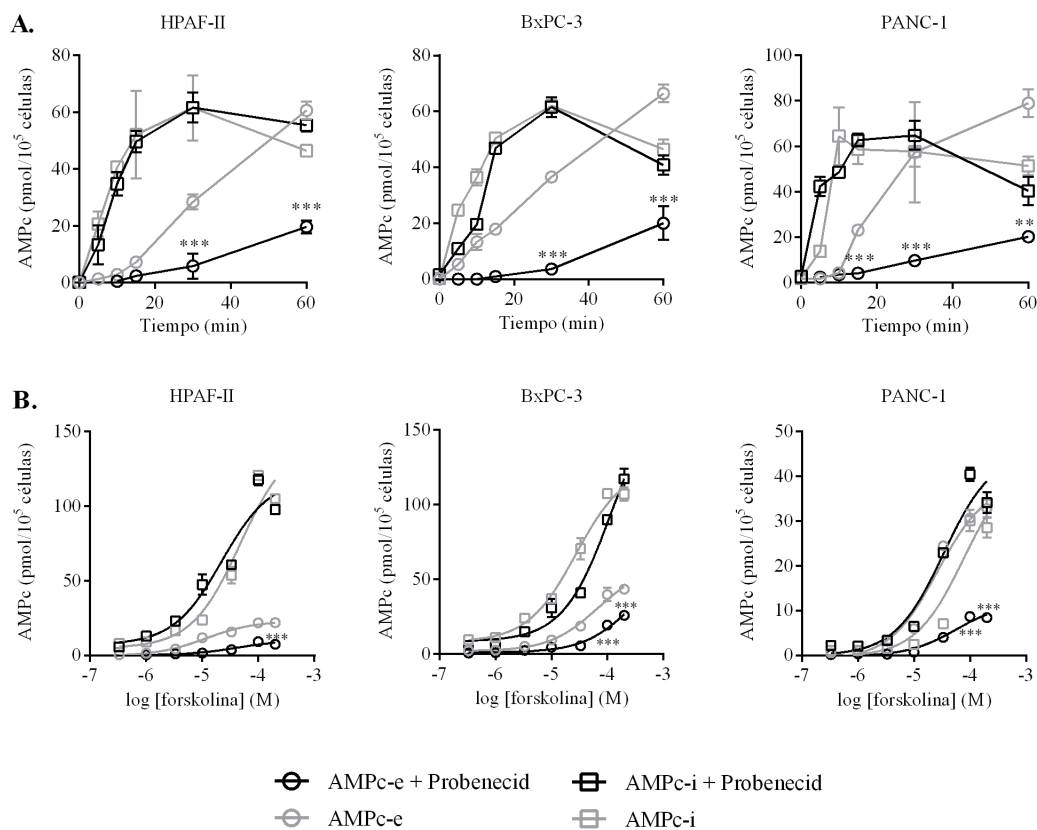


Figura 5. Efecto del probenecid sobre el proceso de exclusión de AMPc en líneas celulares de PDAC humano. **A.** Las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron tratadas con forskolina 33μM e IBMX 0,4mM en presencia (*negro*) o ausencia (*gris*) de probenecid 0,5mM por los tiempos indicados. *** p<0,001 respecto a células sin tratar con probenecid. **B.** Las líneas celulares humanas

nombradas fueron estimuladas con forskolina durante 15min a las distintas concentraciones señaladas previa incubación por 3min con probenecid 0,5mM. En ambos casos, los niveles de AMPc-i (\square) y AMPc-e (\circ) fueron determinados se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

Con el fin de profundizar la caracterización del efecto del probenecid sobre la exclusión de AMPc en nuestro modelo de estudio, se realizaron curvas-concentración respuesta a este inhibidor frente al tratamiento con forskolina 33 μ M. La incubación con probenecid produjo una disminución concentración-dependiente de los niveles de AMPc-e alcanzados por el tratamiento con forskolina (*Figura 6A*). Además, los mismos ajustaron a una curva sigmoidea donde fue posible estimar una CE50 aparente similar para todas las líneas. Al igual que en los experimentos anteriores, los niveles intracelulares alcanzados no se vieron modificados significativamente en ninguna de las concentraciones de probenecid ensayadas (*Figura 6B*).

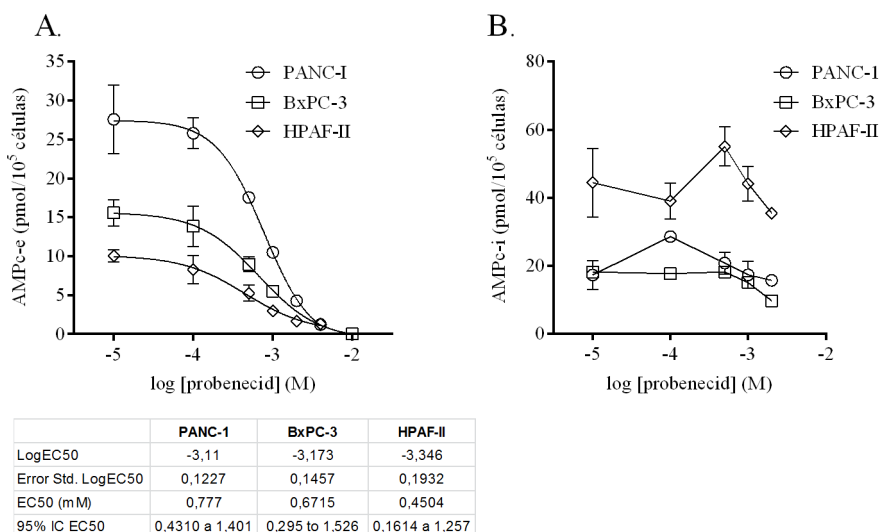


Figura 6. Curva concentración-respuesta de AMPc frente al tratamiento con probenecid en células de PDAC humanas. Las líneas celulares humanas HPAF-II (\diamond), BxPC-3 (\square) y PANC-1 (\circ) fueron tratadas con forskolina 33 μ M durante 30min luego de ser incubadas previamente con probenecid durante 3min a las distintas concentraciones indicadas. Los niveles de AMPc-e (**A.** izquierda) AMPc-i (**B.** derecha) y los valores estadísticos fueron determinados como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

Finalmente, a fin de confirmar los resultados obtenidos, las células fueron tratadas con MK571, un inhibidor selectivo de MRP1, 3 y 4. Luego de preincubarlas con el inhibidor, las células fueron tratadas con forskolina por 30min y, seguidamente, fueron

determinados los niveles de AMPc-i y -e. En forma similar a lo observado con probenecid, la inhibición farmacológica de los MRPs condujo a una disminución significativa de los niveles de AMPc excluidos al espacio extracelular, sin que se vean afectados sus niveles intracelulares (*Figura 7*).

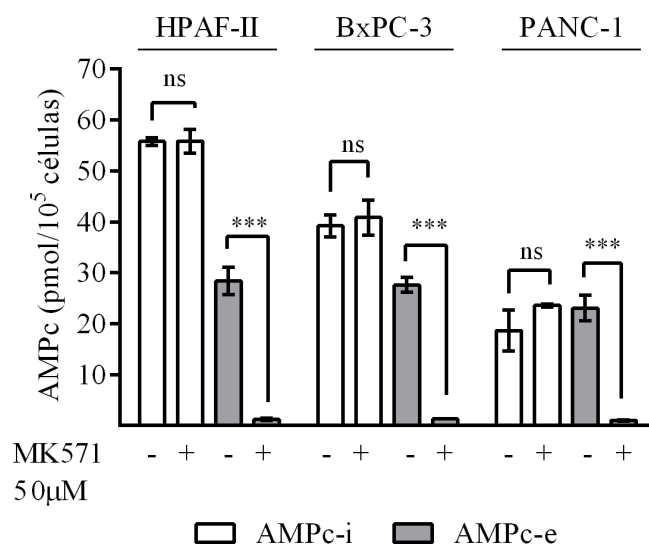


Figura 7. Efecto de MK571 sobre el proceso de exclusión de AMPc en células de PDAC humanas. Las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 fueron tratadas con forskolina 33µM durante 30min luego de ser incubadas previamente con MK-571 50µM durante 3min. Los niveles de AMPc-i (blanco) y, AMPc-e (gris) fueron determinados como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). *** p<0,001; ns no significativo

Los resultados emergentes del estudio del proceso de exclusión de AMPc expuestos hasta este punto fueron realizados luego del tratamiento con agentes que incrementan los niveles este segundo mensajero. Por lo tanto, en base a que ensayos anteriores indicaban que la cantidad de AMPc excluida al espacio extracelular dependía de forma directa de los niveles alcanzados en el compartimiento intracelular (*Figura 3*), surge el interrogante acerca de si este proceso es relevante en ausencia de estímulo. Con el fin último, de abordar dicho interrogante, se realizaron ensayos de acumulación de AMPc durante 1 hora en las células PANC-1 en ausencia de estímulos y frente al tratamiento con inhibidores de MRPs. En condiciones basales, fue posible detectar niveles de AMPc en el compartimiento extracelular, indicando que el proceso de exclusión de este nucleótido cíclico ocurre incluso en ausencia de estímulos. Más aún, al inhibir la actividad de los MRPs mediante el tratamiento con probenecid o MK571, los niveles de AMPc-e disminuyeron significativamente, indicando que este proceso es

susceptible de ser modulado farmacológicamente. Al igual que en los ensayos anteriores, se observó que la inhibición de la exclusión de AMPc al espacio extracelular no fue suficiente para modificar sus niveles intracelulares, lo cual indicaría que la misma habría sido compensada por mecanismos regulatorios tendientes a mantener los niveles intracelulares sin variaciones significativas (*Figura 8*).

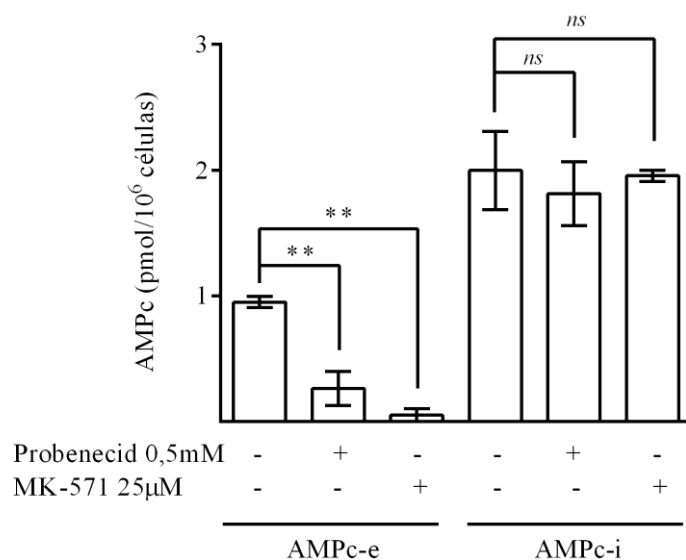


Figura 8. Exclusión basal de AMPc en células PANC-1. Ensayos de acumulación de AMPc fueron realizados en la línea celular PANC-1 durante 60min en presencia o ausencia de probenecid 0,5mM o MK-571 25µM. Los niveles de AMPc-e (*izquierda*) y, AMPc-i (*derecha*) fueron determinados como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). ** p<0,01; ns no significativo

Los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que el proceso de exclusión de AMPc es sensible tanto a probenecid como a MK571, lo que indica que la familia de transportadores MRPs se encuentra asociada a la exclusión de este segundo mensajero al espacio extracelular en las líneas de adenocarcinoma ductal pancreático estudiadas. A su vez, los mismos sugieren que la actividad de los MRPs es fundamental en la regulación del balance entre los niveles de AMPc intra- y extracelular, tanto en presencia como en ausencia de estímulos. Más aun, a pesar de su falta de selectividad, la inhibición del proceso de exclusión de AMPc inducida por MK-571, le confiere alta factibilidad a la hipótesis que MRP4 sería el miembro responsable de dicho proceso, dada la falta de afinidad de este compuesto por los otros miembros de la familia de MRPs descritos como transportadores de dicho nucleótido cíclico.

3.4. Expresión de MRP4 en células de adenocarcinoma ductal pancreático humano

Como se mencionó en la sección *Introducción*, los miembros 4, 5 y 8 de la familia de MRPs comparten como característica principal la capacidad de transportar nucleótidos cíclicos, como AMPc y GMPc. No obstante, en diversos reportes bibliográficos, MRP4 ha sido señalado como la principal proteína responsable del transporte de AMPc, en parte debido a que su afinidad por este segundo mensajero ($K_m=44,5\mu\text{M}$) es nueve veces mayor que la de MRP5 ($K_m= 379\mu\text{M}$) (Jedlitschky et al. 2000, Chen et al. 2001, Ritter et al. 2005, Copsel et al. 2011). Por tal motivo, y sumado a la observación experimental que MK-571 inhibe selectivamente dicho proceso, y con el fin último de identificar al principal responsable de la exclusión de AMPc en nuestro modelo, se centró inicialmente el foco de estudio sobre MRP4.

En una primera instancia la expresión de MRP4 fue evaluada a nivel del ARNm en las líneas celulares PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II. Para ello, se realizó la extracción del ARNm de las células, se sintetizó el ADNc correspondiente y se realizó la cuantificación relativa del ARNm mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos para el transportador. De esta forma, la expresión génica de MRP4 pudo ser detectada en las tres líneas de PDAC humano evaluadas (*Figura 9A*).

A continuación, se determinaron los niveles de proteína de MRP4 en las líneas de PDAC mediante ensayos de western blot utilizando un anticuerpo específico contra este transportador (*Figura 9B*). Nuevamente fue posible detectar la expresión de MRP4 en las tres líneas estudiadas, observándose una correlación entre los niveles relativos de proteína y ARNm.

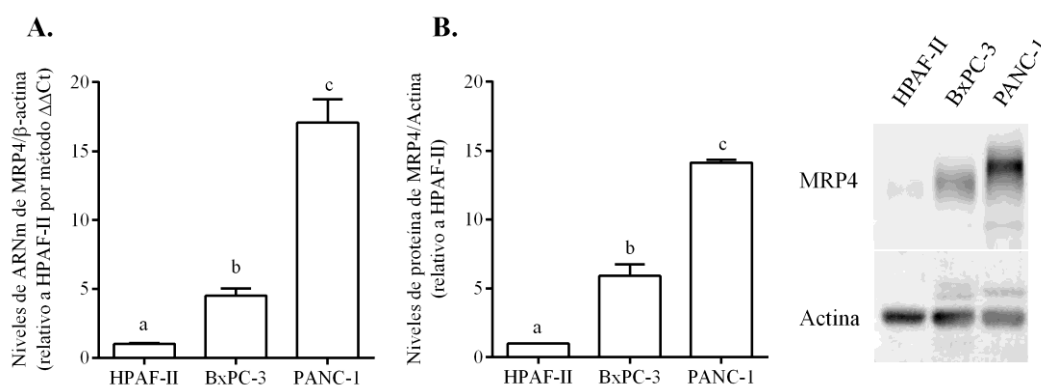


Figura 9. Expresión de MRP4 en líneas celulares de PDAC humanas. A. Cuantificación de ARNm de MRP4 mediante qPCR en las líneas celulares humanas HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1. Los resultados fueron normalizados al ARNm de β -actina y expresados en forma relativa a los niveles de HPAF-II como

se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). Distintas letras indican $p < 0,05$. **B.** Cuantificación de niveles de expresión de proteína de MRP4 realizado mediante la técnica de western blot en las líneas mencionadas. Se muestra la cuantificación por densitometría de las bandas de MRP4 normalizadas a Actina (*izquierda*) y un resultado de western blot representativo de tres experimentos independientes (*derecha*). Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). Distintas letras indican $p < 0,05$.

El análisis de los resultados experimentales previamente mostrados permite observar diferencias significativas en las cantidades de MRP4 expresadas por las distintas líneas celulares. En concreto, las células PANC-1 son aquellas que presentan mayores niveles de expresión de esta proteína (alrededor de 15 veces más que HPAF-II), seguidas por las células BxPC-3 (aproximadamente 5 veces más que HPAF-II). Vale la pena recordar que, en los resultados de la *Figura 3B*, se había observado la misma relación (PANC-1 > BxPC-3 > HPAF-II) respecto a la capacidad de exclusión de AMPc en las tres líneas celulares. En consecuencia, estos resultados refuerzan la hipótesis acerca de la participación de MRP4 en el proceso de exclusión de AMPc en las células de PDAC utilizadas como modelo de estudio.

Por otra parte, cabe citar aquí que en la selección del modelo se optó por tres líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático humano con distinto grado de diferenciación (PANC-1 < BxPC-3 < HPAF-II). Sobre esta base, se observa que las células menos diferenciadas, y por ende, de mayor malignidad, presentan mayores niveles de expresión de MRP4 que aquellas más diferenciadas.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran la expresión de MRP4 en las tres líneas celulares de PDAC evaluadas. Además, sugieren la existencia de una correlación entre el nivel de expresión de MRP4 y la capacidad de exclusión de AMPc y, a su vez, una relación opuesta con el grado de diferenciación de las líneas estudiadas.

3.5. Efecto del silenciamiento de MRP4 sobre el proceso de exclusión de AMPc en células PANC-1

Hasta el presente no se han desarrollado inhibidores farmacológicos específicos de MRP4. Por lo tanto, con el fin de confirmar el papel de este transportador en el proceso de exclusión de AMPc en células de PDAC, se decidió utilizar ARNi dirigido específicamente contra MRP4, para así obtener células que expresaran menores niveles

de dicha proteína. De las tres líneas estudiadas, las células PANC-1 fueron aquellas que presentaron mayores niveles de este transportador y, por lo tanto, fueron el modelo elegido para llevar a cabo el silenciamiento.

En la *Figura 10*, se esquematiza el protocolo realizado con el objetivo de reducir la expresión del MRP4 de forma estable en células PANC-1. Para ello, se utilizaron dos secuencias de shRNA específicas para MRP4 (MRP4-shRNA1 y MRP4-shRNA2) y, como control, una secuencia de shRNA de secuencia aleatoria (scramble-shRNA), todas ellas sintetizadas previamente por la Dra. Copsel (Copsel et al. 2011). Estas fueron ligadas al vector pSUPER.retro.puro y fueron cotransfectadas junto a dos plásmidos, pVSV y pGAG, en células HEK293T empaquetadoras, con el fin de obtener lisados virales. A continuación, las células PANC-1 fueron infectadas con estos lisados y, luego de 3 semanas de selección con puromicina, se realizaron diluciones seriadas de las mismas hasta obtener una única célula por pocillo. De esta forma, se obtuvieron poblaciones clonales de PANC-1 que expresaban establemente las secuencias de interés.

MRP4-shARN1

5' GATCCCCCAGTGTTCTTACACTTCCTTTCAAGAGAAGGAAGTGTAAGAACACTGTTTTTA 3'
 3' GGGGTCACAAGAATGTGAAGGAAAGTTCTCTTCCTTCACATTCTTGTGACAAAAATTCTGA 5'

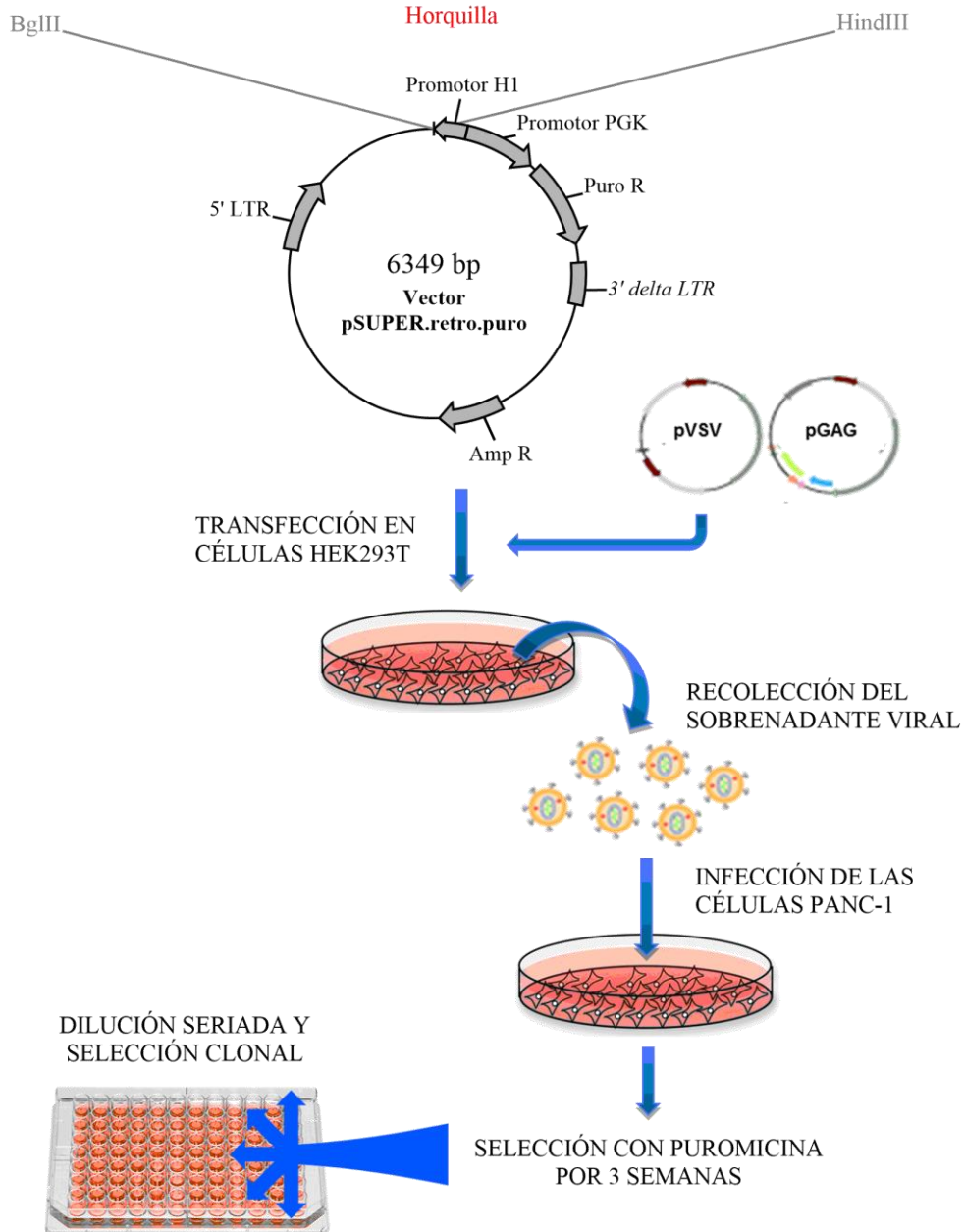


Figura 10. Esquema de la obtención de células PANC-1 que expresan de forma estable la secuencia MRP4-shRNA1. El mismo procedimiento se utilizó tanto para la secuencia MRP4-shRNA2 (*primer* sentido 5'-GATCCCCGATGGTGCATGTGCAGGATTTCAAGAGAATCCTGCACATGCAGCATCTTTTA-3' y *primer* antisentido 5'-AGCTTAAAAAGATGGTGCATGTGCAGGATTCTCTTGAAATCCTGCACATGCAGCATCGGG-3' como para la scramble-shRNA. Esta última posee una secuencia que no es complementaria con ningún gen humano.

A continuación, los distintos clones obtenidos fueron caracterizados evaluando la expresión de MRP4 tanto a nivel de ARNm, como a nivel de proteína, mediante ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real y western blot respectivamente. En la *Figura 11*, se muestran los resultados obtenidos en los clones seleccionados para cada secuencia. Las células PANC-MRP4sh1 presentaron una menor expresión de MRP4 con respecto a las PANC-scramble tanto a nivel del ARNm ($44\pm 9\%$) como a nivel de la proteína ($49\pm 6\%$) (*Figura 11A*). En las células PANC-MRP4sh2, los niveles de MRP4 también se encontraron disminuidos, aunque en menor proporción, siendo su expresión $61\pm 9\%$ y $69\pm 4\%$, con respecto a PANC-scramble, a nivel del ARNm y de la proteína respectivamente (*Figura 11B*).

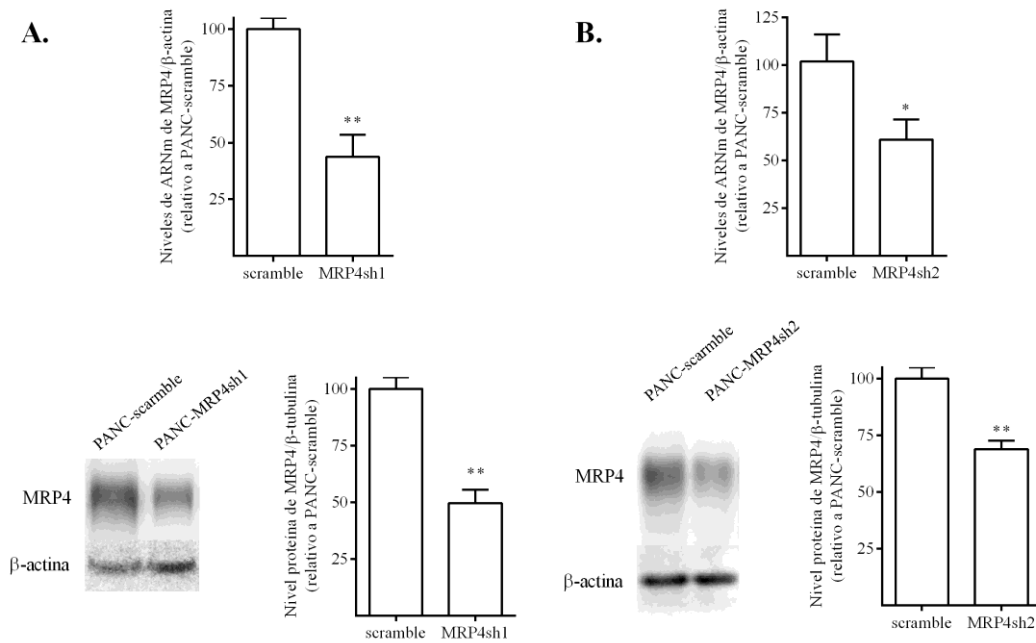


Figura 11. Expresión de MRP4 en las células PANC-scramble, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2. Caracterización de los clones PANC-sh1 (**A**) y PANC-sh2 (**B**). En ambos casos, el panel *superior* indica los niveles de ARNm de MRP4 relativizados a β -actina determinados por qPCR. Los niveles de ARNm de MRP4 en las células PANC-scramble se consideraron como 100%. El panel *inferior* indica la determinación de los niveles de expresión de MRP4 por western blot de las células PANC-MRP4sh. La proteína β -actina fue utilizada como control de carga. El gráfico de barras corresponde a la densitometría realizada mediante el programa Image J 1.44 (NIH). Se asignó el 100% a la intensidad de banda obtenida en las células PANC-scramble (control). Los datos representan la media \pm ESM (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Dado que MRP4 no es el único transportador con la capacidad de excluir AMPc al espacio extracelular, se comprobó la expresión de ARNm mediante qPCR de los otros

miembros de la familia de MRP con esta capacidad. Como se muestra en la *Figura 12*, los niveles de MRP5 y 8 no fueron modificados en ninguno de los clones como producto del silenciamiento de MRP4, descartando, en estos clones, la existencia de un mecanismo compensatorio capaz de regular la expresión de otros MRP relacionados con la exclusión de AMPc.

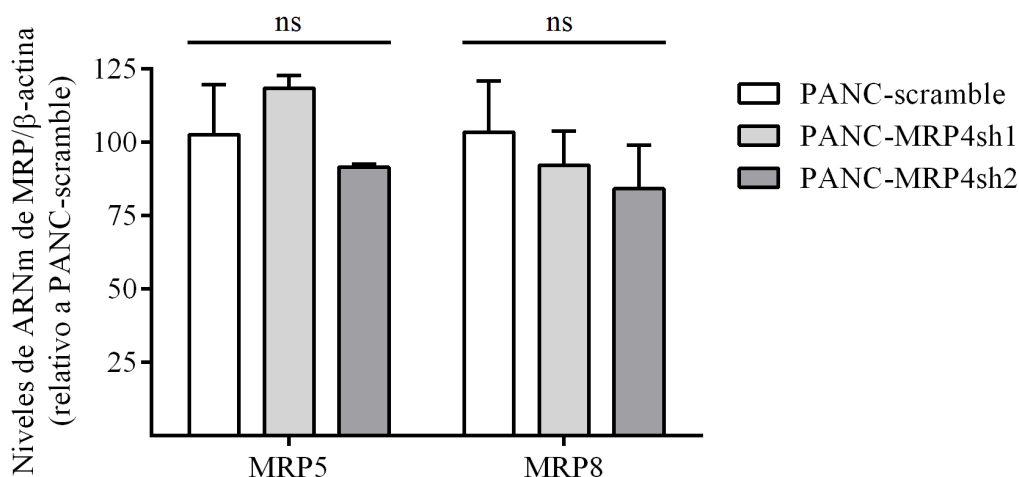


Figura 12. Expresión de MRP5 y 8 en las células PANC-scramble, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2. Caracterización de los niveles de expresión de MRP5 (izquierda) y 8 (derecha) relativos al ARNm de β -actina, determinados por qPCR en los clones PANC-scramble (*blanco*), PANC-sh1 (*gris claro*) y PANC-sh2 (*gris oscuro*). Los niveles de ARNm de MRP4 en las células PANC-scramble se consideraron como 100%. Los datos representan la media \pm ESM (n=3). *ns*: no significativo.

Como fue mencionado, el objetivo de utilizar esta estrategia era evaluar la implicancia de MRP4 en el proceso de exclusión de AMPc, por lo tanto, luego de corroborar que ambos clones seleccionados PANC-MRP4sh expresaban menores niveles de dicha proteína, se determinó si las cinéticas de producción-exclusión de este segundo mensajero se encontraban alteradas. Para ello, se evaluaron a distintos tiempos los niveles de AMPc-i y -e en las células PANC-MRP4sh1, PANC-MRP4sh2 y PANC-scramble luego del tratamiento con forskolina 33 μ M. Los resultados experimentales indican que ambos clones PANC-MRP4sh excluyen una menor cantidad de AMPc al compartimiento extracelular (*Figura 13A*), sin modificar significativamente sus cinéticas en el compartimiento intracelular (*Figura 13B*). En concordancia con nuestra hipótesis, el nivel de silenciamiento obtenido en los clones en estudio correlacionó con la capacidad de exclusión de AMPc. En tal sentido, mayores niveles de silenciamiento (PANC-MRP4sh1) determinaron una acumulación significativamente menor del

nucleótido cíclico en el espacio extracelular en relación al clon con menores niveles de silenciamiento (PANC-MRP4sh2).

Debido a que las células PANC-MRP4sh1 presentaron un mayor silenciamiento de la expresión MRP4 respecto de las PANC-MRP4sh2, y a fin de continuar con los ensayos propuestos para esta tesis, se decidió continuar los estudios únicamente con las células PANC-MRP4sh1.

A fin de caracterizar la capacidad de exclusión de estos clones, se realizaron ensayos concentración-respuesta a forskolina en las células PANC-MRP4sh1 y PANC-scramble. Los resultados obtenidos fueron nuevamente expresados como los niveles de AMPc en el compartimiento extracelular en función de los niveles de AMPc-i. De esta manera, se observó que el silenciamiento de MRP4 provocó un corrimiento hacia la derecha de la curva sigmoidea obtenida (*Figura 13C*). Este fenómeno se ve reflejado en un aumento significativo de la CE50 aparente de 4 a 12 pmoles aproximadamente. Es necesario resaltar que se trata de una CE50 aparente, ya que intenta correlacionar los niveles de AMPc intracelular y la dependencia con el proceso de exclusión. En consecuencia, estos resultados indican que el silenciamiento de MRP4 produce una disminución de la capacidad de exclusión de AMPc de las células PANC-1.

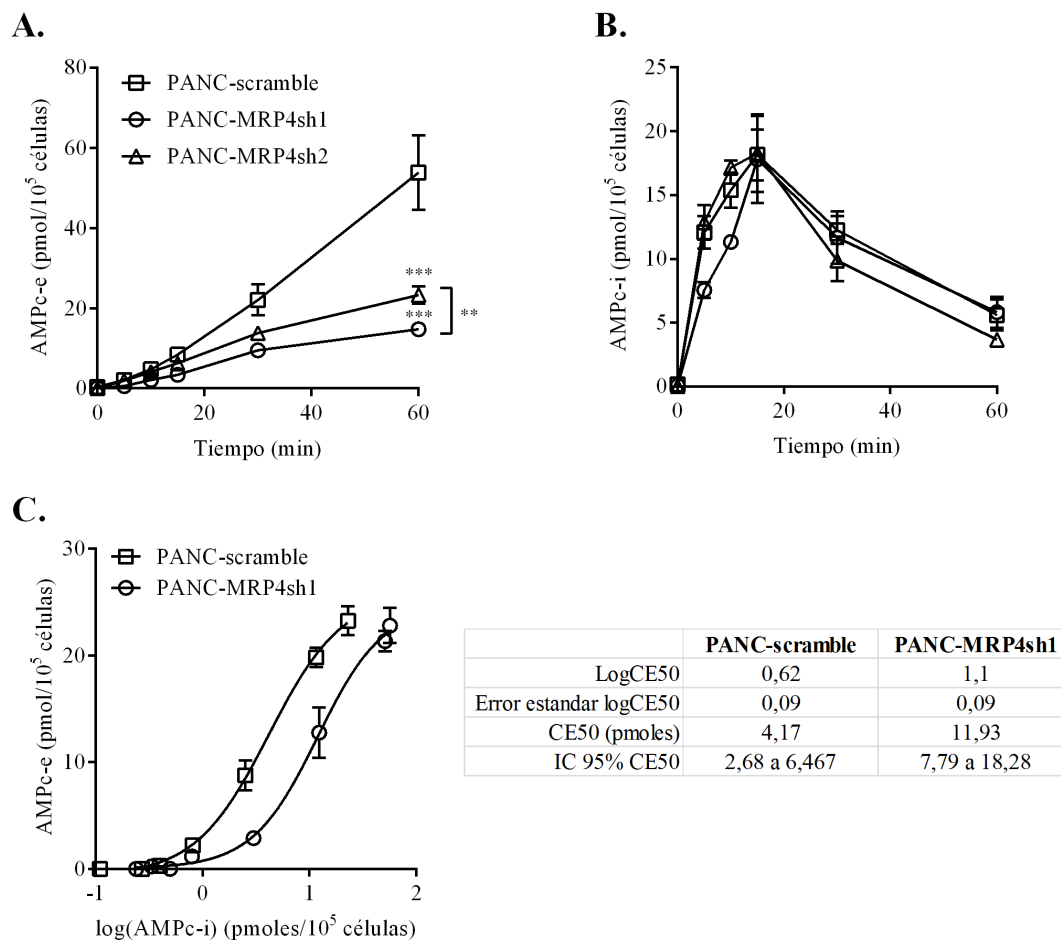


Figura 13. Efecto del silenciamiento de MRP4 sobre el proceso de exclusión de AMPc frente al tratamiento con forskolina. **A, B.** Las células PANC-scramble (□), PANC-MRP4sh1 (○) y PANC-MRP4sh2 (△) fueron tratadas con forskolina 33μM en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasas. Los niveles de AMPc-e (*derecha*) y AMPc-i (*izquierda*) fueron determinados a los distintos tiempos indicados como se describe en la sección *Metodología*. ** p<0,01; *** p<0,001 con respecto a PANC-scramble. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). **C.** Las células PANC-scramble (□) y PANC-MRP4sh1 (○) fueron tratadas con forskolina con concentraciones de 0,1 a 300μM durante 15min. Las curvas concentración-respuesta obtenidas fueron graficadas como AMPc-e en función del AMPc-i. Los resultados representan la media ± ESM (n=3).

A continuación, se decidió evaluar si la disminución en la expresión de MRP4 afectaba la exclusión basal de AMPc. Teniendo en cuenta este objetivo, se realizaron ensayos de acumulación de AMPc durante 1 hora en ausencia de estímulos. De forma similar a lo observado con los inhibidores farmacológicos, el silenciamiento de este transportador produjo una disminución significativa de los niveles de AMPc acumulados en el compartimiento extracelular sin alterar los niveles globales de AMPc en el espacio intracelular (*Figura 14*).

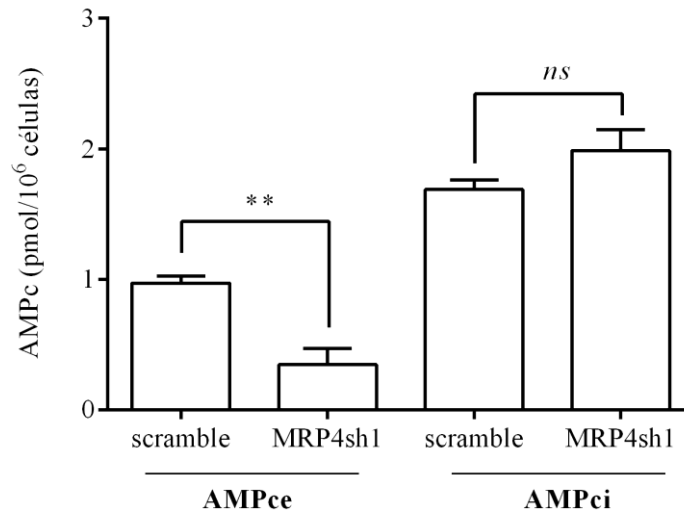


Figura 14. Exclusión basal de AMPc en células PANC-MRP4sh1. Ensayos de acumulación de AMPc fueron realizados en las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 durante 60min en ausencia de estímulos. Los niveles de AMPc-e (izquierda) y, AMPc-i (derecha) fueron determinados como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). ** p<0,01; ns no significativo

En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento de MRP4 produce una disminución en la capacidad de exclusión de AMPc al espacio extracelular, en las células PANC-1, lo cual demuestra que la actividad y expresión de este transportador resultan críticas en este proceso.

Sobre la base de los resultados experimentales previamente descritos y con el fin último de validar a MRP4 y al proceso de exclusión de AMPc como blanco terapéutico en PDAC, a continuación, evaluamos, tanto mediante un abordaje farmacológico como molecular, las implicancias de la modulación de su actividad como transportador de AMPc en el proceso de proliferación celular *in vitro*.

3.6. Efecto de la inhibición farmacológica de MRPs sobre la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático

Con el fin de determinar la participación de los MRPs en el proceso de proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático humano, se evaluó el crecimiento de las células PANC-1 luego de 72h de tratamiento con los inhibidores farmacológicos de MRPs, probenecid y MK571 (*Figura 15A y B respectivamente*). En ambos casos, se observó una disminución concentración-dependiente de la proliferación

celular. Es interesante remarcar que todas las concentraciones de estos agentes que habían mostrado previamente disminuir significativamente la exclusión de AMPc, tuvieron un efecto antiproliferativo.

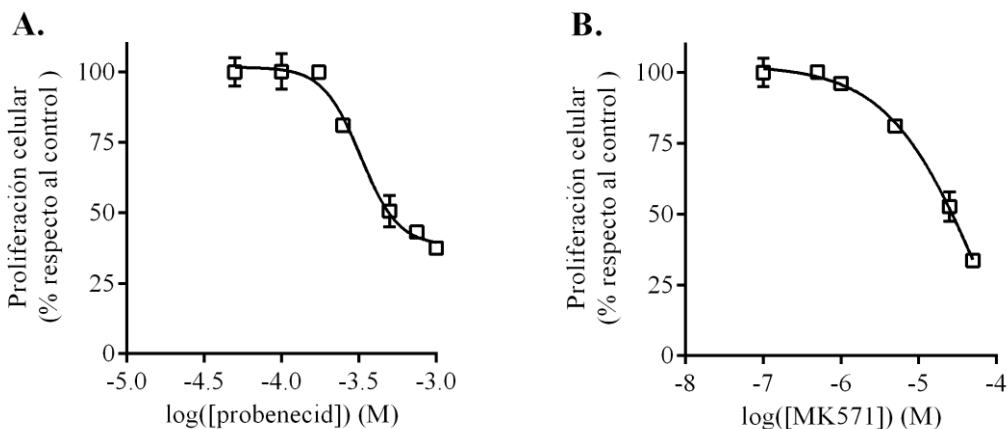


Figura 15. Efecto de la inhibición farmacológica de MRPs en la proliferación celular de PANC-1. Se realizaron ensayos concentración-respuesta a probenecid (A) y MK571 (B). Luego de 72h de tratamiento se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células control.

Con el objetivo de determinar si la disminución en la proliferación celular observada era consecuencia de un efecto citotóxico de los tratamientos, a continuación, fueron realizados ensayos de viabilidad celular utilizando el método de tinción por exclusión con el colorante azul tripán. Para ello, las células PANC-1 fueron tratadas durante 24h con los mismos inhibidores que en el ensayo anterior. En el caso del tratamiento con probenecid, a concentraciones superiores a 1mM comenzó a observarse una reducción en la viabilidad celular (*Figura 16A*). Lo mismo ocurrió en presencia de concentraciones de MK571 mayores a 50 μ M (*Figura 16B*).

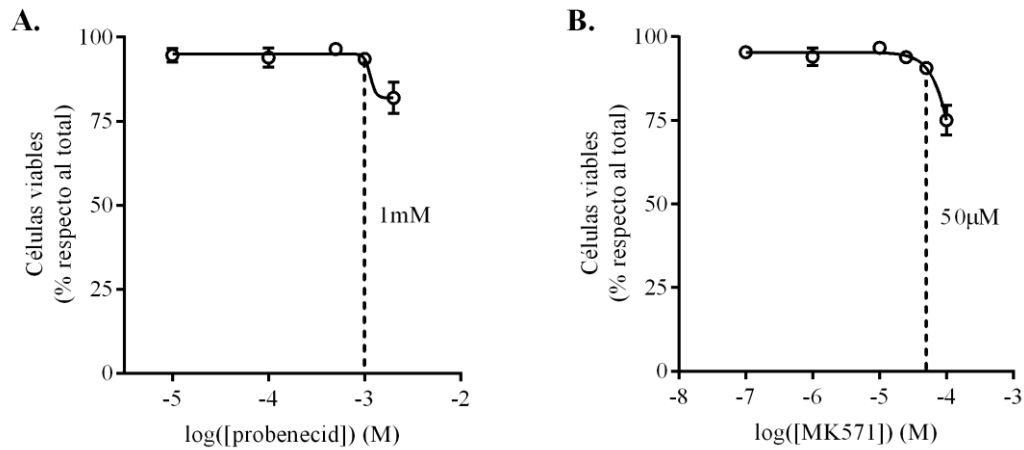


Figura 16. Efecto de los inhibidores farmacológicos de MRPs sobre la viabilidad celular de PANC-1. Las células PANC-1 fueron tratadas con las concentraciones indicadas de probenecid (A) o MK571 (B) durante 24h. La viabilidad celular fue determinada como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de células viable sobre las totales.

En base a estos resultados, se observa que ninguna de las concentraciones ensayadas en los experimentos de proliferación produce una reducción de la viabilidad celular, lo cual indica que la disminución en la capacidad proliferativa de las células PANC-1 producto de la inhibición farmacológica de los MRPs no se debe a un efecto citotóxico.

Por lo tanto, nos propusimos evaluar si el efecto antiproliferativo observado se correlacionaba con un arresto en el ciclo celular. Para ello, las células PANC-1 fueron tratadas durante 72h con concentraciones no citotóxicas de los inhibidores de MRPs, probenecid y MK571. El ciclo celular fue determinado por citometría de flujo luego de la incubación con una solución de yoduro de propidio 20 μ g/ml. Como se observa en la *Figura 17*, la inhibición farmacológica de los MRPs condujo a un aumento significativo en la población en fase G_{0/1} cercano al 25% con probenecid y al 15% con MK571.

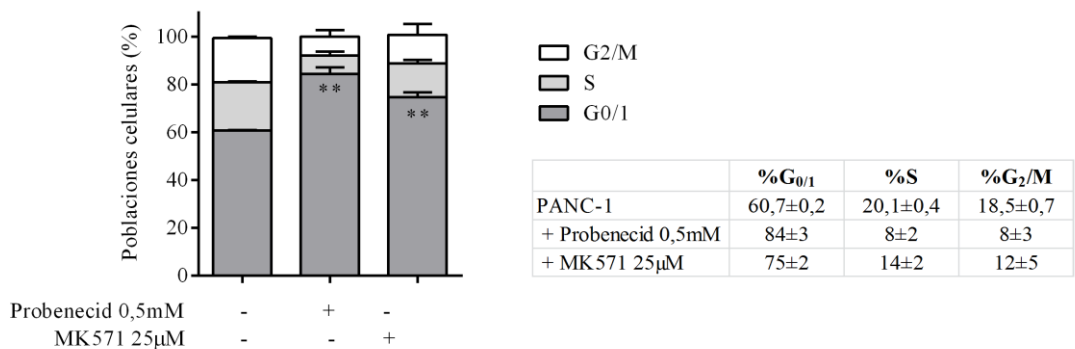


Figura 17. Efecto de la inhibición farmacológica de MRPs sobre el ciclo celular de PANC-1. Las células PANC-1 hambreadas durante 48h fueron tratadas con probenecid 0,5mM o MK571 25µM durante 72h. Posteriormente fueron fijadas con etanol e incubadas con una solución de yoduro de propidio según se describe en la sección *Metodología*. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para los distintos tratamientos fue determinado por citometría de flujo y analizado por el programa Flowing Software 2.5.1 (Universidad de Turku, Finlandia). Los datos representan la media ± ESM (n=3). *p<0.05, **p<0.01, respecto del control.

Por lo tanto, con el fin de determinar si el efecto antiproliferativo asociado a la inhibición de los MRPs era un fenómeno exclusivo de las células PANC-1, ensayos de proliferación celular fueron realizados frente al tratamiento con los inhibidores farmacológicos de MRPs en las células BxPC-3 y HPAF-II. Tanto el tratamiento con probenecid como con MK571 tuvo un efecto antiproliferativo en ambas líneas celulares (*Figura 18*). Estos resultados se condicen con los obtenidos para las células PANC-1 y demuestran la implicancia de los MRPs en el proceso de proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático.

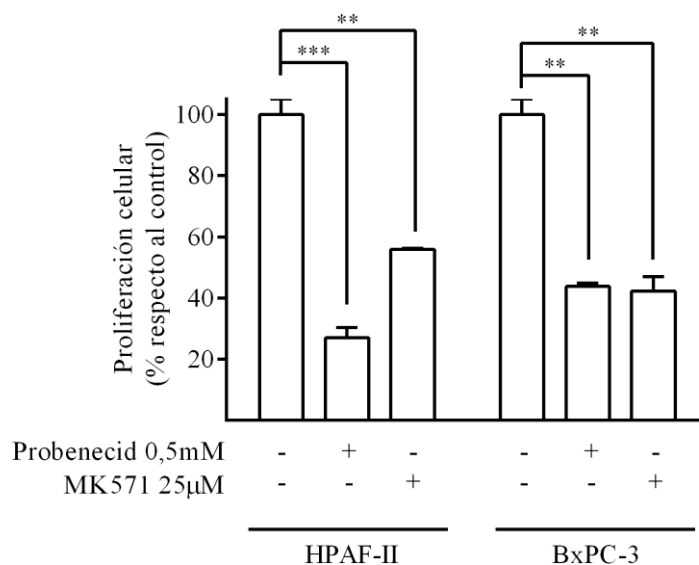


Figura 18. Efecto de la inhibición farmacológica de MRPs en la proliferación celular de líneas celulares de PDAC. Las células HPAF-II y BxPC-3 fueron tratadas con probenecid 0,5mM o MK571 25µM durante 72h. Luego se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media ± ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células control. **p<0.01, ***p<0.001 respecto del control de vehículo que fue considerado el 100% de proliferación.

En resumen, los resultados obtenidos permiten concluir que la inhibición farmacológica de MRPs conduce a una disminución de la proliferación de las células de PDAC, producto de un arresto del ciclo celular en la fase G_{0/1} y no debido a un efecto citotóxico.

3.7. Efecto del silenciamiento de MRP4 sobre la proliferación de células PANC-1

Dada la falta de selectividad de los inhibidores farmacológicos utilizados, nos propusimos determinar específicamente el papel de MRP4 en la modulación del proceso de proliferación celular. Para llevar a cabo dicho objetivo, fueron utilizadas las células PANC-MRP4sh1. Como se mencionó previamente, éstas presentan menores niveles de MRP4 y en consecuencia transportan menos AMPc al espacio extracelular.

Ensayos de proliferación fueron realizados durante 6 días, mediante el conteo del número de células a distintos tiempos. Como se puede observar en la *Figura 19A*, las células PANC-MRP4sh1 presentaron una tasa proliferativa alrededor de un 50% menor que las células PANC-scramble.

A su vez, mediante citometría de flujo se determinó la distribución de poblaciones en las distintas fases del ciclo celular en estas células. Las células PANC-MRP4sh1 presentaron un aumento significativo de la población en fase G_{0/1} y una disminución del porcentaje de células en fase S con respecto a las células PANC-scramble (*Figura 19B*).

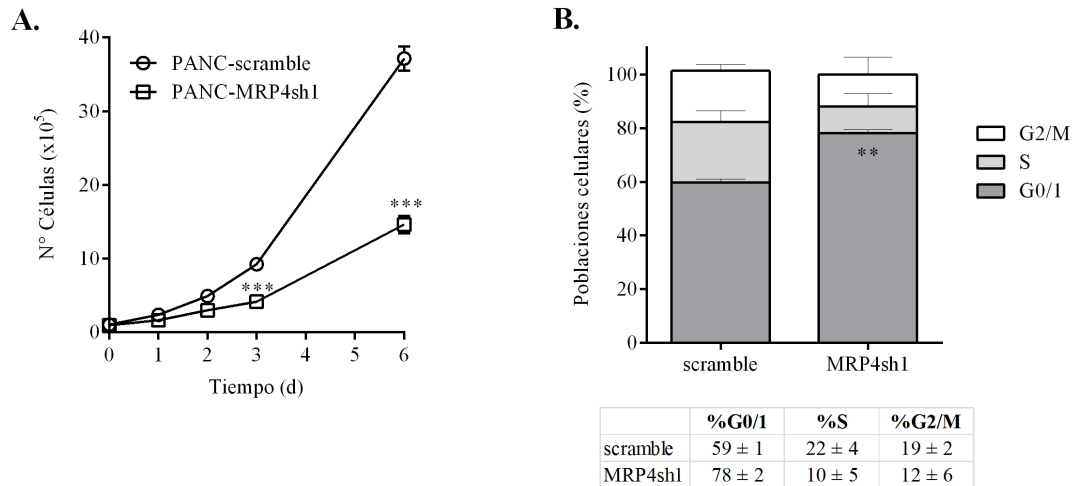


Figura 19. Efecto de la silenciamiento de MRP4 sobre la proliferación y el ciclo celular de células PANC-1. **A.** Un total de 10^5 células de PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron sembradas en placas de 12 pocillos. A los distintos tiempos indicados, se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (n=3). ***p<0.001 con respecto a PANC-scramble. **B.** Las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 hambreadas durante 48h fueron cultivadas en medio completo durante 72h. Posteriormente fueron fijadas con etanol e incubadas con una solución de yoduro de propidio según se describe en la sección *Metodología*. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fue determinado por citometría de flujo y analizado por el programa Flowing Software 2.5.1 (Universidad de Turku, Finlandia). Los datos representan la media \pm ESM (n=3). **p<0.01, respecto a PANC-scramble.

Los resultados obtenidos indican que el silenciamiento de MRP4 conduce a una disminución de la proliferación celular como consecuencia del arresto en la fase G_{0/1}. A su vez, los mismos concuerdan con las observaciones realizadas mediante la inhibición farmacológica de los MRPs y, por lo tanto, demuestran que MRP4 cumple un rol importante en la regulación de la proliferación de células PANC-1.

3.8. Efecto de la inhibición de MRP4 sobre la capacidad migratoria de las células PANC-1

Como fue mencionado previamente, una de las principales causas de la alta mortalidad y difícil tratamiento, asociadas al cáncer de páncreas, es su elevada agresividad. Es así que, al momento del diagnóstico, casi el 80% de los pacientes presentan metástasis a distancia (Winter et al. 2006).

Dado que las metástasis dependen, entre otros factores, de la motilidad de las células tumorales, se evaluó la capacidad de migración de las células de PDAC frente a la inhibición del transporte de AMPc mediado por MRPs. Para ello, se realizaron ensayos de cierre de herida con las células PANC-1 tratadas con los inhibidores farmacológicos de MRPs, probenecid y MK571, durante 48h, a las concentraciones que habían producido la máxima inhibición de la exclusión de AMPc. En ambos casos, se observó una disminución de la migración de las células, siendo esta $54\pm6\%$ y $17\pm2\%$ respectivamente para ambos tratamientos con respecto a las células control (*Figura 20A*).

Con el fin de evaluar si estos efectos se encontraban asociados específicamente a la inhibición de la actividad de MRP4, se realizaron ensayos de migración con *transwells* en los clones conteniendo a este transportador silenciado, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2, y los clones PANC-scramble, usados como control. De forma similar a lo observado con la inhibición de MRPs, el silenciamiento de MRP4 provocó una pérdida significativa de la capacidad migratoria de las células PANC-1 (*Figura 20B*). Si bien no se observaron diferencias significativas en la tasa de migración entre las células PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2, se observó una tendencia hacia una menor migración celular cuando la expresión de MRP4 era menor.

En su conjunto, estos resultados indican que la inhibición de MRPs, y en particular de MRP4, conduce a una menor motilidad de las células tumorales, lo cual podría implicar una menor capacidad de diseminación de los tumores y formación de metástasis.

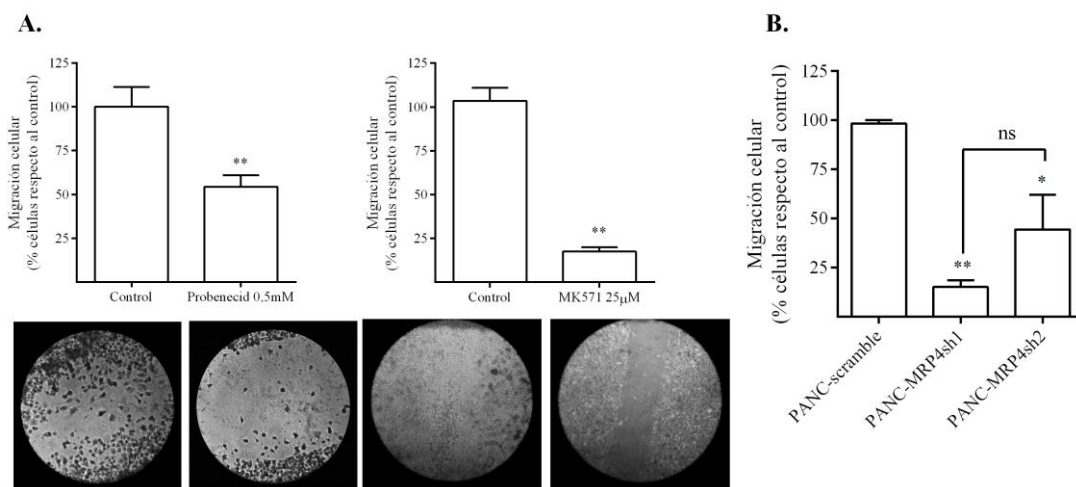


Figura 20. Efecto de la inhibición de MRP4 sobre la capacidad migratoria de células PANC-1. A. Células PANC-1 fueron sembradas en placas de 12 pocillos. A las 24h, fueron realizadas las heridas, según se indica en la sección *Metodología*, y las mismas fueron tratadas con Probenecid 0,5mM (*izquierda*) o MK571 25 μ M (*derecha*). Luego de 48h, la migración celular fue evaluada mediante el conteo del número de células presentes en la herida. Los resultados se expresan como la media \pm ESM (n=3) del número de células contadas en 4 cuadrantes por tratamiento expresadas con respecto al control sin tratar. **p<0.01. *B.* La migración de los clones PANC-scramble, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2 fue determinada por 48h mediante ensayos de transwells, según se describe en la sección *Metodología*. Los datos representan la media \pm ESM (n=3). **p<0.01; *p<0.05; respecto a PANC-scramble; ns, no significativo.

3.9. Papel del AMPc intracelular en el efecto inhibitorio de MRP4 sobre la proliferación de células PANC-1

En las células PANC-1 ha sido descrito que el estímulo con agentes que elevan los niveles de AMPc-i, así como el tratamiento con análogos de este nucleótido cíclico, conlleva a una disminución de la proliferación celular (Ohmura et al. 1993). Por lo tanto, nuestra primera suposición fue que el principal responsable de la disminución en la proliferación observada luego de la inhibición de MRP4 era el aumento de los niveles intracelulares de este segundo mensajero.

Antecedentes de nuestro laboratorio apoyaban esta teoría al haber demostrado que la inhibición de MRPs, y en particular de MRP4, conduce a una inhibición de la proliferación de células de leucemia mieloide aguda al alterar la resolución espacio-temporal del AMPc (Copsel et al. 2011). Por otra parte, en células de músculo liso de arteria coronaria humana, se observó que la inhibición de MRP4 aumenta el efecto antiproliferativo del AMPc mediante la activación de la cascada de PKA (Sassi et al. 2008).

A pesar de nuestros resultados experimentales previos, que indicaban que la modulación, tanto farmacológica como molecular, de MRP4 no era capaz de alterar significativamente los niveles intracelulares de AMPc, igualmente decidimos contrastar dicha hipótesis. Para ello, se realizaron ensayos de proliferación en células PANC-1 frente al tratamiento con KT5720, un inhibidor específico de PKA, en presencia de MK571. Como se puede observar en la *Figura 21A*, la inhibición farmacológica de PKA no fue capaz de revertir el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRPs mediada por MK571.

A continuación, se realizaron curvas concentración-respuesta a forskolina evaluando la proliferación de las células PANC-scramble y PANC-MRPsh1, con el objetivo de determinar si el silenciamiento de MRP4 aumentaba la sensibilidad de las células a los efectos antiproliferativos de agentes que aumentan los niveles de AMPc-i. Luego de 72h de tratamiento, en ambos clones se observó una disminución concentración-dependiente del número de células, tal como había sido descrito previamente en la literatura científica. No obstante, no pudo determinarse una diferencia significativa entre las CI50 de ambas curvas (PANC-scramble $IC_{50}=2,3\pm 0,1\mu M$; PANC-MRP4sh1 $IC_{50}=2,3\pm 0,2\mu M$) (Figura 21B).

Finalmente, se evaluó el crecimiento de células PANC-MRPsh1 y PANC-scramble frente a distintos inhibidores de PKA; por un lado en presencia del inhibidor farmacológico KT5720 o en células transfectadas con PKI, un péptido inhibidor de PKA, o PKI mut, mutante inactiva de ese péptido utilizada como control. De forma coherente con los resultados anteriores, el efecto antiproliferativo del silenciamiento de MRP4 no fue revertido por ninguna de las dos estrategias (Figura 21C).

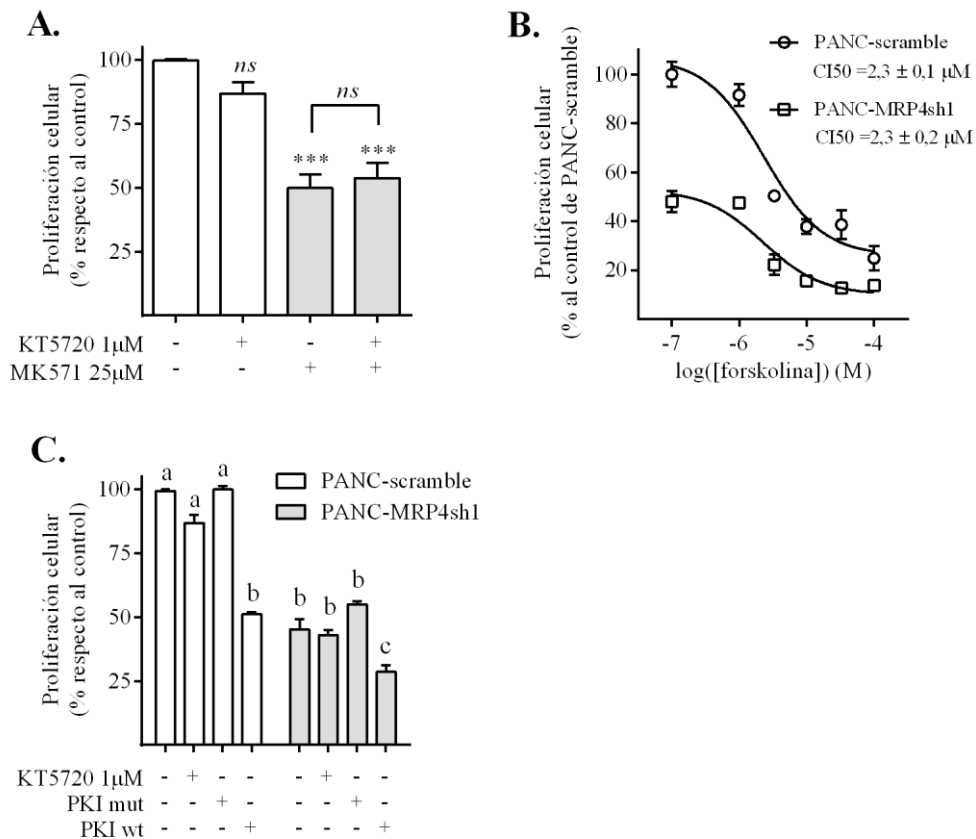


Figura 21. Papel de PKA en el efecto antiproliferativo de la inhibición farmacológica de MRPs en células PANC-1. A. Las células PANC-1 fueron tratadas con MK571 25 μ M durante 72h en presencia o

ausencia de KT5720 1 μ M, inhibidor de PKA. Luego se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células control. ***p<0.001; ns, no significativo, respecto del control de vehículo que fue considerado el 100% de proliferación. **B.** En las células PANC-scramble (\circ) y PANC-MRP4sh1 (\square) fueron realizados ensayos concentración-respuesta a forskolina. Luego de 72h de tratamiento se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3). **C.** Las células PANC-scramble (*blanco*) y PANC-MRP4sh1 (*gris*) fueron tratadas con KT5720 1 μ M o transfectadas con PKI wt, péptido inhibidor de PKA, o PKI mut, mutante inactiva de este péptido utilizado como control. A las 72h se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células PANC-scramble. ***p<0.001; ns, no significativo.

Teniendo en cuenta que en experimentos previos no había sido posible determinar aumentos en los niveles basales del AMPc-i al inhibir tanto los MRPs como MRP4 específicamente, los resultados obtenidos sugieren que, a diferencia de lo observado en otros sistemas, **la disminución en la proliferación de células PANC-1 producto de la inhibición de MRPs, y en particular de MRP4, sería independiente de la cascada de PKA.**

3.10 Papel del AMPc extracelular en el efecto de MRP4 sobre la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático

Como fue mencionado en la sección *Introducción*, la exclusión de AMPc mediada por MRP4 es un proceso ATP-dependiente. Aunque la estequiometría de esta reacción no se conoce con precisión, se estima que por cada ciclo de apertura-cierre del transportador se une una molécula de ATP a cada uno de los dos dominio NBD, los cuales catalizan la hidrólisis de al menos una de estas moléculas, con la consiguiente exclusión de dos moléculas de AMPc al espacio extracelular (Sauna et al. 2004). Dados los numerosos reportes sobre la existencia de una vía extracelular AMPc-adenosina capaz de mediar distintas señales, surge el interrogante sobre si las células de PDAC en estudio se comprometen al gran gasto energético involucrado en el proceso de exclusión de AMPc únicamente para regular sus niveles intracelulares o si el AMPc, o sus metabolitos, se encuentran involucrados en un proceso de señalización autocrina y/o paracrina en el compartimiento extracelular.

Con el fin de abordar este interrogante, se comenzó por evaluar el efecto sobre la proliferación celular del agregado de AMPc al compartimiento extracelular en las células PANC-1. Dado que las concentraciones de AMPc-e alcanzadas luego del tratamiento con agonistas de la vía se encontraban en el medio de cultivo dentro del orden micromolar, se decidió utilizar concentraciones en ese orden de magnitud con el fin de contrastar la nueva hipótesis en estudio. Como se puede observar en la *Figura 22A*, el tratamiento con AMPc 10 μ M no produjo un aumento significativo en la proliferación de las células PANC-1 en condiciones basales pero fue capaz de revertir parcialmente la inhibición debida al tratamiento tanto con probenecid como MK571.

De forma similar, en las células PANC-MRP4sh1 el tratamiento con concentraciones micromolares de AMPc produjo una recuperación parcial del crecimiento celular, alcanzando una tasa de crecimiento de alrededor del 80% con respecto a las células PANC-scramble, utilizadas como control (*Figura 22B*). Estos resultados demuestran que el agregado externo de AMPc revierte los efectos antiproliferativos de la inhibición tanto farmacológica como por silenciamiento de MRP4.

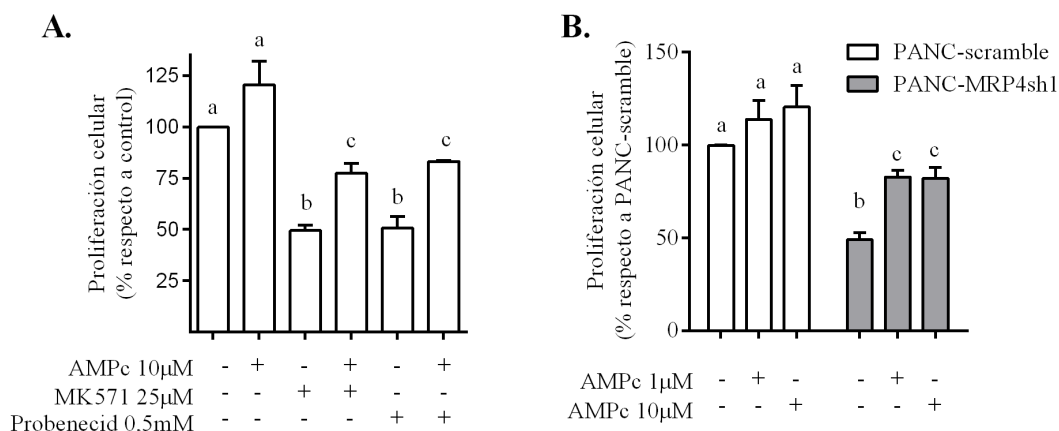


Figura 22. Papel del AMPc extracelular sobre el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRP4 en células PANC-1. **A.** Las células PANC-1 fueron tratadas con MK571 25 μ M o probenecid 0,5mM en presencia o ausencia de AMPc 10 μ M, el cual es impermeable a la membrana plasmática. Luego de 72h de tratamiento, se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células control. Distintas letras indican p<0,05. **B.** Las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron tratadas con AMPc a las concentraciones indicadas. A las 72h se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los

resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células PANC-scramble. Distintas letras indican $p < 0,05$.

A continuación, se decidió evaluar si la recuperación en la proliferación observada por el tratamiento con AMPc se correspondía con cambios en el ciclo celular. Para ello, células PANC-1 sincronizadas fueron tratadas durante 72h con MK571 25 μ M en presencia o ausencia de AMPc 10 μ M. Por otra parte, las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron tratadas con AMPc 10 μ M por el mismo período de tiempo. La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular fue determinada por citometría de flujo luego de la incubación con una solución de yoduro de propidio 20 μ g/ml. Como se observa en la *Figura 23*, el incremento de la población en fase G_{0/1} producto tanto de la inhibición farmacológica de los MRPs con MK571 (*Figura 23A*) como del silenciamiento de MRP4 (*Figura 23B*), fue revertido por el agregado de AMPc al compartimiento extracelular. Por lo tanto, estos resultados indican que la recuperación en la tasa de proliferación, producto del tratamiento con AMPc, sería consecuencia de un desarresto del ciclo celular.

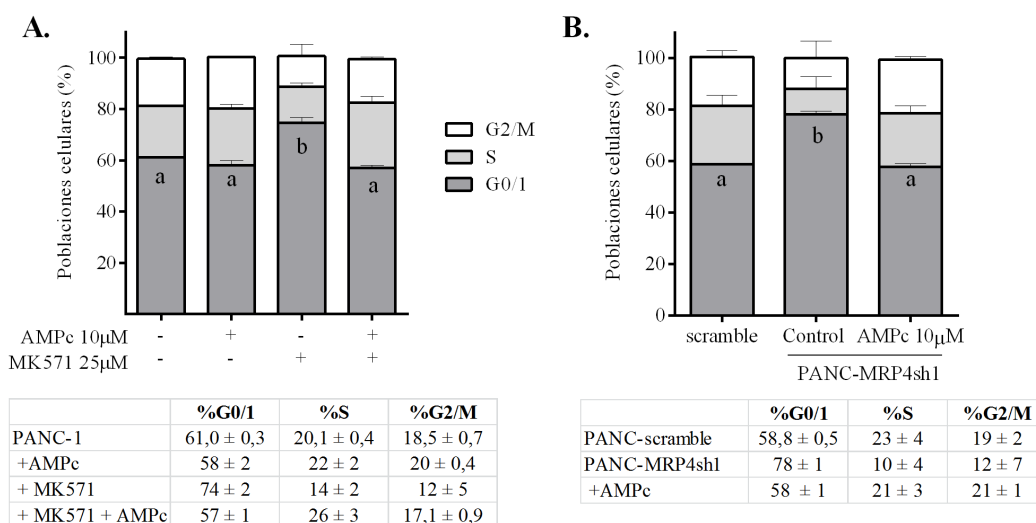


Figura 23. Papel del AMPc extracelular sobre el efecto de la inhibición de MRP4 en el ciclo celular.

A. Las células PANC-1 sincronizadas por hambreado durante 48h fueron tratadas con MK571 25 μ M en presencia o ausencia de AMPc 10 μ M. **B.** Las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 sincronizadas fueron estimuladas con AMPc 10 μ M. En ambos casos, luego de 72h fueron fijadas con etanol e incubadas con una solución de yoduro de propidio según se describe en la sección *Metodología*. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para los distintos tratamientos fue determinado por citometría de flujo y analizado por el programa Flowing Software 2.5.1 (Universidad de Turku, Finlandia). Los datos representan la media \pm ESM (n=3). Distinta letra indica $p < 0,05$.

A fin de determinar si el efecto mitogénico del AMPc-e no era un fenómeno exclusivo de las células PANC-1, fueron realizados ensayos de proliferación celular en presencia o ausencia de este nucleótido cíclico frente al tratamiento con MK571 en las células BxPC-3 y HPAF-II. En ambas líneas, el agregado exógeno de AMPc 10 μ M fue capaz de revertir parcialmente la disminución de la proliferación producto de la inhibición de MRPs con MK571 25 μ M (Figura 24). Estos resultados se condicen con los obtenidos para las células PANC-1 y sugieren que el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRPs cumple un rol crítico en la proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático.

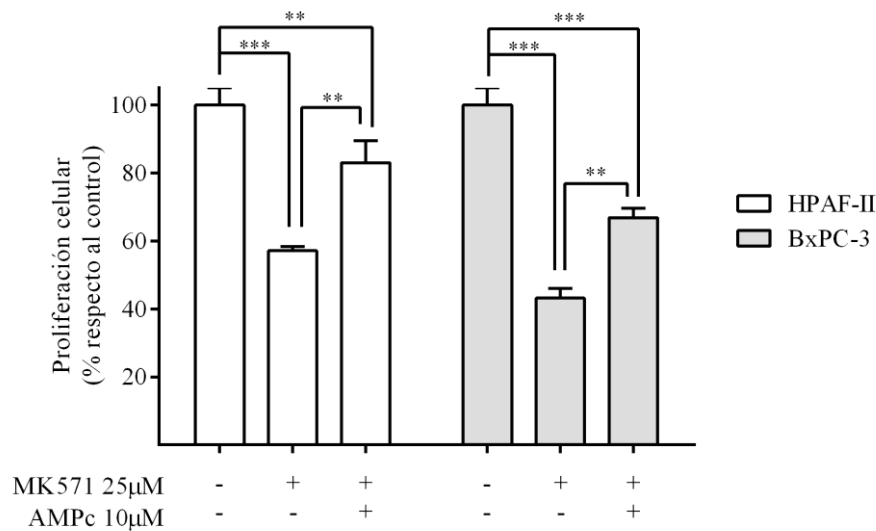


Figura 24. Papel del AMPc extracelular sobre el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRPs en líneas celulares de PDAC. Las células HPAF-II y BxPC-3 fueron tratadas con MK571 25 μ M en presencia o ausencia de AMPc 10 μ M. Luego de 72h, se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los resultados de cada tratamiento se expresan como la media \pm ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células control. **p<0.01, ***p<0.001 respecto del control de vehículo que fue considerado el 100% de proliferación.

Como se mencionó en la introducción, el AMPc no es el único sustrato endógeno de MRP4 capaz de mediar señales en el espacio extracelular. En particular, la prostaglandina E₂ (PGE₂) cobra especial importancia en nuestro modelo dado que la ciclooxigenasa-2 (COX-2), principal productora de esta prostaglandina, se encuentra sobre-expresada en más del 70% de los carcinomas del páncreas (Okami et al. 1999, Tucker et al. 1999). Más aún, la inhibición de esta enzima suprime el crecimiento de células pancreáticas, incluyendo las células PANC-1 (Xu et al. 2008). Recientemente,

también se ha observado que el silenciamiento de MRP4 en células estromales de cáncer de páncreas inhibe la proliferación de células de PDAC que carecen de ciclooxigenasa, dado que estas últimas dependen de fuentes exógenas de PGE₂ (Omura et al. 2010). Por lo tanto, se realizaron experimentos a fin de verificar si el efecto antiproliferativo observado en nuestro modelo como consecuencia de la inhibición de MRP4 se debía, al menos en parte, al bloqueo de la exclusión de esta prostaglandina al espacio extracelular. Para ello, fueron realizados ensayos de proliferación en células PANC-1 previamente tratadas con el inhibidor de MRPs MK571, en presencia o ausencia de PGE₂ 10μM (Figura 25A). Por otra parte, las células PANC-MRP4sh1 también fueron estimuladas con PGE₂ (Figura 25B). En ambos casos, al evaluar la proliferación celular durante 72h, no fue posible determinar una reversión del efecto antiproliferativo de la inhibición de los MRPs o MRP4 respectivamente. Por lo tanto, estos resultados indican que la disminución del crecimiento celular de las células PANC-1 luego de la inhibición de MRP4 no es consecuencia del bloqueo del proceso de exclusión de PGE₂.

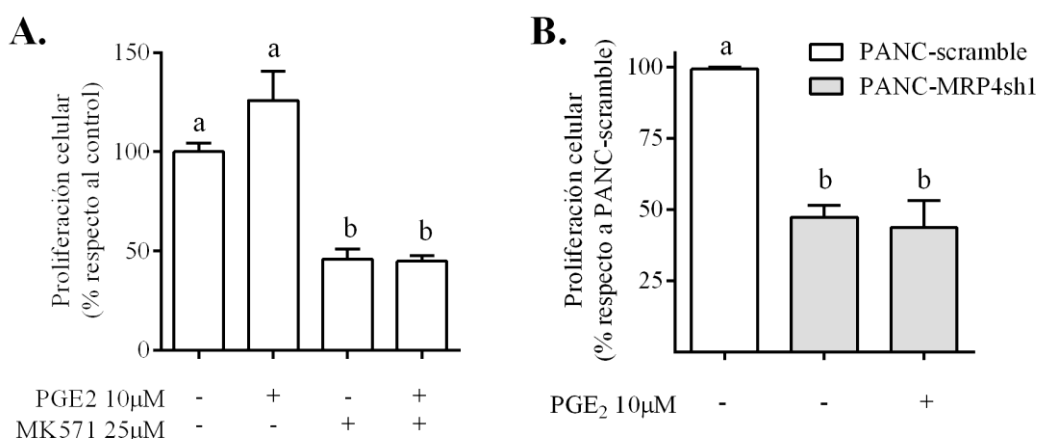


Figura 25. Papel de la prostaglandina E₂ sobre el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRPs. **A.** Las células PANC-1 fueron tratadas con MK571 25μM en presencia o ausencia de PGE₂ 10μM. **B.** Las células PANC-MRP4sh1 fueron tratadas con PGE₂ 10μM. En ambos casos, luego de 72h se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los datos representan la media ± ESM (n=3) del porcentaje de proliferación respecto de las células control y PANC-scramble respectivamente. Distintas letras indican p<0.05.

Por otra parte, existen numerosos reportes que describe una vía capaz de metabolizar al AMPc en el espacio extracelular. En base a esto, decidimos evaluar la estabilidad del AMPc en el compartimiento extracelular, a fin de poder especular si el

efecto proliferativo observado como producto del tratamiento con este nucleótido cíclico se debe a un efecto directo del mismo o consecuencia de los productos de su metabolismo. Para ello, se determinó la estabilidad en el tiempo del agregado exógeno de AMPc 10 μ M en presencia o ausencia de células PANC-1 cultivadas en medio suplementado con 10% de SFB. En ambos casos, la concentración remanente de AMPc fue medida a lo largo de 48h. Como puede observarse en la *Figura 26*, en las dos condiciones experimentales hay una desaparición exponencial del AMPc, el cual es completamente degradado a partir de aproximadamente las 6 primeras horas. A su vez, no fue posible determinar diferencias significativas en el tiempo de vida media del AMPc-e entre la incubación en presencia o ausencia de células, siendo este aproximadamente de 90min en ambos casos. Por lo tanto, estos resultados indican que la hidrólisis de AMPc no sería catalizada por enzimas presentes en las células PANC-1 sino que la misma sería espontánea en el medio de cultivo.

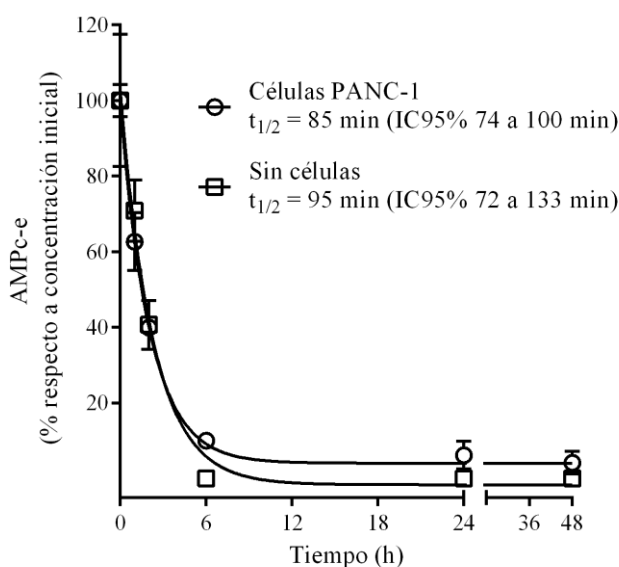


Figura 26. Cinética de estabilidad de AMPc en presencia o ausencia de células PANC-1. 300 μ L de medio RPMI suplementado con 10% SFB en presencia o ausencia de 1x10⁵ células PANC-1 fue suplementado con una concentración 10 μ M de AMPc. A los tiempos indicados, el sobrenadante conteniendo el AMPc-e fue volcado en 800 μ L de etanol. La concentración de AMPc fue determinada como se describe en la sección *Metodología*. Los datos representan la media \pm ESM (n=3).

A partir de lo expuesto, los resultados estarían sugiriendo que la vía extracelular AMPc-adenosina no modularía la concentración de AMPc-e en este modelo. Esta insinuación es discordante con los numerosos reportes que demuestran que el AMPc extracelular es convertido de forma secuencial a 5'-AMP y adenosina, siendo estos

productos los responsable de los efectos autocrinos y/o paracrinos del AMPc excluido. Por consiguiente, decidimos evaluar el efecto sobre la proliferación celular de los productos de la hidrólisis extracelular del AMPc. Con ese fin, células PANC-1 fueron tratadas con distintas concentraciones de 5'-AMP o adenosina en presencia o ausencia de MK571 25µM durante 72h. En estas condiciones, ninguna de las concentraciones ensayadas fue capaz de revertir el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRPs (*Figura 27A*). En coherencia con estos resultados, al evaluar el efecto de ambos metabolitos sobre la proliferación de células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1, se observó que el tratamiento con los mismos tampoco modificó la capacidad proliferativa de los clones con MRP4 silenciado (*Figura 27B*). Por consiguiente, estos resultados sugieren que el efecto mitogénico del AMPc-e no sería mediado por sus metabolitos en las células PANC-1.

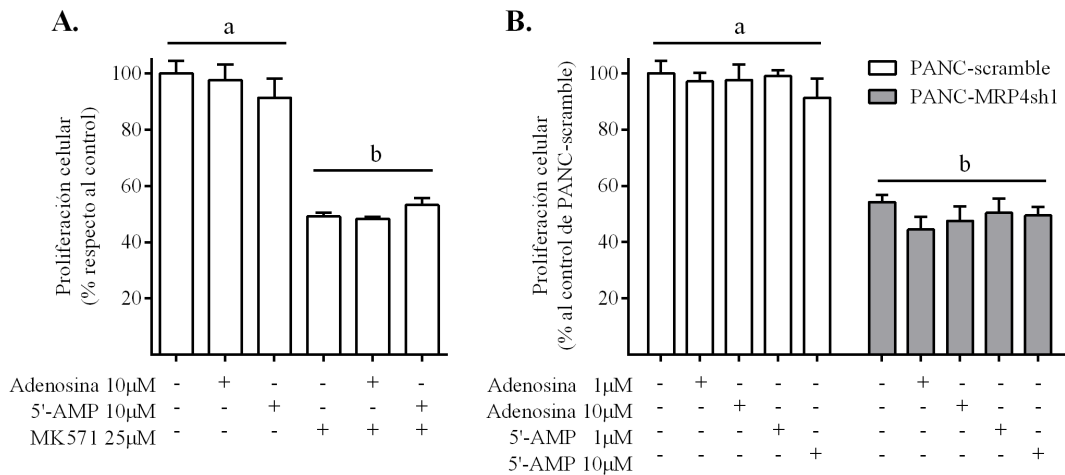


Figura 27. Efectos de los metabolitos del AMPc sobre el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRPs. **A.** Las células PANC-1 fueron tratadas con MK571 25µM en presencia o ausencia de 5'-AMP 10µM o adenosina 10µM. Luego de 72h de tratamiento, se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Los datos representan la media ± ESM (n=3) del porcentaje de proliferación con respecto a las células control. **B.** Las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron tratadas con 5'AMP o adenosina a las concentraciones indicadas. A las 72h se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Datos representan la media ± ESM (n=3) del porcentaje de proliferación con respecto al control de las células PANC-scramble. Distintas letras indican p<0,05.

A fin de confirmar estos resultados, se determinó el efecto sobre la proliferación celular de los inhibidores farmacológicos selectivos de las enzimas ecto-fosfodiesteras y 5'-nucleotidasa; 1,3-dipropil-8-p-sulfofenilxantina (DPSPX) y α,β-metilen-adenosina-

5'-difosfato (AMPCP) respectivamente (Tofovic et al. 1991, Zimmermann 1992). Para ello, las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron incubadas con distintas concentraciones de los inhibidores y luego fueron estimuladas con AMPc. Como puede observarse en la *Figura 28*, el tratamiento con ambos inhibidores no modificó el crecimiento de las células y, más importante aún, no fue capaz de bloquear la reversión de la tasa de crecimiento producto del tratamiento con AMPc en las células PANC-MRP4sh1. Por lo tanto, teniendo en cuenta tanto estos resultados como los obtenidos anteriormente, se puede concluir que la vía extracelular AMPc-adenosina no es la responsable del efecto mitogénico del AMPc en las células PANC-1.

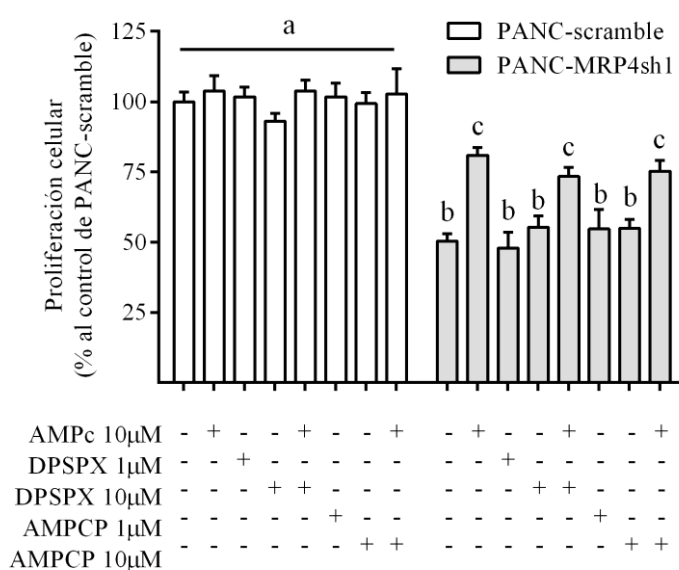


Figura 28. Efectos de la inhibición farmacológica de ecto-fosfodiesterasas y 5'-nucleotidasa sobre el efecto mitogénico de AMPc. Las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron incubadas con distintas concentraciones de los inhibidores de ecto-fosfodiesterasas y 5'-nucleotidasas (DPSPX y AMPCP respectivamente) y luego estimuladas con AMPc 10µM. A las 72h se determinó el número de células por conteo celular según se indica en la sección *Metodología*. Datos representan la media ± ESM (n=3) del porcentaje de proliferación con respecto al control de las células PANC-scramble. Distintas letras indican p<0,05.

En consecuencia, estos resultados indican que el AMPc actúa como un factor de crecimiento autocrino y/o paracrino en las líneas estudiadas, y, por lo tanto, permiten postular al proceso de exclusión de AMPc como un mecanismo capaz de proveer una señal mitogénica en las células de adenocarcinomas ductales pancreáticos.

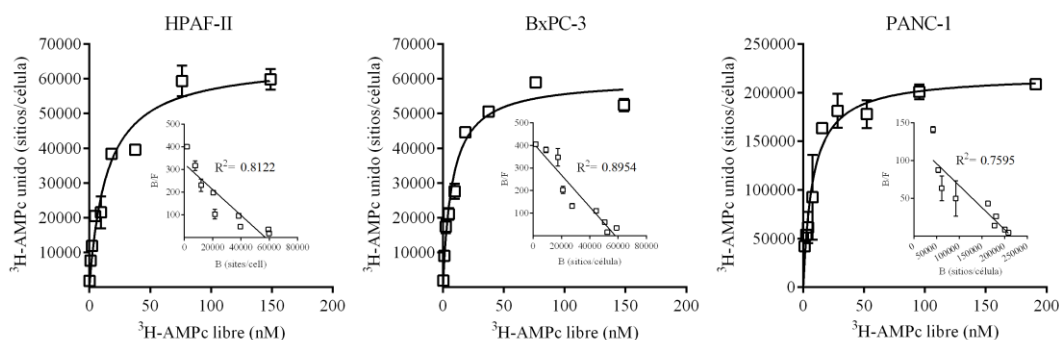
Ahora bien, si este efecto mitogénico del AMPc es de acción específica, el mismo debería ser mediado por la acción sobre alguna diana biológica. Como se mencionó en la sección *Introducción*, la existencia de receptores específicos para el AMPc en la membrana plasmática ha sido postulada en numerosas ocasiones. Por lo tanto, nos propusimos determinar la presencia de sitios de unión específica a AMPc en las líneas celulares de PDAC. Para ello, se realizaron ensayos de saturación utilizando como radioligando ^3H -AMPc en células intactas de HPAF-II, BxPC-3 y PANC-1 en condiciones previamente validadas en nuestro laboratorio durante el desarrollo de la tesis doctoral del Dr. Diez. En las tres líneas ensayadas se obtuvieron isotermas de saturación, lo cual demuestran la existencia de sitios de unión específicos y saturables en la membrana plasmática (*Figura 29*). En todos los casos, la relación entre el ligando unido y el libre pudo ser descripta por la ecuación de adsorción de *Langmuir*, en donde la función de saturación queda definida por la siguiente expresión:

$$r = \frac{B_{max}[AMPc]_{libre}}{K_d + [AMPc]_{libre}}$$

Donde, r es la relación entre el número de sitios de unión a ligando y el número total de células; B_{max} es la máxima unión específica expresada en este caso como sitios/célula; K_d es la constante de disociación en el equilibrio en unidades de concentración.

Por lo tanto, el ajuste de los datos experimentales a este modelo permitió obtener los parámetros B_{max} y K_d . De esta manera, las constantes de disociación estimadas para las tres líneas celulares fueron similares, del orden nanomolar. Por otra parte, el número de sitios por célula obtenido fue significativamente mayor en las células PANC-1 ($B_{m\acute{a}x}=220.000\pm 10.000$ sitios/célula) con respecto a BxPC3 y HPAF-II ($B_{m\acute{a}x}=60.000\pm 2.000$ y 65.000 ± 4.000 ; respectivamente).

La representación de *Scatchard*, previamente utilizada con el fin de estimar parámetros cuando no se encontraban disponibles métodos de regresión no lineal, continúa siendo útil para estimar distintos mecanismos de unión. Como se puede observar en la *Figura 29*, las transformaciones de *Scatchard* mostraron relaciones lineales ($R^2 > 0,75$ en todas las líneas), lo cual sugiere la presencia de un único sitio de unión.



	HPAF-II	BxPC-3	PANC-1
Bmáx (sitios/célula)	65000 ± 4000	60000 ± 2000	220000 ± 10000
Kd (nM)	14 ± 3	8 ± 1	8 ± 2

Figura 29. Ensayo de saturación a ³H-AMPC en líneas celulares de PDAC. Las células HPAF-II, BxPC3 y PANC-1 fueron incubadas en presencia de ³H-AMPC a diferentes concentraciones durante 120min a 4°C. La estimación de la unión específica fue realizada según se describe en la sección *Metodología*. Dentro de las curvas se muestra la transformación de *Scatchard* para el ensayo correspondiente. Los datos representan la media ± ESM (n=3). Los parámetros indicados fueron estimados utilizando el programa Prism 6.10 (GraphPad Software, CA).

Conviene recordar aquí que los resultados obtenidos previamente señalaban al proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 como un mecanismo capaz de proveer una señal mitogénica importante en las células de PDAC. Por lo tanto, se decidió evaluar si ante el silenciamiento de este transportador se desencadenaba algún circuito para contrarrestar la consecuente disminución del AMPc en el compartimento extracelular. Para ello, realizamos ensayos de unión a radioligando ³H-AMPC en las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1. Las células silenciadas presentaron aproximadamente el triple de sitios respecto que las transducidas con la secuencia inespecífica (680.000±40.000 y 220.000±10.000 sitios/célula respectivamente) (*Figura 30*). Este resultado indica que ante la disminución de la expresión de MRP4 aumenta el número de sitios a AMPc como un posible mecanismo compensatorio; tendiente a restablecer la función del circuito mitogénico y la supervivencia celular.

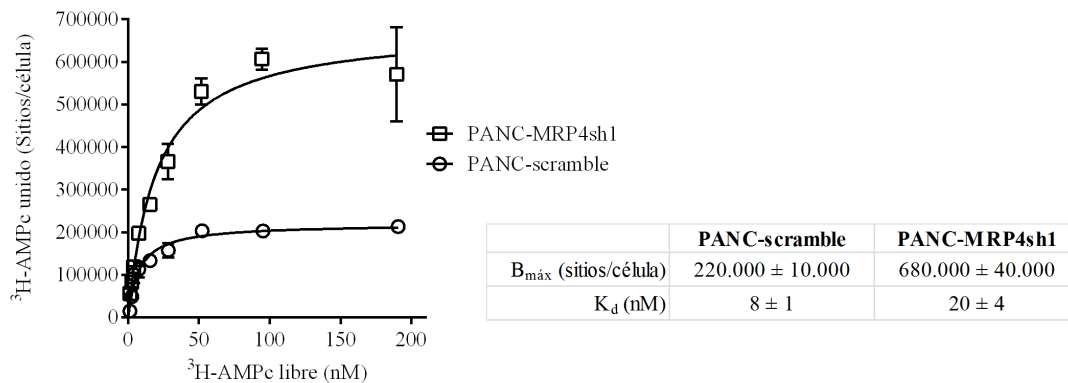


Figura 30. Ensayo de saturación a ³H-AMPc en células PANC-MRP4sh1. Las células PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron incubadas en presencia de ³H-AMPc a diferentes concentraciones durante 120min. La estimación de la unión específica fue realizada según se describe en la sección *Metodología*. Los datos representan la media ± ESM (n=3). Los parámetros indicados fueron estimados utilizando el programa Prism 6.10 (GraphPad Software, CA).

A fin de poder considerar a estos sitios de unión como receptores, la interacción de los mismos con su ligando debería resultar en la transducción de una señal. Dado que previamente demostramos que el AMPc extracelular presenta actividad mitogénica en líneas de PDAC, decidimos evaluar su capacidad de activar vías involucradas en proliferación celular.

Las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés *mitogen-activated protein kinase*), son vías de señalización intracelular que regulan una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis y respuesta al estrés (Plotnikov et al. 2011). De las cuatro cascadas identificadas al presente, la cascada de quinasas 1 y 2 reguladas a través de señales de origen extracelular (ERK1/2) es quizás la más relevante en el área de cáncer dado que mutaciones activantes de componentes río arriba o dentro de la vía han sido identificados en más de la mitad de los cánceres (Montagut and Settleman 2009), y en particular, en más del 90% de los adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos (Ottenhof et al. 2011). Dados estos antecedentes, procedimos a evaluar si el tratamiento con AMPc inducía la fosforilación de ERK (pERK) y, en consecuencia, la activación de esta vía. Para ello, las células PANC-1 fueron hambreadas durante 48h a fin de reducir los niveles basales de pERK y, por consiguiente, aumentar la sensibilidad de la

medición. Luego, fueron estimuladas con AMPc 10 μ M y los niveles de pERK fueron evaluados a tiempos cortos mediante western blot. Como puede observarse en la *Figura 31*, el tratamiento con AMPc incrementa rápidamente la fracción fosforilada de ERK1/2, la cual disminuye a partir de los 5min incluso por debajo de los niveles basales. Por lo tanto, estos resultados indican que el AMPc, a concentraciones idénticas a las que revierte el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRP4, activa la vía de ERK1/2, clásicamente asociada a proliferación celular.

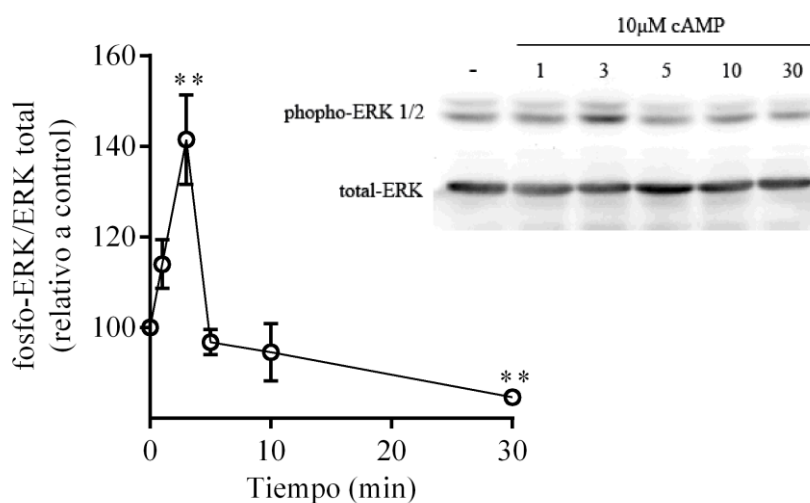


Figura 31. Activación de la vía mitogénica ERK1/2 por AMPc extracelular. Las células PANC-1 fueron sembradas a una densidad de 250.000 células/pocillo. Luego de ser hambreadas durante 48h, las células fueron estimuladas con AMPc 10 μ M durante los tiempos indicados. Cantidades iguales de proteínas fueron sometidas a SDS-PAGE y analizadas por western blot según se describe en la sección *Metodología*. Se muestra membrana representativa de tres ensayos independientes (*derecha*) y densitometría de las mismas (*izquierda*) realizada con el programa ImageJ (NIH, USA). Los datos representan la media \pm ESM (n=3). **p<0,01.

Finalmente, dado que existen algunos antecedentes que sugieren que el AMPc podría interactuar con receptores acoplados a proteína G (Sorbera and Morad 1991), se decidió evaluar si este nucleótido cíclico contribuye a la modulación de sus propios niveles dentro de la célula al interactuar con sus sitios específicos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos en los cuales se evaluó el efecto del agregado de AMPc exógeno sobre la acumulación intracelular de este segundo mensajero luego del tratamiento con forskolina 10 μ M en las líneas celulares de PDAC: PANC-1, BxPC3 y HPAF-II. De esta forma, el agregado de AMPc extracelular provocó una inhibición de la acumulación de

AMPC en respuesta a forskolina de manera concentración-dependiente (*Figura 32*). La realización de estos experimentos en presencia de IBMX, inhibidor general de PDEs tanto intra- como extracelulares, permitió señalar nuevamente que el AMPC, y no sus metabolitos, es el responsable del efecto observado. En todos los casos, la respuesta máxima se obtuvo frente a concentraciones extracelulares de AMPC de alrededor de 100µM, con una CE50 estimada en el orden de micromolar. Este resultado indica que el AMPC-e modula los niveles intracelulares de AMPC, lo cual podría implicar que un receptor acoplado a proteína G inhibitoria mediaría los efectos de este segundo mensajero en el espacio extracelular.

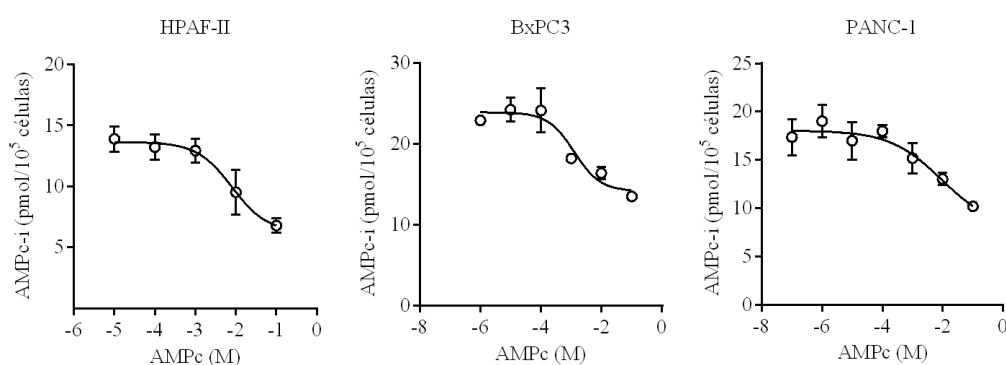


Figura 32. Efecto del AMPC extracelular sobre el AMPC intracelular. Células PANC-1, BxPC3 y HPAF-II fueron preincubadas 3min con IBMX 1mM. Luego fueron incubadas por 5min en presencia de forskolina 10µM y estimuladas con diferentes concentraciones de AMPC. Los niveles de AMPC fueron determinados como se describe en la sección *Metodología*. Los datos representan la media ± ESM (n=3).

3.11 Regulación de la expresión de MRP4 mediada por AMPC

Como fue demostrado por los resultados previamente, la expresión de MRP4 cumple un rol fundamental en la biología tumoral de las células de adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos, participando no sólo en la exclusión de drogas antineoplásicas como había sido descrito anteriormente, sino también al proveer de una señal mitogénica mediada por el AMPC en el espacio extracelular. Más aún, los mismos sugieren que las células tumorales con menor grado de diferenciación y, por ende, con mayor grado de malignidad, presentan mayores niveles de este transportador. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes y la importancia de MRP4 en el balance intra/extracelular de AMPC, a continuación, nos planteamos como objetivo determinar si este segundo mensajero influye en la expresión de este transportador.

Con ese fin, se decidió evaluar el efecto de estímulos que aumentan el AMPc sobre los niveles de expresión de MRP4 en las células PANC-1. En una primera instancia, se determinaron, mediante ensayos de western blot, los niveles de proteína de este transportador al tratar las células con forskolina, IBMX o db-AMPC (un análogo permeable del AMPc). Luego de 48h de tratamiento, todos los agentes ensayados indujeron un aumento de los niveles de MRP4 en aproximadamente un 50% con respecto al control (*Figura 33A*). A continuación, se evaluaron los niveles de ARNm de este transportador mediante qPCR luego del tratamiento de las células con los mismos agentes. De forma coherente con los resultados anteriores, a las 24h se observó un aumento de los transcritos de MRP4 a casi el doble de sus valores basales con los tratamientos ensayados (*Figura 33B*). En consecuencia, estos resultados indican que el aumento de los niveles intracelulares de AMPc induce la expresión de MRP4 en las células PANC-1. Es interesante remarcar que el pre-tratamiento con cicloheximida abolió completamente el efecto positivo observado sobre la expresión génica de MRP4 al estimular con db-AMPC. Por lo tanto, este resultado sugiere que la síntesis *de novo* de factores de transcripción podría estar implicada en la regulación de este transportador mediada por el AMPc-i.

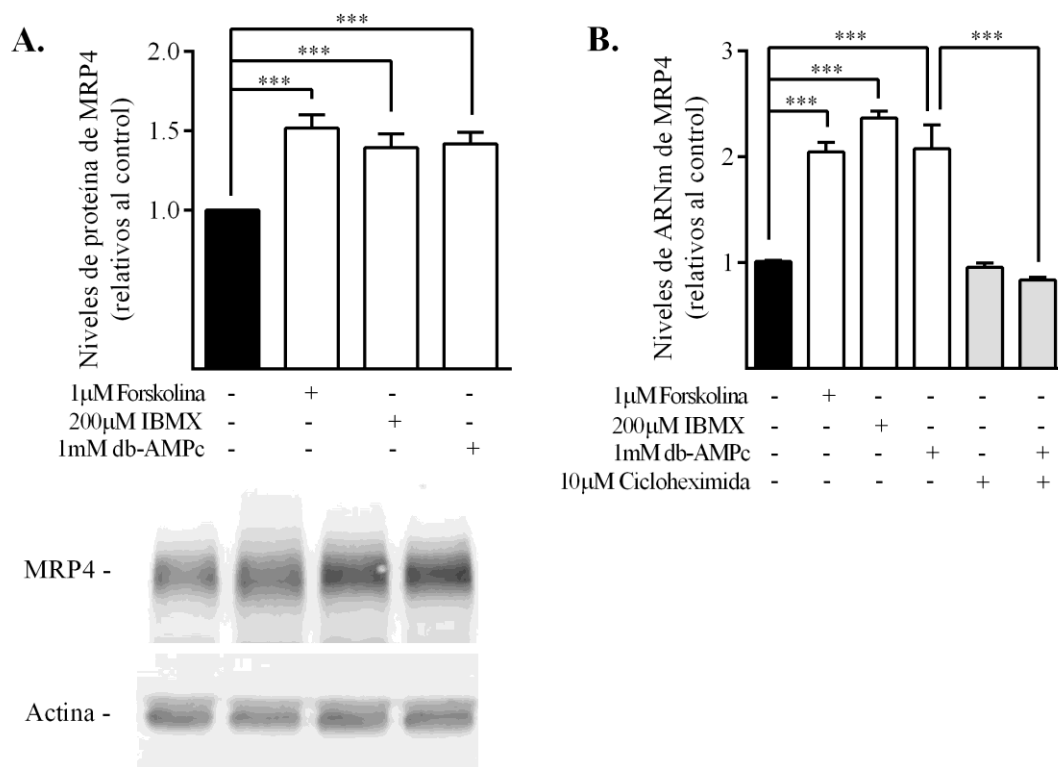


Figura 33. Regulación de la expresión de MRP4 por estímulos que aumentan el AMPc en las células PANC-1. A. Análisis de los niveles de expresión de proteína de MRP4 realizado mediante la técnica de

western blot en las células PANC-1. Se muestra la cuantificación por densitometría de las bandas de MRP4 normalizadas a Actina (*arriba*) y un resultado de western blot representativo de seis experimentos independientes (*abajo*). Los resultados representan la media \pm ESM (n=6). *** p<0,001. **B.** Cuantificación de ARNm de MRP4 mediante qPCR en las células PANC-1. Los resultados fueron normalizados al ARNm de β -actina y expresados relativos al control como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). ***p<0,001.

Es sabido que un incremento en los niveles de expresión de una determinada proteína puede ser el resultado tanto del aumento de la estabilidad de sus transcritos como de la estimulación de la transcripción de los mismos. A fin de determinar el mecanismo involucrado en la regulación de MRP4 mediada por AMPc, en una primera instancia se realizó un análisis *in silico* de la región promotora del gen de este transportador. La secuencia promotora fue obtenida analizando el cromosoma 13 utilizando el Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org). A partir de la misma, se analizó un fragmento de alrededor de 2,5kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS, del inglés *transcriptional start site*) del gen de MRP4 humano mediante el programa MatInspector (Genomatix Suite Software). Este análisis reveló que esta secuencia carece de caja TATA o CAAT, secuencias consenso de reconocimiento a factores de transcripción y ARN polimerasa, y que presenta una zona rica en GC (79,8%) entre las posiciones +1 y +119 con respecto al TSS. Aún no se encuentra definido en la literatura científica si esta región es una isla CpG, pero de ser así la misma podría ser sujeta a metilación, regulando de forma epigenética la expresión del gen. Por otro lado, este análisis *in silico* permitió generar un mapa con los sitios putativos de unión a factores de transcripción en la secuencia promotora. En base a estos datos, fue posible identificar la presencia de tres sitios putativos de unión a proteínas CREB (del inglés *cAMP response element-binding*), las cuales son factores de transcripción clásicos de la cascada de AMPc/PKA. A su vez, se detectaron otros sitios relacionados a vías que cruzan con la señalización de este segundo mensajero, tales como ELK1, AP1 y Myc (*Figura 34*). Por ende, la presencia de varios sitios putativos de unión a factores de transcripción asociados a la vía del AMPc en el promotor de MRP4 sugería, al menos de forma indirecta, la hipótesis de una posible regulación transcripcional de esta proteína mediada por este segundo mensajero.

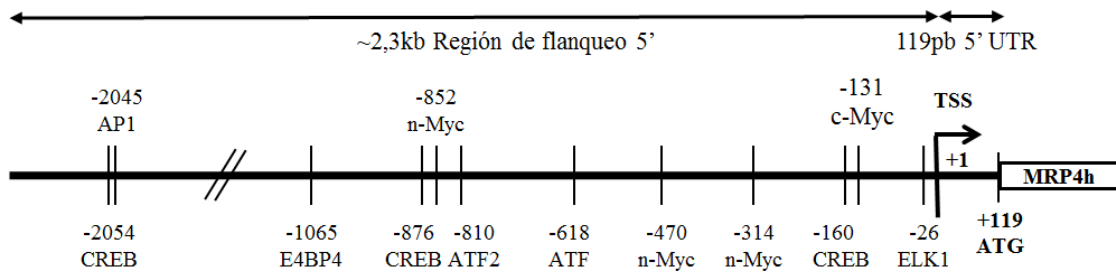


Figura 34. Sitios putativos de unión a factores de transcripción asociados a la señalización del AMPc en la región promotora de MRP4. Análisis de los sitios putativos de unión a factores de transcripción (TF) relacionados con la cascada de señalización del AMPc. Los mismos fueron determinados utilizando el programa MatInspector (Genomatix Suite Software). Los TF seleccionados están indicados junto con su posición referida al sitio de inicio de la transcripción (TSS). 5' UTR, región 5' no codificante.

Por lo tanto, se decidió estudiar la actividad del promotor de MRP4 mediante ensayos utilizando luciferasa como gen reportero. Para los mismos, se clonó un fragmento de 2372pb, conteniendo las posiciones +48 a -2324 con respecto al TSS del gen de MRP4, en el vector reportero pGL3-Basic. Para ello, fueron diseñados *primers* que permitieran obtener, mediante PCR, la región de interés y su posterior clonado, mediante el agregado de sitios de restricción para BglII y KpnI, ambos presentes en el sitio múltiple de clonado (SMC) del vector reportero. A continuación se realizó la PCR utilizando como templado al clon RP11-789G22, un clon BAC (del inglés *bacterial artificial chromosome*) con la fracción del cromosoma 13 humano que contiene la región río arriba del TSS del gen de MRP4. La secuencia así obtenida fue clonada en el vector pGL3-Basic, el cual carece de un promotor propio y contiene la secuencia que codifica para la enzima *Photinus luciferasa* río abajo del sitio múltiple de clonado. La identidad de la secuencia promotora subclonada fue confirmada tanto por secuenciación como por digestión del producto obtenido. En la *Figura 35* se esquematiza el protocolo realizado con el objetivo de obtener el plásmido reportero para el promotor de MRP4, denominado de ahora en más, MRP4-Luc.

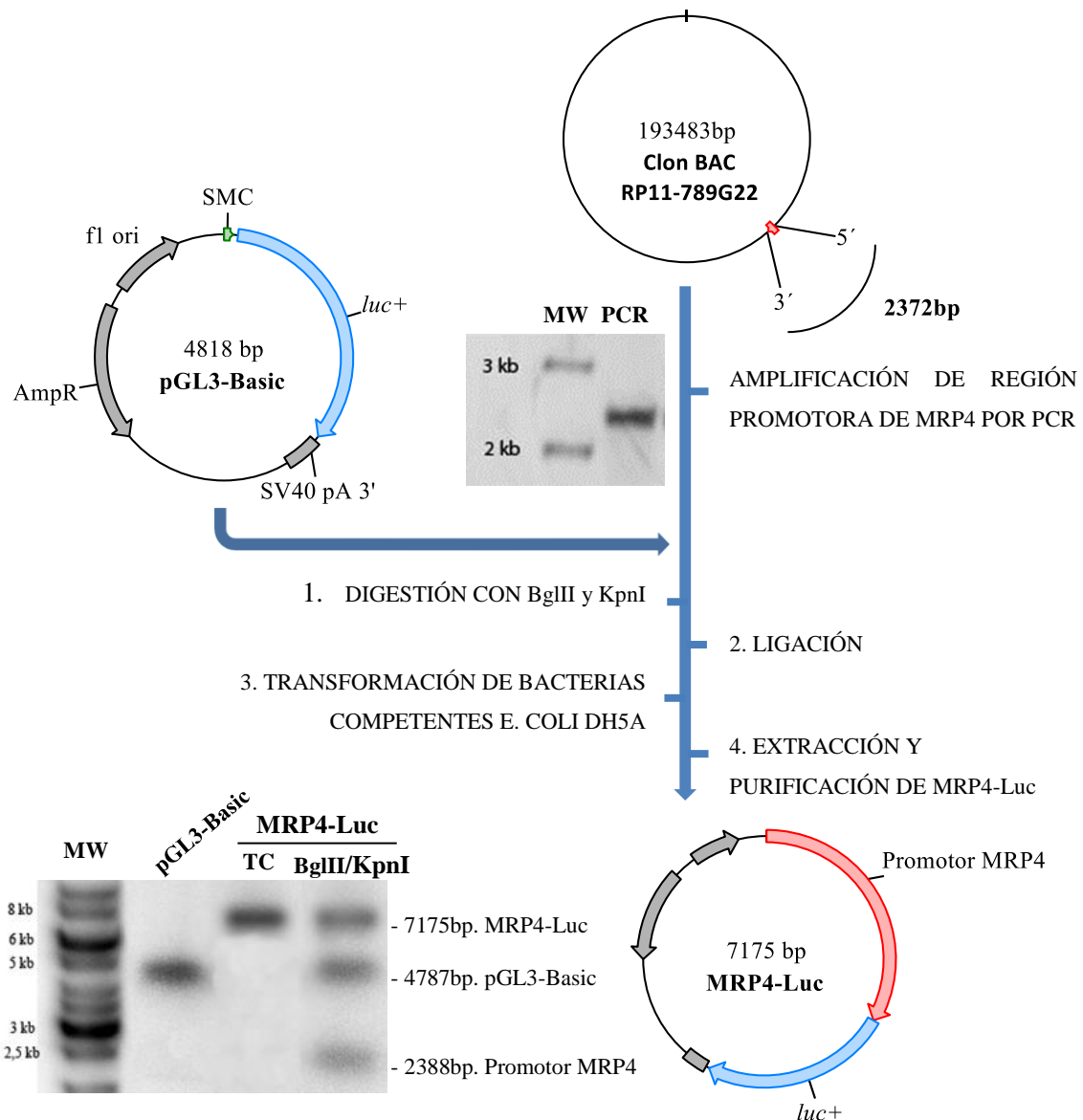


Figura 35. Esquema de la obtención del MRP4-Luc, plásmido reportero para el promotor de MRP4. En la amplificación de la región promotora por PCR fueron utilizados como *primers* las siguientes secuencias de oligonucleótidos: fw: **CGCAGATCTACCTCAAGCAGGGATG**, rv: **CTGGTACCGCTGGGATTATGGGCTTG**. Como se indica en el texto, las mismas contienen sitios de restricción para BglII y KpnI respectivamente (en negrita). Se muestra una corrida representativa en gel de agarosa del producto de PCR (*arriba*) y de la digestión de MRP4-Luc con BglII y KpnI (*abajo*). TC: tal cual; MW: marcador peso molecular.

Debido al elevado nivel de expresión de MRP4 en las células PANC-1, el estudio de regulaciones positivas de esta proteína resulta un tanto limitado en este sistema. Por lo tanto, se decidió utilizar como modelo de estudio para los ensayos reporteros de luciferasa a las células AR42J, células de rata derivadas de un tumor trasplantado de páncreas exocrino. En esta ocasión, el criterio para su elección no solo se basó en su

menor expresión de MRP4, sino también en su elevada eficiencia de transfección y en su amplio uso en ensayos de gen reportero. Es importante remarcar que nuestro laboratorio previamente había determinado la presencia de MRP4 y del proceso de exclusión de AMPc en este sistema (Rodríguez et al. 2011). A fin de caracterizar la señalización del AMPc en estas células, se evaluó la respuesta a este segundo mensajero mediante ensayos cinéticos. Para ello, las células AR42J fueron tratadas con forskolina 1 μ M y los niveles de AMPc-i y -e fueron evaluados a distintos tiempos. Al igual que lo observado en los modelos anteriores, el tratamiento con el activador de la adenilil ciclasa indujo un rápido aumento de los niveles intracelulares de AMPc, los cuales fueron acompañados por un posterior aumento de este nucleótido cíclico en el espacio extracelular (Figura 36A). Cabe aquí destacar que, incluso luego de 60min de tratamiento, los niveles de AMPc-i aún seguían siendo significativamente mayores a los basales. De forma similar, el tratamiento por 15min con IBMX fue capaz de incrementar los niveles intracelulares de este segundo mensajero de $0,5 \pm 0,1$ a 41 ± 5 pmoles/pocillo, mientras que el AMPc-e aumentó de $0,30 \pm 0,05$ a $1,9 \pm 0,1$ pmoles/pocillo (Figura 36B). En consecuencia, estos resultados indican que tanto el tratamiento con forskolina como con IBMX produce un aumento generalizado y sostenido de los niveles de AMPc-i en las células AR42J. Más aún, demuestran que el AMPc es excluido en este sistema en condiciones tanto basales como frente a estímulos que incrementan sus niveles intracelulares.

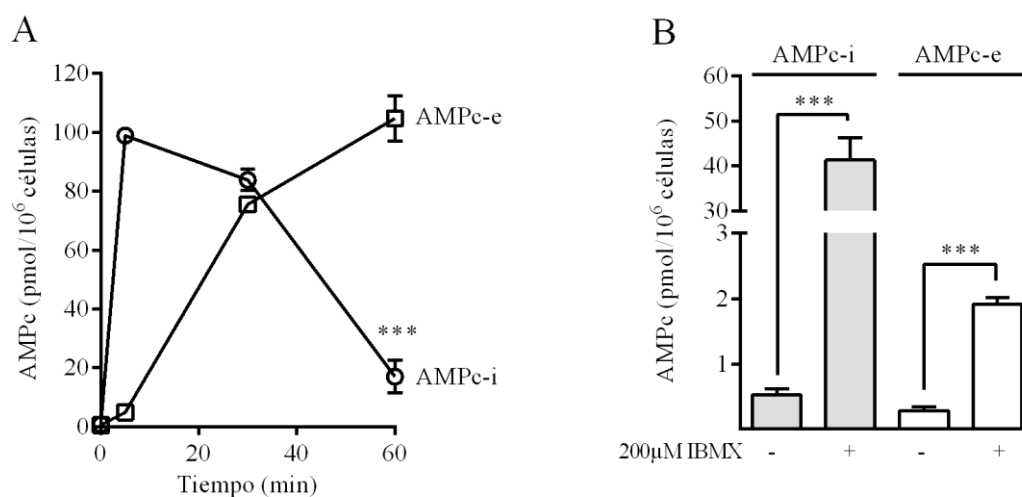


Figura 36. Señalización de AMPc en células de AR42J. A. La línea celular de rata AR42J fue tratada con forskolina 1 μ M en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasas. Los niveles de AMPc-i (\circ) y -e (\square) fueron determinados a los distintos tiempos indicados como se describe en la sección Metodología. ***

p<0,001 AMPc-e respecto a AMPc-i. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). **B.** Ensayo de acumulación de AMPc en AR42J. Las células fueron tratadas por 15min con IBMX 200 μ M y, luego, fueron determinados los niveles de AMPc-i (*gris*) y -e (*blanco*). *** p<0,001 AMPc-e respecto a AMPc-i. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

A continuación, las células AR42J fueron transfectadas con la construcción MRP4-Luc y, luego de 48h, fue determinada la actividad basal de luciferasa. Como puede observarse en la *Figura 37A*, la construcción reportera presentó una actividad 45 veces mayor que la del vector vacío, lo cual implica que el promotor de MRP4 tiene una elevada actividad constitutiva en este sistema.

Por lo tanto, una vez validado el sistema y la construcción reportera, se procedió a determinar la actividad del promotor de MRP4 frente al tratamiento con los agentes moduladores de AMPc mencionados anteriormente. Para ello, las células AR42J fueron transfectadas con el plásmido MRP4-Luc y, luego de 24h, fueron tratadas con los distintos estímulos por 48h. En estas condiciones, tanto el tratamiento con db-AMPc como con IBMX provocó un aumento concentración-dependiente de la actividad de luciferasa. Curiosamente, en el caso particular de forskolina, a concentraciones bajas (0,1 y 1 μ M) también se observó un incremento de la actividad reportera mientras que a concentraciones mayores (100 μ M) el efecto evocado fue el opuesto (*Figura 37B*).

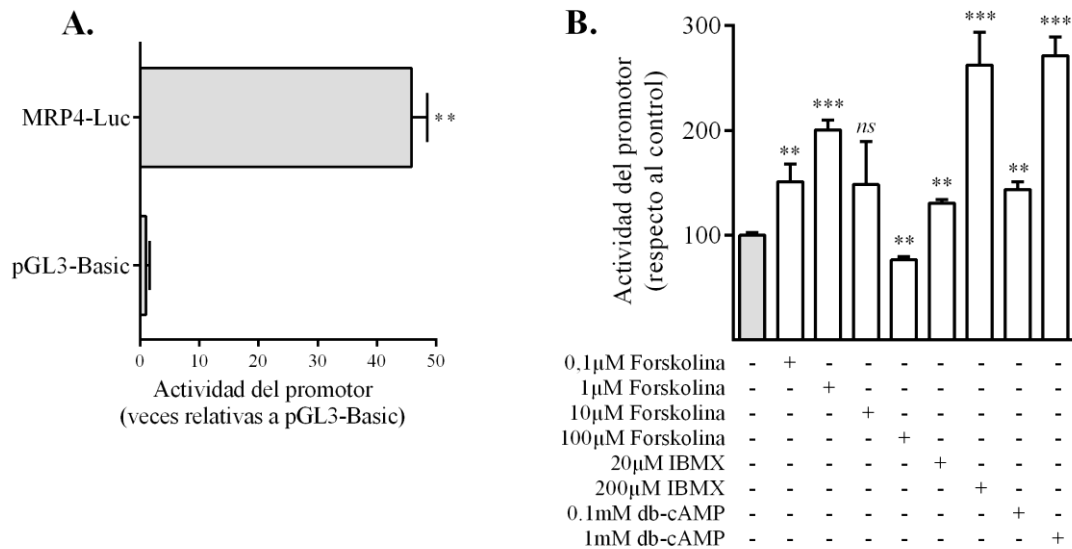


Figura 37. Efecto de agentes moduladores del AMPc en la actividad del promotor de MRP4. La línea celular de rata AR42J fue transfectada con la construcción reportera MRP4-Luc. **A.** Luego de 24h, fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. ** p<0,01 respecto a las células transfectadas con el vector pGL3-Basic vacío, usado como control. Los resultados

representan la media \pm ESM (n=3). **B.** Luego de 24h, las células fueron tratadas con distintos agentes a las concentraciones indicadas. Después de 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. ** p<0,01; *** p<0,001; ns, no significativo; respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

Por lo tanto, estos resultados indican que el incremento en los niveles de AMPc-i alcanzado por el tratamiento con los distintos agentes fue capaz de inducir la actividad del promotor de MRP4 y, en consecuencia, los mismos sugieren que el aumento de la concentración de este segundo mensajero en el espacio intracelular regula de forma positiva la transcripción de este transportador en las células AR42J.

En base a estos resultados, a continuación nos planteamos como objetivo determinar la vía de señalización involucrada en este proceso. Dado que la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) es la principal efectora de este nucleótido cíclico, en una primera instancia se evaluó si esta quinasa mediaba los efectos del AMPc-i sobre la expresión de MRP4. Para ello, las células AR42J fueron pre-incubadas con KT5720 10 μ M, un inhibidor específico y permeable de PKA, y luego estimuladas con agentes moduladores de AMPc. El tratamiento con KT5720 fue incapaz de inhibir tanto la inducción mediada por el db-AMPc como por IBMX (*Figura 38A*). A fin de confirmar estos resultados, las células fueron cotransfectadas con PKI (PKI wt), un péptido inhibidor de PKA, o con una mutante inactiva del mismo (PKI mut) usada como control. De forma coherente con los resultados anteriores, el péptido inhibidor no revirtió el efecto del tratamiento con forskolina, IBMX o db-AMPc sobre la actividad reportera (*Figura 38B*).

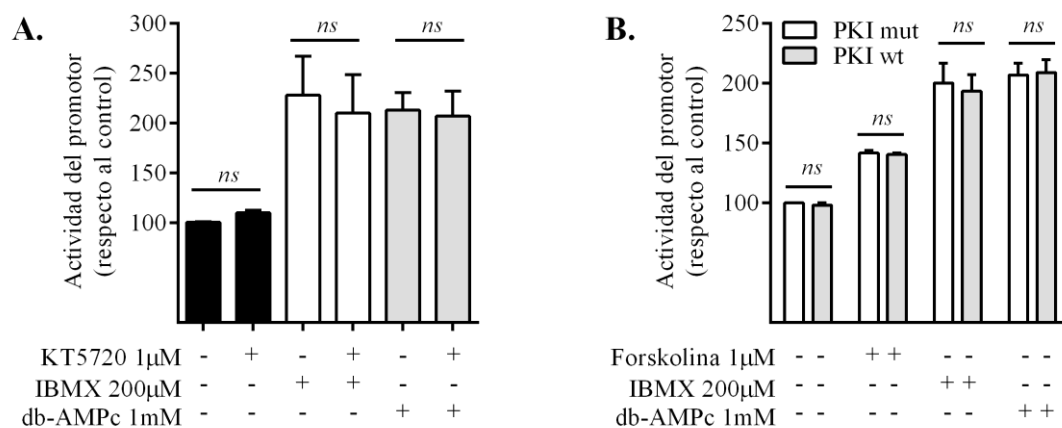


Figura 38. Papel de PKA sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4 mediada por AMPc. **A.** La línea celular de rata AR42J fue transfectada con la construcción reportera MRP4-Luc. Luego de 24h, las células fueron pre-incubadas con KT5720 1μM y tratadas con los agentes indicados. Después de 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. *ns*, no significativo; respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). **B.** La línea celular de rata AR42J fue transfectada con la construcción reportera MRP4-Luc y cotransfectadas PKI wt o PKI mut. Luego de 24h, las células fueron tratadas con los agentes indicados. Después de 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. *ns*, no significativo; respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media ± ESM (n=3).

Es importante remarcar que tanto KT5720 como PKI bloquearon la fosforilación de sustratos de PKA (PPKA) producida por la estimulación con forskolina en células AR42J (*Figura 39A* y *B* respectivamente), indicando que ambas estrategias efectivamente fueron capaces de inhibir la activación de PKA. **Por lo tanto, estos resultados demuestran que el efecto positivo sobre la actividad del promotor mediado por el aumento de los niveles de AMPc-i es independiente de PKA.**

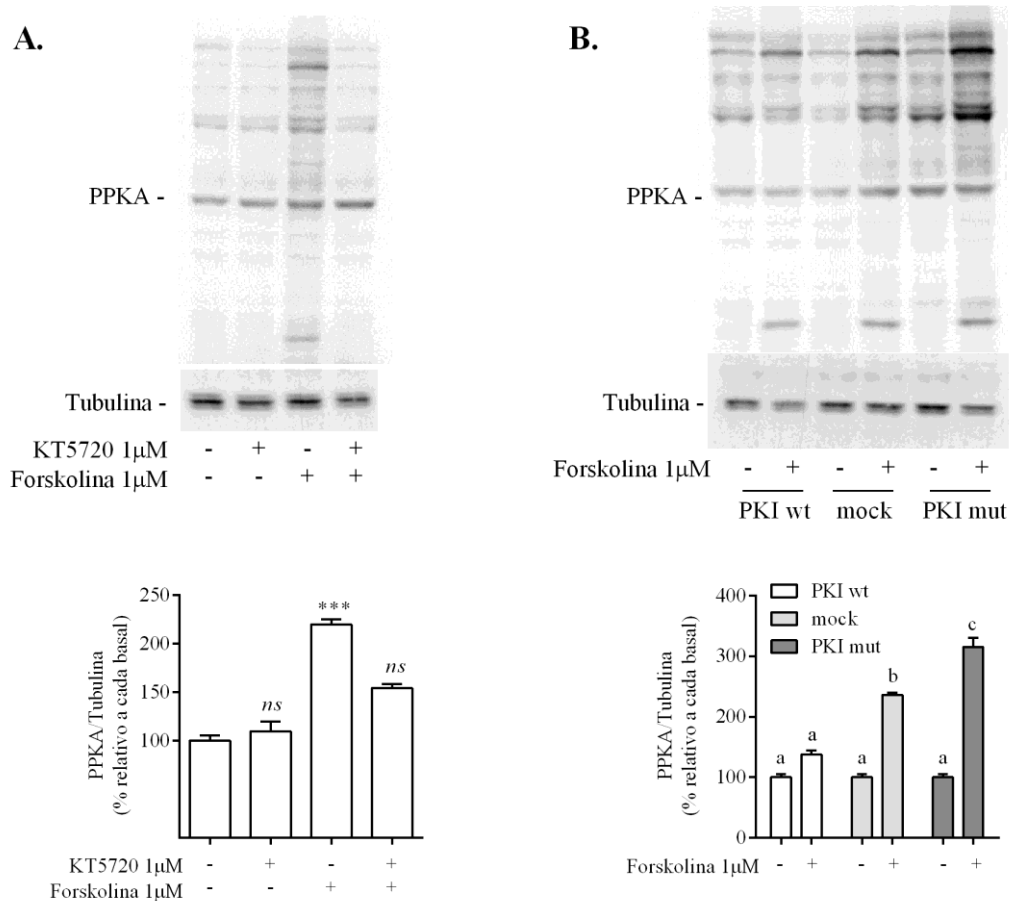


Figura 39. Control de la funcionalidad de los inhibidores de PKA en AR42J. Cuantificación de los niveles de sustratos fosforilados de PKA (PPKA) realizado mediante la técnica de western blot en AR42J. Se muestra la cuantificación por densitometría de las bandas de PPKA normalizadas a Tubulina (*abajo*) y un western blot representativo de tres experimentos independientes (*arriba*). En ambos casos, la preparación de las muestras y detección de las bandas específicas fueron realizados como se indica en la sección *Metodología A*. Células AR42J fueron tratadas con el inhibidor de PKA, KT5720, durante 30min. Posteriormente, las células se estimularon con forskolina 1μM por 15min. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). *ns*, no significativo; ***p<0,001 respecto al control. **B.** Las células AR42J fueron transfectadas con PKI wt, un péptido inhibidor de PKA, su mutante no funcional PKI mut o pCEFL, vector vacío (mock). Luego de 24h, las células fueron tratadas con forskolina 1μM por 14min. *ns*, no significativo; respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). Distintas letras indican p<0,05.

En base a estos resultados, a continuación se decidió evaluar si las proteínas Epac (acrónimo del inglés *exchange proteins activated by cAMP*), la otra familia de receptores intracelulares de AMPc, participaban en la regulación de MRP4 mediada por este nucleótido cíclico. Las proteínas Epac median muchas de las acciones del AMPc en las células y, en cáncer de páncreas particularmente, ha sido descrito que las mismas se

encuentra altamente expresadas, siendo sus niveles significativamente mayores en las células tumorales de páncreas con respecto al páncreas normal y tejidos aledaños (Lorenz et al. 2008). Más aún, la activación de la cascada AMPc/Epac-1/Rap1 ha sido asociada con la inhibición del crecimiento de líneas celulares de PDAC.

Con este objetivo en mente, las células AR42J transfectadas con la construcción reportera, fueron tratadas con 8-CPT-2Me-cAMP, un activador selectivo de Epac. Como se puede observar en la *Figura 40A*, la estimulación con este ligando produjo un aumento concentración-dependiente de la actividad del promotor de MRP4. De forma similar, la cotransfección con un plásmido que codifica para Epac-2 (también conocida como cAMP-GEF-II), isoforma de Epac que contiene un sitio adicional de unión a AMPc (CBD) de baja afinidad, provocó un aumento de la actividad basal del promotor y potenció la respuesta al db-AMPc (*Figura 40B y C* respectivamente). Con el fin de confirmar estos resultados, se cotransfectaron las células AR42J con un plásmido codificante para una mutante dominante negativa de Epac (N-Epac) que previamente había mostrado anular la actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF, acrónimo del inglés *guanine nucleotide exchange factor*) de esta proteína (Hochbaum et al. 2003). En coherencia con los resultados anteriores, N-Epac abolió la respuesta al db-AMPc sobre la actividad del promotor y redujo la actividad basal del mismo (*Figura 40B y C* respectivamente). De manera similar, el tratamiento con ESI-09, un inhibidor farmacológico selectivo de Epac, disminuyó la respuesta basal del promotor y la inducida por db-AMPc de forma concentración-dependiente. Es interesante remarcar que, la cotransfección de la construcción reportera con Epac-1 se comportó de forma análoga al tratamiento con los inhibidores de esta vía, fenómeno que podría ser explicado por competencia entre ambas isoformas por el AMPc.

Por lo tanto, en su conjunto estos resultados demuestran que la proteína Epac-2 es la efectora del efecto positivo del AMPc-i sobre la actividad transcripcional de MRP4 en las células AR42J.

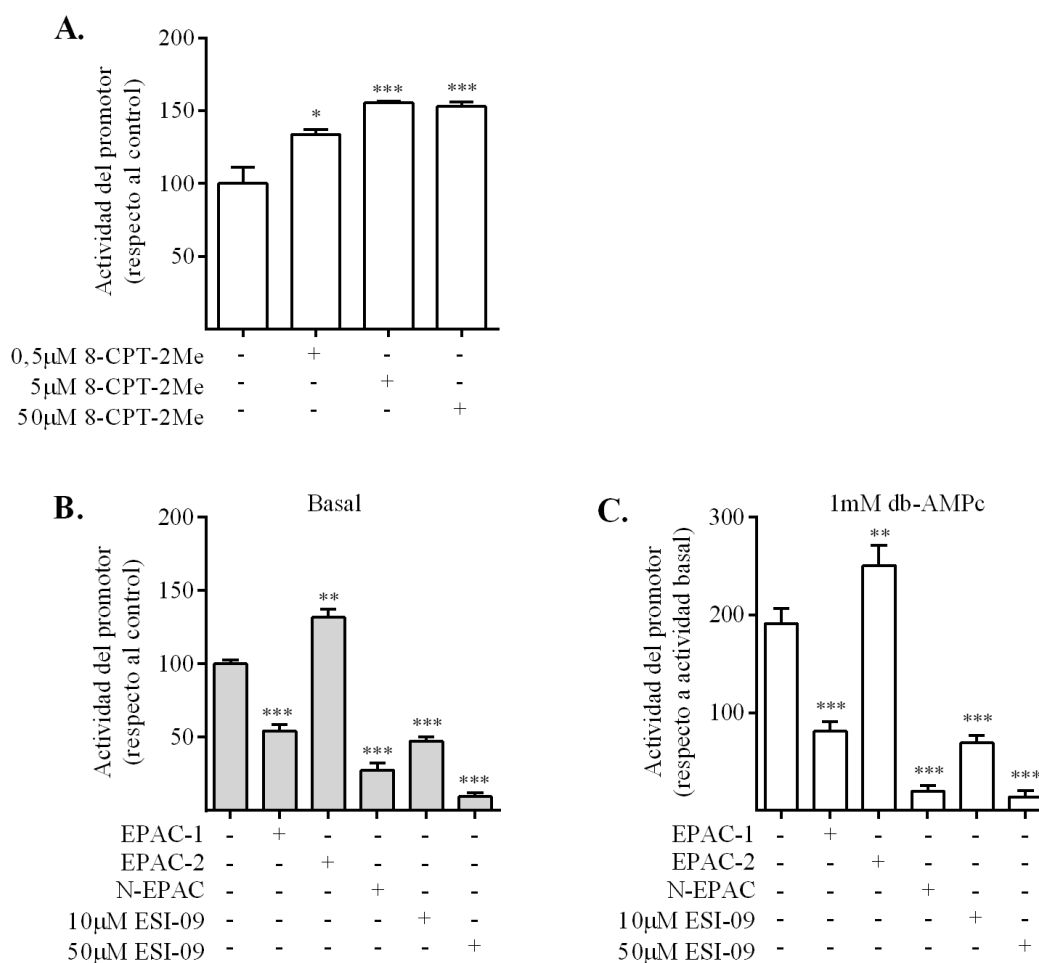


Figura 40. Papel de Epac sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4 mediada por AMPc. **A.** Células AR42J fueron transfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc. Luego de 24h, las células fueron tratadas con 8-CPT-2Me-AMPc (8-CPT-2Me), activador selectivo de Epac. Después de 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). **B y C.** La línea celular de rata AR42J fue transfectada con la construcción reportera MRP4-Luc y cotransfectadas con Epac-1, N-Epac o Epac-2 de acuerdo a como se indica en las figuras. Luego de 24h, las células fueron tratadas con ESI-09 y/o db-AMPc (C). A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3).

Debido a que las proteínas Epac se comportan como GEFs específicos de los miembros de pequeñas GTPasa Rap, a continuación decidimos evaluar la participación de estas proteínas río abajo de la respuesta de AMPc mediada por Epac-2. Para ello, las células AR42J fueron cotransfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc y plásmidos que codifican para las versiones salvajes de Rap1a y Rap1b. A pesar de que

únicamente Rap1a aumentó significativamente los niveles basales de luciferasa (*Figura 41A*), tanto Rap1a como Rap1b potenciaron el efecto inductor de forskolina sobre la actividad del promotor de MRP4 (*Figura 41B*). En forma coherente con estos resultados, la cotransfección con la construcción Rap-GAP (acrónimo del inglés de *Rap GTPase activating protein*), la cual acelera la hidrólisis de GTP de Rap1 favoreciendo de esta manera su forma inactiva, anuló la respuesta del promotor a forskolina. **En consecuencia, los resultados obtenidos demuestran que las proteínas de la familia de Rap1 median los efectos del AMPc sobre el promotor de MRP4 río abajo de Epac.**

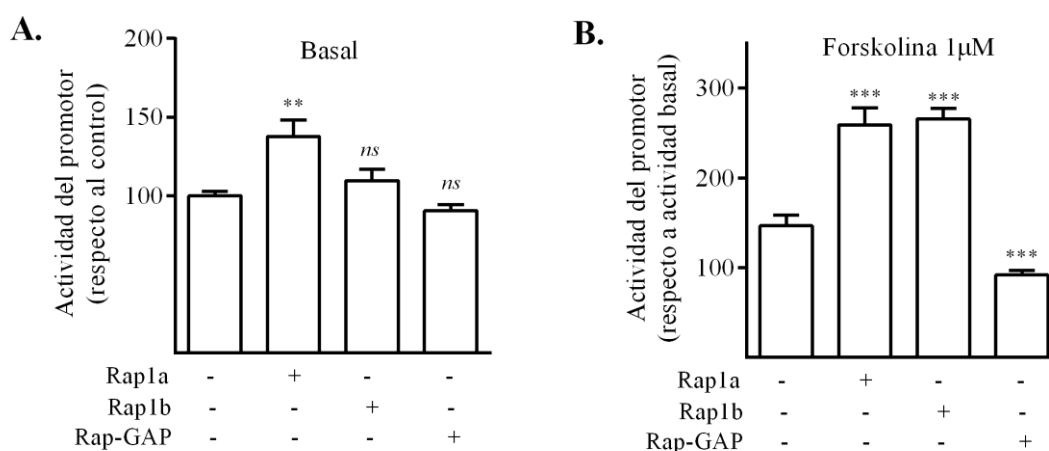


Figura 41. Papel de Rap sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4 mediada por AMPc. La línea celular AR42J fue transfectada con la construcción reportera MRP4-Luc y cotransfectadas con las construcciones que codifican para las versiones salvajes de Rap1a y Rap1b o para Rap-GAP de acuerdo a como se indica en las figuras. Luego de 24h, las células fueron tratadas con forskolina 1µM (**B**). A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. **p<0,01; ***p<0,001; ns, no significativo, respecto al control sin tratar. Los resultados representan la media ± ESM (n=3).

Como fue mencionado en la *Introducción*, han sido descriptos numerosos efectores de la cascada de Epac/Rap, entre ellos las vías de las quinasas PI3K y MEK/ERK.

Previamente, Dreuw y colaboradores demostraron, en queratinocitos y fibroblastos dérmicos, que la cascada de PI3K se encontraba involucrada en la regulación de la expresión de MRP4 mediada por la interleuquina-6 (Dreuw et al. 2005). Por lo tanto, a continuación, se decidió evaluar si la vía PI3K/Akt/mTOR participaba en la regulación de MRP4 mediada por la cascada AMPc/Epac/Rap en AR42J. Con este propósito, se

evaluó el efecto de los inhibidores de PI3K wortmanina y LY294002, y de rapamicina, un clásico inhibidor de mTOR, sobre la actividad transcripcional de la construcción reportera. Como se observa en la *Figura 42*, ninguno de los inhibidores utilizados modificó la actividad basal del promotor ni el efecto inducido por el tratamiento con forskolina. De forma coherente con estos resultados, la cotransfección de MRP4-Luc con una construcción constitutivamente activa de Akt (Akt-myr) tampoco alteró la respuesta del sistema. **En consecuencia, estos resultados indican que la cascada PI3K/Akt/mTOR no media los efectos del AMPc-i sobre la expresión de MRP4 en las células AR42J.**

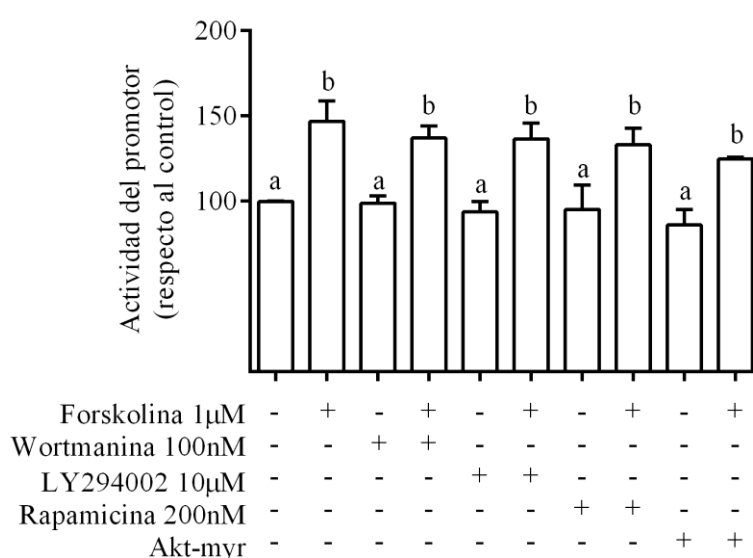


Figura 42. Participación de la cascada PI3K/Akt/mTOR sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4 mediada por AMPc. Células AR42J fueron transfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc y, luego de 24h, fueron tratadas con los inhibidores de PI3K wortmanina y LY294002; el inhibidor de mTOR rapamicina; o cotransfectadas con una construcción constitutivamente activa de Akt (Akt-myr); en presencia o ausencia de forskolina. A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). Letras distintas indican $p < 0,05$.

Por el contrario, cuando se evaluó la cascada de MEK/ERK, se observó que el tratamiento con PD98059 o UO126, ambos inhibidores de la misma, aumentó significativamente tanto la actividad basal del promotor como la inducida por db-AMPc. A su vez, la cotransfección de las células AR42J con mutantes dominantes negativas de K-Ras y H-Ras, ambos activadores río arriba de MEK/ERK, produjo un incremento de la actividad transcripcional del promotor de MRP4. Por otro lado, en concordancia con

estos resultados, el tratamiento con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un activador de esta vía, condujo a una disminución de alrededor del 50% de la actividad basal del promotor (*Figura 43*). **En conclusión, la cascada de MEK/ERK regula de forma negativa la actividad transcripcional del promotor de MRP4.**

Por otra parte, la potenciación del efecto del db-AMPC observado luego de la inhibición de MEK/ERK podría sugerir que esta cascada estaría involucrada en los efectos mediados por el aumento del AMPC-i sobre la expresión de este transportador río abajo de Epac-2/Rap1.

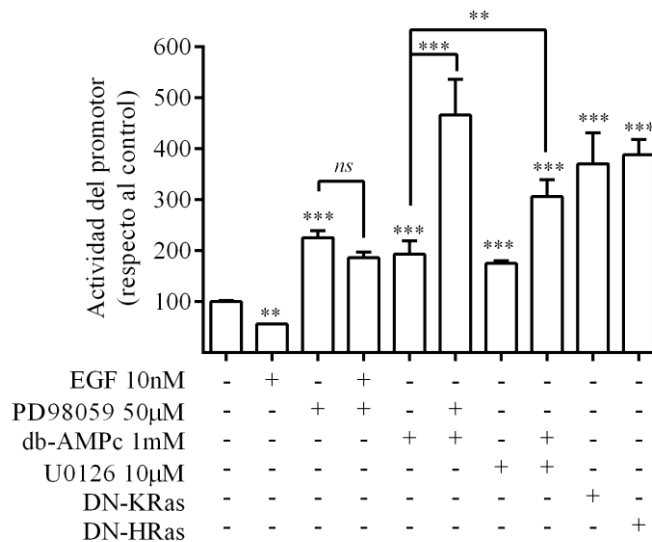


Figura 43. Participación de la cascada MEK/ERK sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4. Células AR42J fueron transfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc y, luego de 24h, fueron tratadas con db-AMPC y los inhibidores de MEK/ERK PD98059 y UO126; el factor de crecimiento epidérmico (EGF), activador clásico de esta vía; o cotransfectadas con mutantes dominantes negativas de K-Ras (DN-KRas) o H-Ras (DN-H-Ras). A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). **p<0,01; ***p<0,001; ns, no significativo, con respecto al control sin tratar, a menos que se aclare lo contrario.

Como fue demostrado tanto en la primera parte de esta tesis como en trabajos previos, en muchos tipos de tumores la exclusión de AMPC mediada por MRP4 cumple un rol crucial en la regulación de los niveles de este segundo mensajero. Por lo tanto, a fin de caracterizar la relevancia de este proceso en el modelo de estudio utilizado, se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de MRPs sobre el balance entre los niveles intra- y extracelulares de AMPC en las células AR42J. Como puede observarse

en la *Figura 44A*, en ensayos de acumulación de AMPc durante 6h, el tratamiento con MK571 determinó significativamente una disminución de 10 veces en los niveles de extracelulares de AMPc y un aumento de 1,7 veces en los niveles intracelulares de dicho nucleótido cíclico. Es interesante remarcar que, a diferencia de lo observado anteriormente en las células de PDAC humanas, los resultados obtenidos indican que, en este sistema, la inhibición de la exclusión de AMPc fue capaz de aumentar los niveles de este segundo mensajero en el compartimiento intracelular. Por consiguiente, a continuación se decidió evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de MRPs sobre la actividad transcripcional de MRP4. Para ello, las células AR42J transfectadas con la construcción reportera MRP4-luc fueron tratadas con distintas concentraciones de MK571 durante 48h. De esta forma, se observó un aumento concentración-dependiente de la actividad del promotor de MRP4 producto del tratamiento con el inhibidor (*Figura 44B*), indicando que la inhibición de MRPs induce la expresión transcripcional de MRP4. Más aún, dado que la inhibición farmacológica de los transportadores modula tanto los niveles intra- como extracelulares de AMPc, en su conjunto estos resultados podrían sugerir que el balance entre los mismos podría ser determinante en el efecto de este segundo mensajero sobre la expresión de este transportador.

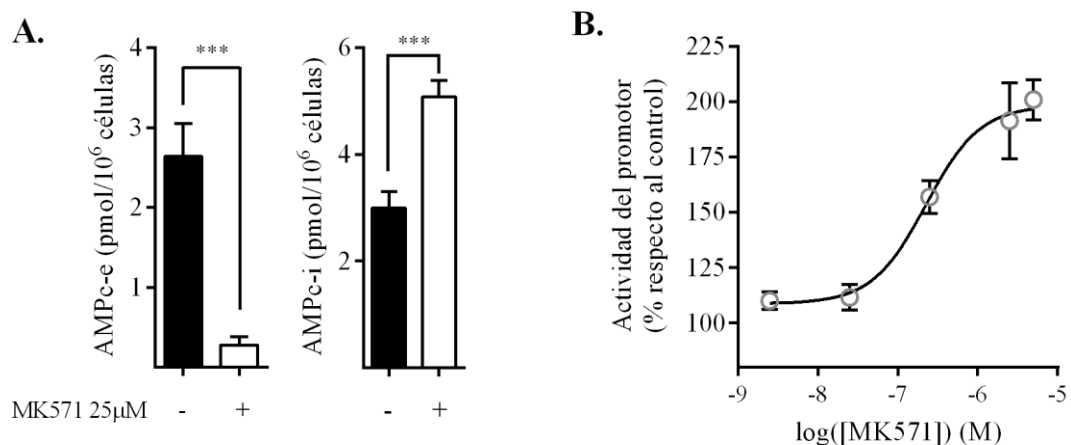


Figura 44. Efecto de la inhibición de MRPs sobre el balance de AMPc-i/-e y sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4 en AR42J. **A.** Ensayo de acumulación de AMPc en células AR42J. Las células fueron sembradas en placas de seis pocillos y los niveles de AMPc fueron evaluados luego de 6h de tratamiento con MK571 25 μM según se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media ± ESM (n=3). ***p<0,001. **B.** Células AR42J fueron transfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc y, luego de 24h, fueron tratadas con las concentraciones indicadas de MK571. A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media ± ESM (n=3).

En este sentido, es importante recordar que previamente (*Figura 36B*) se había observado una respuesta paradójal de la actividad del promotor de MRP4 frente al tratamiento con forskolina. Por lo tanto, a continuación se decidió evaluar la relación entre el AMPc-i y el -e (AMPc-i/-e) luego del tratamiento, durante 30min, con concentraciones altas (333 μ M) y bajas (1 μ M) de forskolina, las cuales habían demostrado reducir o inducir respectivamente la actividad de luciferasa (*Figura 45A*). De esta forma, se observó que el estímulo con forskolina 333 μ M generó una relación AMPc-i/-e similar a la basal, mientras que el tratamiento con 1 μ M de forskolina indujo una relación significativamente mayor (*Figura 45B*). Es importante remarcar que, cuando 333 μ M de forskolina se añadieron concomitantemente a MK571, tanto la actividad del promotor como la relación AMPc-i/-e aumentaron significativamente con respecto al control (*Figura 45A y B*). Curiosamente, el perfil de la actividad de luciferasa, obtenido para los distintos tratamientos, es similar al obtenido para las relaciones entre los niveles de AMPc entre los compartimientos intra- y extracelulares.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los agentes que modulan a la cascada del AMPc únicamente inducen la expresión transcripcional de MPR4 cuando provocan un aumento significativo en la relación entre el AMPc-i y el AMPc-e.

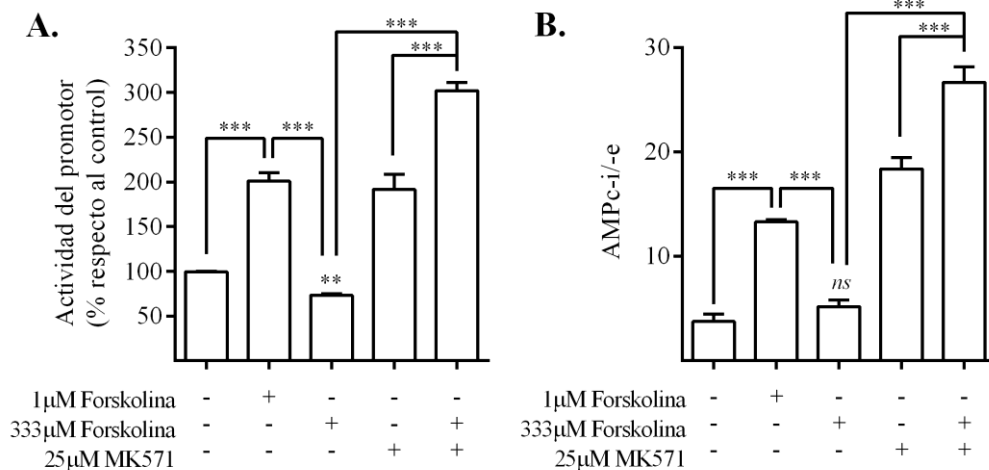


Figura 45. Efecto del balance entre el AMPc-i y -e sobre la actividad del promotor de MRP4. **A.** Células AR42J fueron transfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc y, luego de 24h, fueron tratadas con las concentraciones indicadas de forskolina y/o MK571. A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). **p<0,01; ***p<0,001. **B.** Ensayo de producción de AMPc en células

AR42J. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y los niveles de AMPc-i y -e fueron evaluados luego de 30min de tratamiento con las concentraciones indicadas de forskolina y/o MK571 25 μ M según se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3) y se expresan como la relación entre los niveles de AMPc-i y -e obtenidos para cada condición. ***p<0,001; ns, no significativo respecto al control.

En base a estos resultados, se podría suponer que, además de los efectos descriptos para el AMPc-i, algún sustrato endógeno excluido por MRP4, como AMPc o PGE₂, podría estar implicado en la regulación de la expresión de este transportador. Dado que previamente fue demostrado que el AMPc-e puede comportarse como una molécula señalizadora en el espacio extracelular, se evaluó el efecto del tratamiento con este nucleótido cíclico (que, como se mencionó anteriormente, es incapaz de atravesar membranas) sobre la actividad del promotor de MRP4. Luego de 48h de tratamiento, el AMPc produjo una disminución del 45% de la actividad de luciferasa en células AR42J (*Figura 46A*). De forma coherente, el tratamiento con el mismo, revirtió parcialmente la respuesta a MK571, demostrando por lo tanto, la participación del AMPc en una regulación negativa de la expresión de MRP4 desde el compartimiento extracelular. Por otra parte, el estímulo con PGE₂ no modificó la actividad de luciferasa con respecto al control, excluyendo su papel en la regulación observada luego de la inhibición farmacológica de MRPs.

Sabiendo que la cascada de MEK/ERK puede mediar efectos negativos sobre la actividad transcripcional de MRP4 y que el AMPc-e es capaz de activar esa vía en las células PANC-1, a continuación evaluamos el papel de ERK sobre los efectos observados para el AMPc-e en las células AR42J. En una primera instancia, se evaluó mediante ensayos de western blot el resultado del tratamiento con AMPc en este sistema, observando, al igual que en las células de PDAC humano, un aumento rápido de los niveles de pERK (*Figura 46B*). Por otra parte, en ensayos de gen reportero, el inhibidor de MEK/ERK PD98059 abolió completamente el efecto negativo del AMPc sobre la actividad del promotor de MRP4 (*Figura 46A*).

Por lo tanto, estos resultados indican que el AMPc en el compartimiento extracelular aumenta la fracción fosforilada de ERK en células AR42J y que el mismo disminuye la actividad transcripcional de MRP4 por activación de la cascada de MEK/ERK.

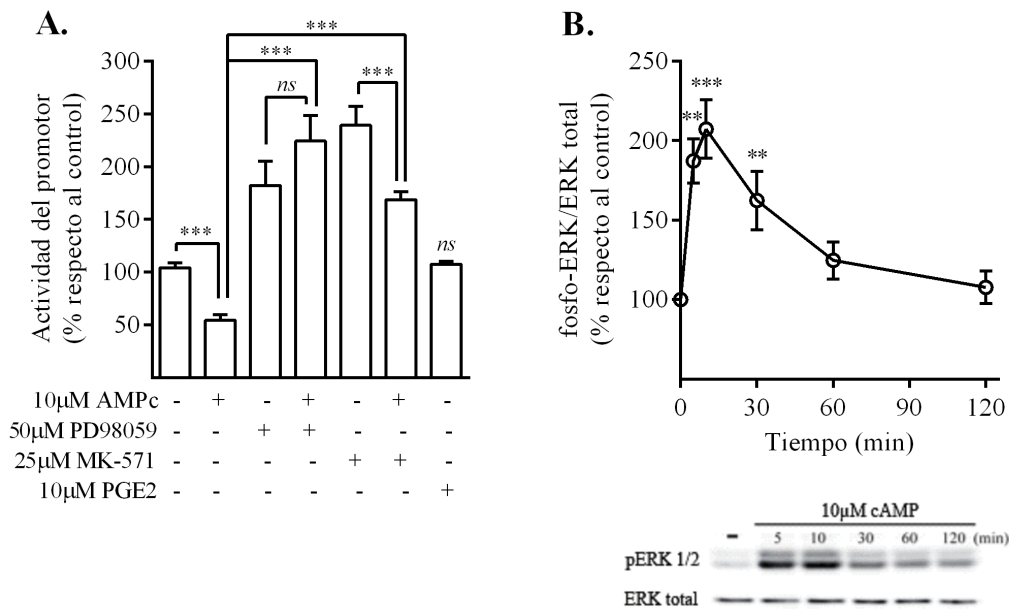


Figura 46. Papel del AMPc-e sobre la regulación de la actividad del promotor de MRP4. **A.** Células AR42J fueron transfectadas con la construcción reportera MRP4-Luc y, luego de 24h, fueron tratadas con los agentes indicados. A las 48h de tratamiento fue determinada la actividad de luciferasa como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=3). ***p<0,001; ns, no significativo, respecto al control. **B.** Las células AR42J fueron sembradas a una densidad de 500.000 células/pocillo. Luego de ser hambreadas durante 24h, las células fueron estimuladas con AMPc 10µM durante los tiempos indicados. Cantidades iguales de proteínas fueron sometidas a SDS-PAGE y analizadas por western blot según se describe en la sección *Metodología*. Se muestra membrana representativa de tres ensayos independientes (*abajo*) y densitometría de las mismas (*arriba*) realizada con el programa ImageJ (NIH, USA). Los datos representan la media \pm ESM (n=3).

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que MRP4 es regulado a nivel transcripcional por el AMPc a través de un mecanismo dual en las células AR42J, en el cual el balance entre los niveles intra- y extracelulares de este segundo mensajero juega un papel clave en la regulación de la expresión del transportador. Por un lado, el aumento sostenido del AMPc-i aumenta la actividad del promotor de MRP4 a través de la vía Epac-2/Rap1, mientras que el AMPc-e la inhibe a través de la cascada de MEK/ERK.

Finalmente, con el objetivo de validar a MRP4 como blanco terapéutico en PDAC, evaluamos, mediante un abordaje molecular, sus implicancias sobre la progresión tumoral *in vivo*.

3.12 Efecto del silenciamiento de MRP4 en el crecimiento de las células PANC-1 *in vivo*

Los resultados obtenidos *in vitro* hasta este punto, demostraron la asociación del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 con el proceso de proliferación y migración de células de PDAC. Debido a lo promisorio de la información derivada de los mismos, se decidió continuar el proceso de validación de esta diana biológica, para el tratamiento del cáncer de páncreas, en modelos de xenotransplantes en ratones Swiss nu/nu (*nude*). Estos ratones poseen una disrupción del gen FOXP1 en el cromosoma 11, el cual codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de citoqueratina, involucrada en el desarrollo del epitelio del timo. Por lo tanto, estos ratones carecen de células T maduras y, como resultado, presentan pérdida de la reacción inmune derivada de las mismas, permitiendo su uso en xenotransplantes (Su et al. 2003). El pasaje desde estudios *in vitro* a modelos animales es interesante, dado que incrementan en gran medida la capacidad de estudiar la eficacia de un posible tratamiento, ya que permiten abordar el estudio del crecimiento tumoral en un entorno con mayor similitud al de los tumores originales. Con este fin, se inyectaron de forma subcutánea 5 millones de células por ratón, de los clones PANC-scramble, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2. Los tumores fueron medidos cada 3 días durante 35 días, evaluando la incidencia y el volumen tumoral en cada caso. El grado de incidencia de los tumores fue 91% para PANC-scramble, 55% para PANC-MRP4sh2 y 27% para PANC-MRP4sh1. Dado que los clones PANC-MRP4sh1 poseen menores niveles de MRP4 que los PANC-MRP4sh2 (49% y 69% respectivamente con respecto a PANC-scramble), estos resultados indican que la inhibición de MRP4 afecta la capacidad de las células de PDAC de generar tumores.

De forma similar, la velocidad de crecimiento de los tumores fue significativamente menor en los clones con menores niveles de MRP4 (*Figura 47A*), alcanzando un volumen final que nuevamente correlacionó con el grado de expresión de este transportador (*Figura 47B*). Por lo tanto, estos resultados confirman las observaciones realizadas *in vitro*, e indican que el silenciamiento de MRP4 disminuye la malignidad de las células PANC-1.

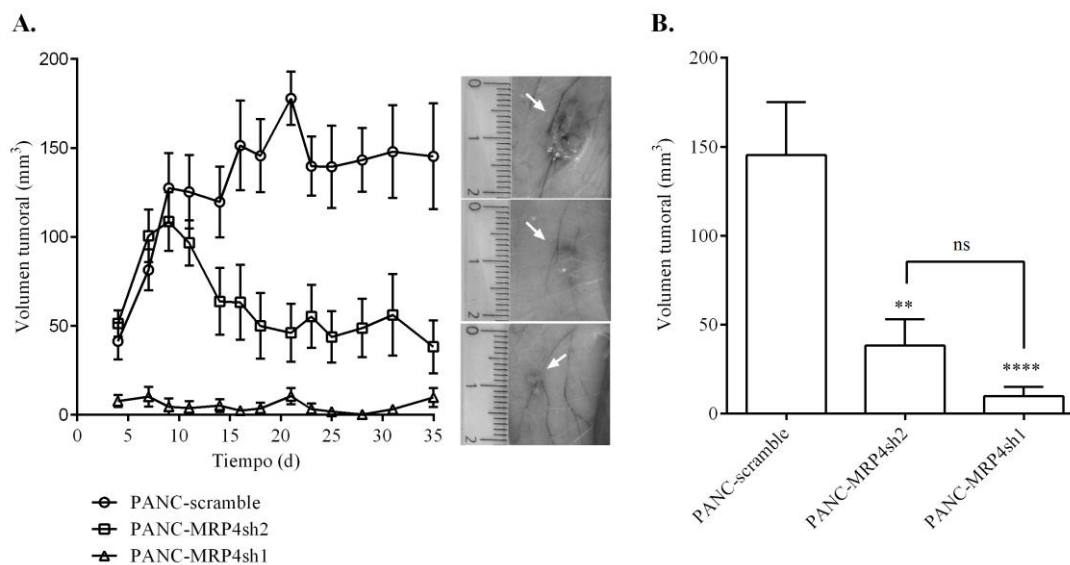


Figura 47. Efecto del silenciamiento de MRP4 en células PANC-1 sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplantes en ratones *nude*. **A.** Los clones PANC-scramble, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2 fueron inyectados de forma subcutánea en ratones *nude*. El volumen tumoral fue medido cada 3 días durante 35 días como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=11). **B.** Volumen tumoral de los clones mencionados en el punto A medidos al día número 35 desde la inyección. Los datos representan la media \pm ESM (n=11). ****p<0,0001; **p<0,01; ns: no significativo.

A continuación, se evaluó la morfología tumoral, mediante tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de secciones de los tumores provenientes de las inyecciones con los clones mencionados (*Figura 48*). El estudio realizado se enfocó sobre la organización del tejido (evaluado a baja magnificación), las características citológicas de las células tumorales, mitosis y apoptosis. Los clones PANC-scramble, utilizados como control, mostraron adenocarcinomas pobremente diferenciados, compuestos por láminas de células envueltas por un estroma fino. El análisis citológico exhibió un alto grado nuclear y cantidades variables de citoplasma eosinófilo. El 90% de la masa tumoral presentó cromatina laxa con prominentes nucleoli, figuras mitóticas aberrantes y ocasionales cuerpos apoptóticos. Por otra parte, las células PANC-MRP4sh2 presentaron una disminución significativa de cromatina laxa (50% de la población celular) y mitosis, lo cual sugiere una disminución dramática en la proliferación celular. A su vez, el número de cuerpos apoptóticos aumentó. Por último, en el caso de las células PANC-MRP4sh1, las cuales presentan menores niveles de MRP4, únicamente se observaron células tumorales aisladas, presentando en algunos

casos pequeños grupos de 4-5 células. No fueron observados casos evidentes de mitosis ni apoptosis.

Por lo tanto, el silenciamiento de MRP4 condujo a una disminución del índice mitótico de las células de PDAC inyectadas, de manera coherente con la tasa de crecimiento tumoral, y que correlaciona con el grado de inhibición del transportador. A su vez, en las células silenciadas se observó un aumento del número de cuerpos apoptóticos, lo cual podría sugerir que, a diferencia de lo observado *in vitro*, la inhibición de MRP4 induce apoptosis de las células de PDAC *in vivo*. Para confirmar esta suposición, al momento de redacción de esta tesis, se están realizando ensayos de TUNEL sobre estos cortes.

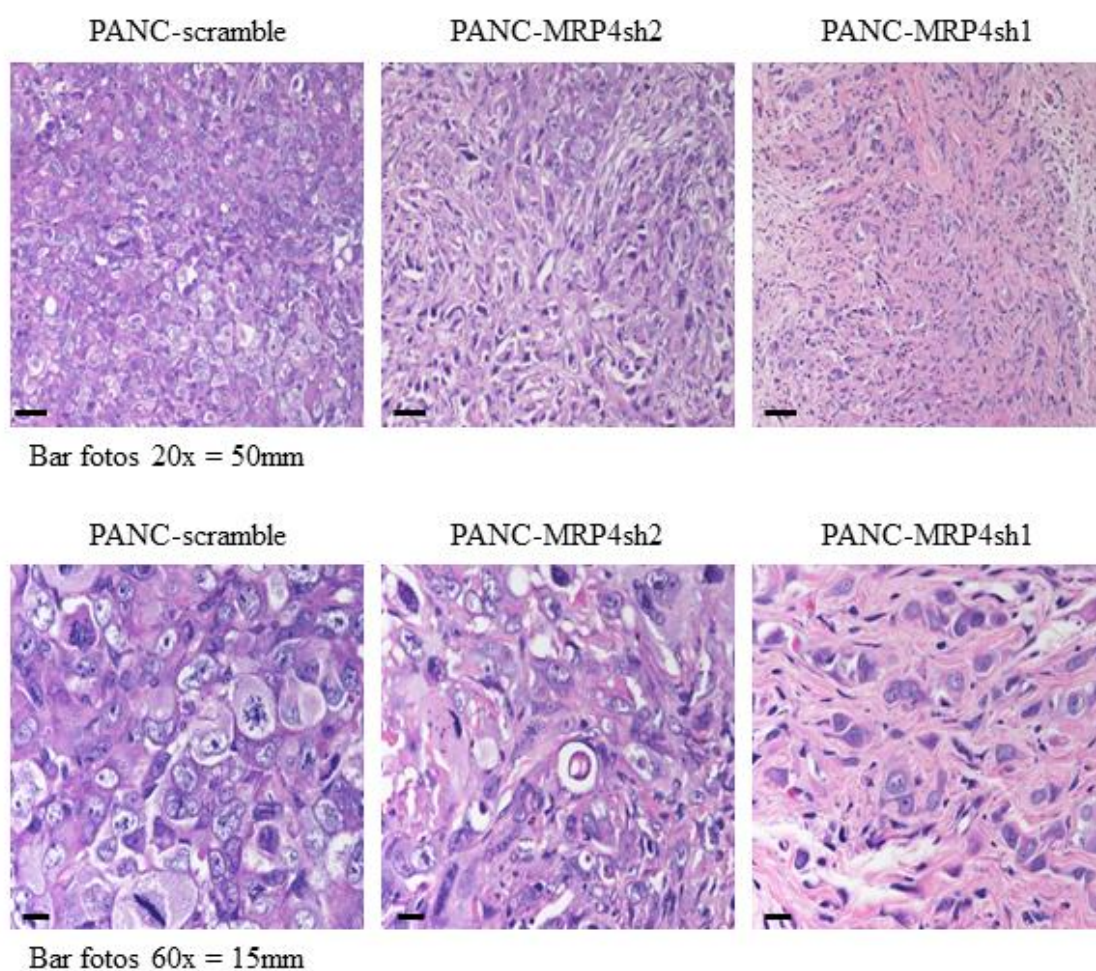


Figura 48. Efecto del silenciamiento de MRP4 en células PANC-1 sobre la morfología tumoral en modelos de xenotransplantes en ratones *nude*. Los clones PANC-scramble, PANC-MRP4sh1 y PANC-MRP4sh2 fueron inyectados de forma subcutánea en ratones *nude*. Al día 35 los ratones fueron sacrificados, y el tumor fue extraído y procesado como se describe en la sección *Metodología* con el fin de su evaluación histológica. La figura muestra imágenes representativas de los cortes tumorales teñidos con H&E. El número de células mitóticas fue contado en la sección teñida con H&E usando una

magnificación 600x, mediante evaluación directa de 10 HPF (del inglés *high power fields*) para cada corte.

Con el fin de reforzar los resultados obtenidos en los ratones *nude*, se decidió repetir el ensayo en ratones *SCID* (del inglés *severe combined immunodeficiency*). En este modelo, los ratones portan una mutación recesiva en el cromosoma 16, responsable de una deficiencia en la actividad enzimática involucrada en la reparación del ADN (*Prkdc* o *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*). Esta deficiencia resulta finalmente en una inhabilidad de las células T y B para madurar y, por lo tanto, en una pérdida completa de la inmunidad adaptativa de los mismos, impidiendo el rechazo de xenotransplantes (Ito et al. 2002). Dado los resultados obtenidos con los ratones *nude*, y a fin de reducir el número de animales sacrificados en los ensayos, se decidió utilizar únicamente los clones PANC-MRP4sh1, que expresaban menores niveles de MRP4 y los PANC-scramble como control. En este caso, la inyección de los clones silenciados presentó un grado de incidencia tumoral del 40%, en comparación a un 100% en los clones usados como control. Por otra parte, el crecimiento tumoral fue menor en los clones PANC-MRP4sh1, presentando una disminución significativa al cabo de los 35 días post-inyección (*Figura 49*). Los resultados obtenidos en este modelo concuerdan con las observaciones realizadas en los ratones *nude*.

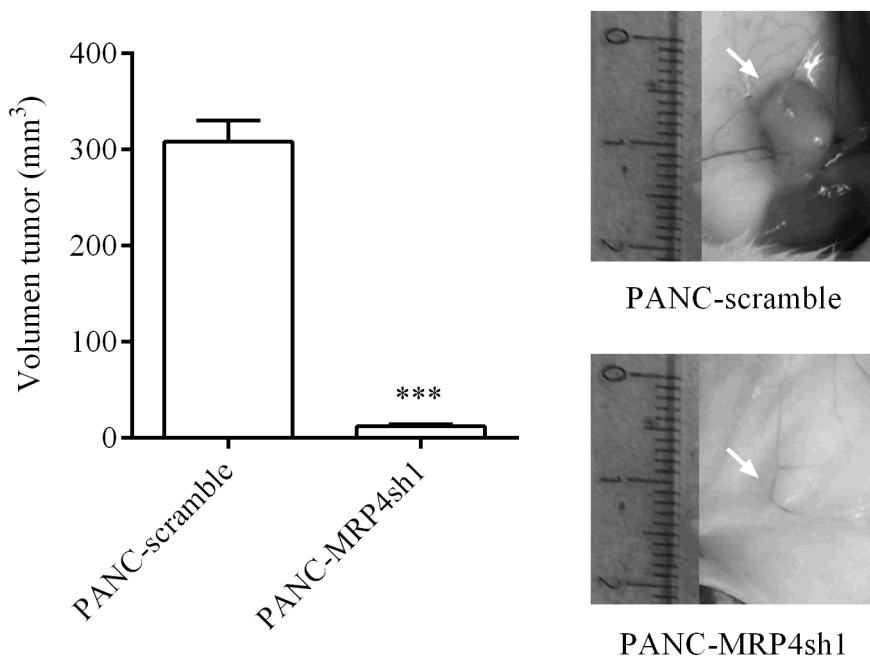


Figura 49. Efecto del silenciamiento de MRP4 en células PANC-1 sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplantes en ratones *SCID*. Los clones PANC-scramble y PANC-MRP4sh1 fueron

inyectados de forma subcutánea en ratones *SCID*. El volumen tumoral fue medido cada 3 días durante 35 días como se describe en la sección *Metodología*. Los resultados representan la media \pm ESM (n=6) del volumen tumoral medidos al día número 35 desde la inyección. ***p<0,001

En conclusión, los resultados obtenidos en estos experimentos indican que la disminución de la expresión de MRP4 conduce a una menor tumorigenicidad y menor malignidad de las células PANC-1.

4. Discusión

El proceso de exclusión del AMPc regula los niveles de este nucleótido cíclico en líneas celulares de PDAC

Desde su descubrimiento el AMPc ha sido utilizado como paradigma del concepto de segundo mensajero intracelular. Su síntesis comienza con la estimulación de un receptor transmembrana acoplado a la proteína G estimuladora (Gs) que activa a la adenilato ciclasa (AC) para producir AMPc a partir de ATP. A fin de controlar los niveles de este segundo mensajero, permitiendo de esta forma acotar la respuesta y volver a los niveles basales del sistema, clásicamente han sido descritos dos mecanismos: su degradación mediada por PDEs y la desensibilización del receptor estimulado.

Pocos años después del descubrimiento del AMPc, se reportó, en eritrocitos nucleados, la existencia de un mecanismo de exclusión de AMPc sensible a probenecid (Davoren and Sutherland 1963). Con el correr de los años, numerosos reportes han demostrado que el AMPc puede ser transportado al espacio extracelular luego de la estimulación con un agonista en diversos tipos celulares incluyendo adipocitos, hepatocitos, células epiteliales de riñón, neuronas, fibroblastos, linfocitos T y músculo esquelético (Strewler 1984, Rosenberg and Dichter 1989, Strouch et al. 2005). Más aún, este proceso mostró ser específico para ciertos tipos celulares ya que en otros no se encuentra presente (Hofer and Lefkimmatis 2007).

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis demostraron la presencia del proceso de exclusión de AMPc en las líneas celulares de PDAC: PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II. Cuando las células fueron estimuladas con forskolina (activador directo de la AC), inmediatamente después de un incremento en la concentración de AMPc intracelular (AMPc-i) se observó un aumento del AMPc extracelular (AMPc-e). Este proceso resultó ser independiente del estímulo que incrementa la concentración de este segundo mensajero, ya que resultados similares se obtuvieron con isoproterenol (agonista β -adrenérgico) y amfetamina (agonista rH2).

Diversos autores han planteado que, en contraste con el mecanismo de degradación del AMPc mediado por PDEs, la exclusión de este nucleótido cíclico es un proceso relativamente lento y de baja capacidad, por lo cual, no cumpliría un papel importante en el control de la señalización intracelular de dicho segundo mensajero (Ahlstrom and

Lamberg-Allardt 1999). Por ejemplo, en fibroblastos y en células de músculo liso se ha observado que el probenecid, inhibidor del eflujo de nucleótidos cíclicos, no modificó los niveles de AMPc-i comparado con el control (Barber and Butcher 1981, Fehr et al. 1990).

Contrastando con estos antecedentes, los resultados obtenidos en células de PDAC en presencia de los distintos agentes que estimulan la síntesis del AMPc, amtamina, isoproterenol o forskolina, demostraron que el mecanismo de exclusión está directamente implicado en la regulación de los niveles de este segundo mensajero. Más aún, dado que en los tres casos observamos un incremento en los niveles de AMPc-e luego del tratamiento con los agentes mencionados, incluso en presencia de la acción de las PDEs, los resultados obtenidos descartan la posibilidad que el proceso de exclusión sea un mecanismo de regulación accesorio a la degradación del AMPc.

Como se describió anteriormente, dos procesos han sido asociados clásicamente a la regulación de los niveles de AMPc: la desensibilización del receptor estimulado y la degradación de este nucleótido cíclico mediado por PDEs. La estimulación con forskolina (que no activa receptores de membrana) en conjunto con el tratamiento con el inhibidor general de PDEs metil-isobutil-xantina (IBMX), indujo mayores niveles de AMPc-i y -e. Por lo tanto, estos resultados indican que el proceso de exclusión del AMPc tiende además a compensar la ausencia de los otros mecanismos de regulación logrando así mantener ciertos niveles de este segundo mensajero dentro de la célula.

Por lo tanto, el conjunto de estos resultados demuestran, por primera vez, la presencia del proceso de exclusión de AMPc en líneas celulares de PDAC. A su vez, indican que, el mismo, participa en la regulación de los niveles de este segundo mensajero, independientemente del estímulo que incremente los niveles del AMPc.

Por otra parte, en ensayos de concentración respuesta frente a forskolina se demostró que el transporte de AMPc depende de los niveles de AMPc-i sintetizados. Más aún, es interesante remarcar que se observó un correlato entre el grado de diferenciación de las líneas celulares de PDAC evaluadas y la capacidad de exclusión de AMPc, siendo esta mayor en las líneas más indiferenciadas. Dado que la cascada del AMPc ha sido asociada a la inducción de la diferenciación celular en varios tumores, tales como leucemias (Copsel et al. 2011), neuroblastomas (Prasad and Kumar 1975) y cáncer de mama (Klein and Loizzi 1977), es posible suponer que el aumento de la exclusión de este nucleótido cíclico sea un mecanismo que conferiría una ventaja

adaptativa a subpoblaciones de células de cáncer de páncreas, evitando su diferenciación y manteniendo así una elevada tasa de crecimiento y malignidad.

Los MRPs, y en particular MRP4, son responsables de la exclusión del AMPc en las células de PDAC humanas

Los MRPs fueron inicialmente identificados por conferir resistencia a una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos, siendo responsables del fenómeno clínico conocido como resistencia a multidrogas (MDR) (Borst et al. 2000). Con el correr de los años, se ha incrementado el conocimiento sobre el papel que estas proteínas poseen en diversos procesos fisiológicos. En particular, se ha demostrado que el MRP4, el MRP5 y el MRP8 tienen la capacidad de transportar nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, al espacio extracelular (van Aubel et al. 2002, Guo et al. 2003, Ritter et al. 2005). A pesar de que, como se mencionó anteriormente, el proceso de exclusión de nucleótidos cíclicos ha sido observado por décadas, los transportadores involucrados en dicho proceso fueron recientemente identificados.

Como se mencionó en la sección *Introducción*, los MRPs se encuentran expresados en una amplia variedad de células normales y neoplásicas. En diversas líneas celulares ha sido correlacionado el patrón de expresión de proteínas transportadoras con el perfil de transporte de sustancias endógenas y exógenas (Deeley et al. 2006). En tal sentido, diversos estudios han señalado a MRP4 como la principal proteína transportadora de AMPc.

En base a estos antecedentes, enfocamos nuestros estudios sobre la actividad de MRP4 en las líneas PANC-1, BxPC-3 y HPAF-II. De esta forma, se detectó la expresión de este transportador tanto a nivel de proteína como de ARNm en todas las líneas evaluadas. Más aún, observamos que las células PANC-1 expresaron mayores niveles de MRP4 que las BxPC-3, y estas más que las HPAF-II. Estos resultados se corresponden con la capacidad de exclusión de AMPc observada para cada línea, lo cual indica una correlación entre los niveles de MRP4 y el transporte de este segundo mensajero, reforzando la hipótesis sobre la participación de esta proteína en este proceso. Asimismo, estos resultados sugieren que, a menor grado de diferenciación (y por ende mayor malignidad), mayor sería la expresión de MRP4 en las células de PDAC. Esta tendencia concuerda con los resultados obtenidos por Oevermann y colaboradores, que demostraron, utilizando líneas celulares leucémicas y progenitores

CD34+, que la expresión de MRP4 disminuye durante el proceso de diferenciación hacia monocitos (Oevermann et al. 2009). Este fenómeno podría ser uno de los motivos por el cual las células menos diferenciadas serían más resistentes a los agentes citotóxicos transportados por MRP4.

Los antecedentes mencionados, sumados a la presencia de MRP4 en las líneas de PDAC en estudio, y a la observación de que el proceso de exclusión de AMPc era un proceso saturable en las mismas, nos dieron indicios suficientes para pensar que los MRPs, y en particular MRP4, podían estar involucrados en dicho mecanismo.

Para corroborar esta hipótesis, se realizó un abordaje farmacológico, utilizando los inhibidores de MRPs probenecid y MK571, y un abordaje molecular, silenciando la expresión de MRP4 mediante ARNi dirigido específicamente contra esta proteína.

De esta forma, en cinéticas de producción-exclusión de AMPc ambas estrategias condujeron a una disminución de los niveles de AMPc excluidos luego del tratamiento con forskolina. Más aún, la inhibición de la exclusión fue más marcada en los clones que expresaban menores niveles de MRP4. Por otra parte, los niveles de MRP5 y MRP8, los otros miembros de la familia de MRPs capaces de transportar AMPc, no fueron alterados en ninguno de los clones ensayados, indicando la ausencia de mecanismos compensatorios, asociados a ellos, como producto del silenciamiento de MRP4. Por lo tanto, en su conjunto, estos resultados confirman que el proceso de exclusión de AMPc se encuentra mediado principalmente por MRP4 en las células de PDAC.

Al evaluar la exclusión de AMPc en ausencia de estímulos, fue posible detectar niveles de AMPc en el compartimiento extracelular de las células PANC-1 y sus clones, indicando que el proceso de exclusión de este nucleótido cíclico ocurre, en las células estudiadas, incluso en condiciones basales. Este dato, indica que este proceso no es únicamente relevante para las células luego de aumentos significativos del AMPc en el compartimiento intracelular, sino que cumple un rol en el mantenimiento de la homeostasia celular.

Más aún, al inhibir farmacológicamente la actividad de los MRPs, o de MRP4 mediante su silenciamiento, los niveles de AMPc acumulados en el compartimiento extracelular disminuyeron significativamente. Este resultado indica que este proceso, aún en condiciones basales, es susceptible de ser modulado, lo cual refuerza el carácter de MRP4 como posible blanco terapéutico.

Es interesante remarcar que, la disminución de la exclusión de AMPc al espacio extracelular, producto tanto de la inhibición farmacológica como del silenciamiento de MRP4, no condujo a un cambio en los niveles globales de AMPc intracelular, al evaluarse tanto en condiciones basales como luego del tratamiento con forskolina. Esta observación contrasta con lo observado en otros sistemas (Sassi et al. 2008, Copsel et al. 2011), lo cual indicaría que los niveles de AMPc-i habrían sido compensados por otros mecanismos regulatorios tendientes a mantener los niveles intracelulares sin variaciones significativas. En referencia a esto, en los últimos años diversos grupos de investigación han centrado sus estudios en la participación del MRP4 en la vía de señalización del AMPc. Ha sido reportado que, junto con las PDEs, esta proteína representa un nuevo actor en la compartimentalización de la señalización mediada por nucleótidos cíclicos. Las PDEs al hidrolizar reservas subcelulares de AMPc controlan eventos tardíos de la señalización mediada por AMPc. En contraposición, ha sido propuesto que el MRP4, al encontrarse en la fracción de membrana enriquecida en caveolina, donde se encuentran compartimentalizados complejos multimoleculares de señalización, controla los eventos tempranos en la señalización, actuando sobre el AMPc recientemente sintetizado. De esta manera, debido a su específica localización, el MRP4 actúa en la proximidad del complejo de señalización (Sassi et al. 2009). Más aún, ha sido demostrado que, en la porción C-terminal, este transportador presenta un motivo PDZ, que media la interacción proteína-proteína. Así, se ha establecido que el MRP4 interacciona en la membrana plasmática a través de la proteína de andamiaje PDZK1 con diversas proteínas tales como el CFTR, formando microdominios en la membrana (Li et al. 2007). Por lo tanto, dado que la señalización del AMPc se encuentra altamente compartimentalizada, existe la posibilidad de que, a pesar de no afectar la concentración global de este segundo mensajero, la inhibición de los MRPs, y en particular MRP4, pueda modular los niveles de AMPc-i en microdominios submembrana como ha sido descrito en otros sistemas (Russel et al. 2008, Xie et al. 2011). La verificación de esta hipótesis aportaría aún mayor complejidad al estudio del MRP4 y su participación en la regulación y compartimentalización del AMPc.

La inhibición de MRP4 lleva a un bloqueo de la proliferación de células de PDAC *in vitro* e *in vivo*

Como se mencionó en la sección *Introducción*, la señalización mediada por el AMPc controla, tanto en células normales como tumorales, una amplia variedad de eventos celulares tales como proliferación, diferenciación y muerte celular (Karin 1994).

Distintos grupos de investigación han descrito que aumentos en los niveles de este segundo mensajero conducen a una disminución de la proliferación, dificultan la migración y disminuyen el grado de malignidad de líneas celulares de PDAC (Sack et al. 1988, Umezawa et al. 1995, Zimmerman et al. 2015).

Por lo tanto, teniendo en cuenta la relevancia de este segundo mensajero en la proliferación de células de PDAC y, habiendo demostrado que los niveles de AMPc son regulados por MRPs, y particularmente MRP4, se evaluó la implicancia de dichos transportadores en este proceso celular.

De esta manera, los resultados experimentales obtenidos demostraron que tanto la inhibición farmacológica de MRPs con probenecid o MK571, como el silenciamiento específico de MRP4 en las células PANC-1, condujeron a una disminución de la proliferación celular. Asimismo, el tratamiento con estos inhibidores, indujo una inhibición significativa del crecimiento de células BxPC-3 y HPAF-II. En consecuencia, estos resultados permiten concluir que los MRPs, y en particular MRP4, están implicados en el proceso de proliferación de células de PDAC humanas. Es importante tener en cuenta que la disminución en la capacidad proliferativa observada podría haber sido asociada a un efecto citotóxico de los agentes utilizados. Este hecho fue descartado para las concentraciones ensayadas anteriormente mediante ensayos de exclusión del colorante vital azul tripán en células PANC-1. Por lo tanto, este resultado podría indicar que la inhibición en el crecimiento observada podría ser consecuencia de un arresto en el ciclo celular. El curso de las células a través del ciclo celular está gobernado por un conjunto de complejos de proteínas quinasas con subunidades reguladoras llamadas ciclinas y subunidades catalíticas denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que se encargan de dirigir el progreso de la célula a través de las distintas fases del ciclo celular. Los puntos de control o *checkpoints* evitan la división de células con lesiones en el ADN. En particular, el punto de control G1/S arresta la progresión del ciclo por activación de inhibidores de CDKs llevando a la prolongación de la fase G1.

En esta etapa la célula toma la decisión de diferenciarse, entrar en apoptosis o en un estado de quiescencia (Olsson et al. 1996). En relación a esto, nuestros datos mostraron que tanto la inhibición farmacológica de los MRPs como el silenciamiento específico de MRP4, conducen al arresto del ciclo celular. En particular, se observó una acumulación de las células en la fase G_0/G_1 , previniendo así la entrada en la fase S. Este fenómeno es particularmente interesante en la validación de MRP4 como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer. En contraste con las células sanas, las células tumorales son incapaces de detenerse en los puntos de control predeterminados en el ciclo celular, debido a la pérdida de la integridad de las proteínas involucradas en estos puntos de control. De esta forma, en los últimos años han surgido numerosos compuestos en ensayos clínicos que actúan inhibiendo el ciclo celular en sus distintas fases, conduciendo a la inhibición del crecimiento indiscriminado de las células tumorales. Más aún, esta estrategia no sólo disminuye el crecimiento del tumor, sino que aumenta la eficacia de los tratamientos citotóxicos, al aumentar la susceptibilidad de las células a apoptosis (Waldman et al. 1997, Schwartz and Shah 2005). En relación a esto, previamente ha sido descrito, en células de PDAC, que los aumentos intracelulares de AMPc pueden conducir a un arresto en el ciclo celular en la fase G1, el cual es acompañado de la inhibición de la activación de ERK, la hiperfosforilación de Rb, la activación de Cdk2 y la disminución de la expresión de p27(kip1), inducidas por suero (Boucher et al. 2001). Serían necesarios estudios más profundos sobre los posibles efectos de la inhibición de MRP4 sobre las distintas ciclinas y CDKs, a fin de poder determinar el mecanismo involucrado en el arresto del ciclo celular inducido.

Por otra parte, los resultados presentados demostraron que la inhibición tanto farmacológica de MRPs como mediante el silenciamiento de MRP4, disminuye la capacidad migratoria de las células PANC-1. Dado que, las metástasis dependen, entre otros factores, de la motilidad de las células tumorales, estos resultados sugieren que el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 podría estar implicado en la diseminación de los tumores y los procesos de metástasis en PDAC. La caracterización reciente del interactoma de MRP4, publicada por Sinha y colaboradores, indica que este transportador es capaz de interactuar directamente con actina (proteína crítica en los procesos de migración), restringiéndolo a microdominios específicos en la membrana plasmática de fibroblastos. Demostraron que la inhibición de la actividad de este transportador facilita la polimerización de actina de forma PKA-dependiente,

acelerando el proceso de migración celular (Sinha et al. 2015). Sin embargo, previamente habían descrito que la regulación de la capacidad migratoria de estas células dependía de forma dicotómica de los niveles de AMPc-i, siendo mayor con incrementos moderados y menor en aumentos mayores de este segundo mensajero (Sinha et al. 2013). Por lo tanto, los cambios en el balance AMPc-i/-e inducidos por la inhibición de MRP4, la localización de este transportador y la estequiometría de los distintos efectores, entre otras causas, podrían justificar la diferencia existente entre estas observaciones y las obtenidas en el presente trabajo.

Una vez caracterizados los efectos sobre la proliferación celular de la inhibición de MRP4 en las células *in vitro*, se continuó el proceso de validación de esta proteína como blanco terapéutico para el cáncer de páncreas, mediante la utilización de xenotransplantes en dos modelos animales distintos, ratones *nude* y *SCID*. En estos ensayos, se observó que el silenciamiento de MRP4 induce citostasis y apoptosis en las células PANC-1, lo cual se ve reflejado como una menor tasa de crecimiento de los tumores y una menor incidencia de los mismos. Estos resultados proveen evidencia directa indicando que MRP4 se encontraría involucrado en la regulación de la proliferación de estas células. Dicha observación contribuye a la validación de esta proteína como un nuevo blanco para el tratamiento de PDAC.

Estos hallazgos, sin embargo, hacen surgir el interrogante sobre el por qué si MRP4 y el proceso de exclusión de AMPc son esenciales para el crecimiento de estas células, y su inhibición conlleva al arresto y posible muerte celular *in vivo*, existen tipos celulares que no expresan esta proteína o la expresan pobremente. Una posible explicación para la misma, podría ser que, a diferencia de las células tumorales, las células normales no son adictas al proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4. Por lo tanto, esta suposición implicaría que, ya sea como un medio de regulación de los niveles intracelulares del mismo o por un rol mitogénico del AMPc en el espacio extracelular, la exclusión de este segundo mensajero mediada por MRP4 sería una vía de señalización diferencialmente alterada, crítica en la fisiopatología y/o mantenimiento del cáncer de páncreas.

El proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 provee una señal mitogénica al espacio extracelular

Como se mencionó en la sección *Introducción*, el AMPc posee tres blancos intracelulares: la proteína quinasa A (PKA), la proteína intercambiadora activada por AMPc (Epac) y los canales iónicos dependientes de AMPc. Trabajos previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el bloqueo de MRP4 conduce a la inhibición de la proliferación de células de leucemia mieloide aguda, como consecuencia de un incremento en los niveles de AMPc-i (Copsel et al. 2011, Copsel et al. 2014). Asimismo, otros autores observaron que el silenciamiento de este transportador sensibiliza a las células de músculo liso de arteria coronaria humana a los efectos antiproliferativos del AMPc como consecuencia de la activación de la PKA, señalando a esta quinasa como la principal responsable de la disminución del crecimiento celular observado (Sassi et al. 2008). En base a estos antecedentes, en una primera instancia se decidió determinar si los efectos determinados sobre la proliferación de células de PDAC al bloquear la actividad de los MRPs, y en particular MRP4, eran consecuencia de cambios en los niveles de AMPc en el compartimiento intracelular.

En los ensayos de proliferación realizados en PANC-1, la inhibición farmacológica de PKA mediante el tratamiento con KT5720 no revirtió el efecto antiproliferativo del bloqueo de MRPs con MK571. En coherencia con estos resultados, la inhibición de PKA, tanto con KT5720 como con el péptido inhibidor PKI, tampoco fue capaz de revertir la capacidad proliferativa de las células PANC-MRP4sh1. Por otra parte, en ensayos concentración-respuesta a forskolina en las células PANC-1, el silenciamiento de MRP4 no modificó la sensibilidad de las mismas a los efectos antiproliferativos del aumento del AMPc-i. En consecuencia, los resultados experimentales demostraron que los efectos antiproliferativos del bloqueo de los MRPs, y en particular MRP4, eran independientes de la activación de la cascada de PKA. Más aún, teniendo en cuenta el hecho que no se hayan observado aumentos en los niveles globales de AMPc como producto de esta inhibición, el conjunto de estas observaciones sugiere que, a diferencia de lo observado en otros sistemas, la disminución en la capacidad proliferativa observada en las líneas de PDAC no sería consecuencia de cambios en los niveles de AMPc en el compartimiento intracelular.

En base a lo anterior, cobró fuerza el interrogante sobre que beneficio selectivo les estaría otorgando a las células tumorales el comprometerse al gran gasto energético

involucrado en la exclusión de AMPc al espacio extracelular, aún en condiciones basales. Dado que la regulación de los niveles intracelulares de este segundo mensajero no parecería determinar los efectos observados sobre la proliferación, a continuación se evaluó el papel de los niveles extracelulares del mismo.

En tal sentido, los resultados experimentales expuestos indicaron que el agregado exógeno de AMPc revierte el efecto antiproliferativo tanto de los inhibidores de MRPs como del silenciamiento de MRP4 en células PANC-1. Más aún, esta reversión se vio acompañada de un desarresto del ciclo celular, en dónde la población de células en fase G0/G1 disminuyó hasta los valores del control. Es importante remarcar que este fenómeno no fue exclusivo de las células PANC-1, ya que resultados similares fueron obtenidos en BxPC-3 y HPAF-II, lo cual sugiere que el mismo podría extrapolarse a los PDAC en general. En función de estos resultados y, teniendo en cuenta que el bloqueo de MRP4 disminuye la concentración extracelular de AMPc sin modificar significativamente sus niveles intracelulares, es posible afirmar que el efecto antiproliferativo sobre las células de PDAC ejercido tanto por la inhibición farmacológica como el silenciamiento de MRP4, resulta consecuencia, al menos en parte, de la inhibición del transporte basal de AMPc al compartimiento extracelular.

A pesar de estos resultados, estas observaciones no descartarían la posibilidad de que otro sustrato endógeno de MRP4 esté involucrado en este proceso. Para verificar esta posibilidad, se evaluó el efecto de PGE2, sustrato de este transportador frecuentemente asociado a la respuesta inflamatoria y progresión de distintos tipos de tumores incluidos los de páncreas, pero el tratamiento con esta prostaglandina no fue capaz de revertir los efectos sobre proliferación producto del bloqueo de MRP4.

Como se mencionó previamente, la literatura señala que el AMPc en el medio extracelular podría actuar como un tercer mensajero, proporcionando una señal intercelular directamente o a través de los productos de su metabolismo. Al estimar la estabilidad del AMPc en el compartimiento extracelular, se observó una degradación exponencial del mismo, obteniendo un valor de vida media de alrededor de 90min. A pesar de esta relativamente rápida desaparición, no se hallaron diferencias significativas entre las cinéticas de estabilidad en presencia o ausencia de células. En consecuencia, estas observaciones permitieron concluir que la degradación de este nucleótido cíclico en el espacio extracelular era espontánea y, por lo tanto, no era un evento sujeto a regulación en las condiciones ensayadas.

Sumado a estos resultados, se observó que la reversión mediada por AMPc del efecto antiproliferativo tanto del bloqueo farmacológico como del silenciamiento de MRP4 persistía aún en presencia de inhibidores enzimáticos de la vía extracelular AMPc-adenosina. Más aún, tanto el 5'-AMP como adenosina, ambos metabolitos del AMPc, fueron incapaces de imitar los efectos del agregado de este nucleótido cíclico. En consecuencia, los efectos observados serían mediados por la acción directa del AMPc, y no por alguno de sus metabolitos.

Por lo tanto, estas observaciones indican que el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 no sólo consiste en un mecanismo regulatorio del nivel intracelular de este segundo mensajero, sino que además es parte de un circuito de comunicación intercelular, en dónde el AMPc ejerce efectos mitogénicos de forma autocrina y/o paracrina sobre las células de PDAC.

En función de estas conclusiones, el AMPc debería ejercer sus efectos interactuando con alguna diana biológica en la membrana plasmática. En relación a esto, los ensayos de saturación utilizando [³H]-AMPc realizados en las líneas de PDAC en estudio mostraron que este nucleótido cíclico es capaz de interactuar con sitios de unión específicos y saturables en la membrana. El hecho que la interacción sea saturable indica la existencia de un número limitado de sitios de unión a ligando, pero además es un indicio de que dicha interacción es específica, dado que la unión inespecífica es proporcional a la concentración de radioligando utilizada.

Por otra parte, es interesante remarcar que la reducción de la expresión de MRP4, como producto del silenciamiento específico del mismo en células PANC-1, determinó un incremento significativo del número de sitios de unión para este nucleótido cíclico. Este resultado podría ser explicado como un mecanismo compensatorio a la disminución de AMPc en el compartimiento extracelular, lo cual reafirmaría el papel de la exclusión de AMPc mediado por MRP4, como mecanismo autocrino capaz de proveer una señal mitogénica importante para la biología de las células de PDAC.

Por lo tanto, sobre la base de estas observaciones es posible concluir acerca de la presencia de al menos un blanco molecular específico para el AMPc en la membrana de las células de PDAC analizadas.

A fin de poder considerar a estos sitios de unión como receptores funcionales, la interacción de los mismos con su ligando debería resultar en la transducción de una señal. En base a este supuesto y dados los efectos mitogénicos observados luego del

tratamiento con AMPc en las líneas de PDAC, enfocamos el estudio sobre las vías de señalización vinculadas a proliferación. Como resultado, la activación transiente y específica de las quinasas ERK1/2 por parte del AMPc fue observada en las concentraciones en las que se había obtenido un efecto proliferativo en las células PANC-1. En tal sentido, la literatura científica describe que la intensidad y duración de la activación de la vía de ERK puede ser determinante en el destino celular, así la activación transiente se correlaciona con proliferación, mientras la activación sostenida con diferenciación celular (Marshall 1995).

Asimismo, en forma dependiente de la concentración, el AMPc extracelular inhibió la acumulación intracelular de este segundo mensajero inducida por forskolina en las tres líneas celulares en estudio. Más aún, las concentraciones de AMPc-e que indujeron respuesta se correlacionaron con aquellas que estimularon la proliferación celular y la activación de ERK. Esta observación no sólo reafirma la hipótesis sobre la existencia de un circuito autocrino del AMPc, sino que además permite especular que el AMPc podría interactuar con un receptor acoplado a proteína G inhibitoria (Gi). Si bien serían necesarios más ensayos a fin de poder demostrar dicha hipótesis, estos resultados concuerdan con antecedentes en bibliografía que asocian los efectos extracelulares del AMPc a estas proteínas (Sorbera and Morad 1991). Por otro lado, la existencia de una posible regulación del AMPc extracelular sobre los niveles intracelulares del mismo, amplía el papel del proceso de exclusión en la homeostasis intracelular de este segundo mensajero. En este sentido, el proceso de exclusión de AMPc no sólo regularía los niveles de AMPc-i al exportar al nucleótido cíclico fuera de la célula, sino que también participaría en un mecanismo de retroalimentación negativo, atenuando la señal del AMPc mediante su unión a receptores de membrana.

En su conjunto, estos resultados sugieren la necesidad de repensar al papel del AMPc en el proceso de proliferación en células de cáncer de páncreas, en dónde el balance intra/extracelular de este segundo mensajero sería un determinante más de la progresión maligna de PDAC.

Será necesaria una profundización en el estudio de del circuito mitogénico del AMPc-e y la identificación de sus actores, a fin de poder validar nuevos blancos que permitan nuevos abordajes conceptuales y terapéuticos para esta patología.

El balance intra/extracelular de AMPc modula la expresión de MRP4

La implicancia del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 en la proliferación de células de PDAC abre la posibilidad que la expresión de esta proteína se encuentre relacionada con la fisiopatogenia o el desarrollo del cáncer de páncreas. En este sentido, previamente fue señalada la existencia de una correlación entre los niveles de este transportador y el grado de diferenciación de las células estudiadas, siendo mayor en las menos indiferenciadas y, por ende, con mayor grado de malignidad. Más aún, durante el desarrollo de este trabajo de tesis, Zhang y colaboradores determinaron mayores niveles de proteína de MRP4 en tejidos de cáncer de páncreas con respecto a tejidos pancreáticos normales y establecieron una correlación entre los niveles de expresión de esta proteína y el nivel de diferenciación de las células tumorales (Zhang et al. 2012). En consecuencia, estos antecedentes sugieren que altos niveles de MRP4 podrían contribuir al desarrollo de PDAC de alto riesgo.

Como se mencionó en la sección *Introducción*, ha sido demostrado que numerosos sustratos de este transportador, ya sean xenobióticos (como análogos de nucleósidos) o sustancias endógenas (como prostaglandinas y esteroides), tienen la capacidad de inducir la expresión de MRP4, en una suerte de mecanismo de retroalimentación positivo. Esta regulación es de vital importancia, no sólo para el mantenimiento de la homeostasia celular, sino en la aparición de fenómenos de resistencia a múltiples drogas. En este sentido, dado que MRP4 tiene la capacidad de transportar AMPc, ha sido frecuentemente sugerido que este segundo mensajero podría modular la expresión de su transportador. A pesar de ello, hasta el momento no había sido demostrado que el AMPc regulase los niveles de MRP4, aunque existían evidencias dispersas que apoyaban esta hipótesis (Sassi et al. 2008, Hara et al. 2011).

Los resultados experimentales expuestos en este trabajo demostraron que el tratamiento con IBMX, forskolina y db-AMPc, agentes que aumentan el AMPc, conduce a un incremento en los niveles tanto de proteína como de los transcritos de MRP4 en las células PANC-1. Asimismo, estos estímulos fueron capaces de inducir la actividad transcripcional del promotor humano de MRP4 en células AR42J. En consecuencia, estos resultados indican la existencia de un mecanismo autoregulatorio de retroalimentación positiva, mediante el cual el aumento sostenido de los niveles de AMPc-i produce un incremento en la expresión de MRP4 y el consecuente aumento del eflujo de este nucleótido cíclico.

Es importante recordar que los eventos moleculares involucrados en la iniciación de las lesiones previas y en el desarrollo del cáncer de páncreas incluyen frecuentes alteraciones en la cascada del AMPc, tales como mutaciones activantes en GNAS, gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína Gs, y elevada expresión de la proteína Gas y de sustratos fosforilados de PKA. Por lo tanto, las observaciones experimentales realizadas podrían implicar que en las etapas iniciales del desarrollo de PDAC, la actividad aumentada de la vía del AMPc conduciría a la sobreexpresión descrita por Zhang y colaboradores de MRP4, lo cual aportaría, mediante la exclusión de AMPc, una señal mitogénica que participaría del desarrollo y mantenimiento de la proliferación de las células tumorales.

Con el fin de identificar las redes de señalización involucradas en esta regulación, fue evaluada la participación de los principales efectores de la cascada del AMPc, utilizando para ello una construcción reportera conteniendo un fragmento de 2,5kb del promotor de MRP4 humano fusionado al gen reportero de luciferasa. De esta forma, fue posible determinar que los efectos observados eran independientes de la activación de PKA, dado que ni su inhibición farmacológica con KT5720 ni con el péptido inhibidor PKI fueron capaces de modificar la respuesta sobre el promotor de MRP4 de los agentes que aumentaban el AMPc.

Por el contrario, la activación de Epac mediante su ligando selectivo 8-CPT-2Me-AMPc, imitó los efectos del aumento de AMPc-i de manera concentración-dependiente. En coherencia con este resultado, la inhibición de Epac tanto con su mutante dominante negativa N-Epac como con su inhibidor farmacológico ESI-09 abolió la respuesta del promotor al tratamiento con db-AMPc. Curiosamente, a pesar de que la sobreexpresión de Epac-2 aumentó la respuesta basal del promotor y potenció los efectos del db-AMPc, la sobreexpresión de Epac-1 se comportó como el constructo N-Epac. Esta observación podría explicarse en términos de competencia por el AMPc por parte de Epac-1 y Epac-2, donde sólo Epac-2 sería responsable de la inducción del promotor de MRP4. En referencia a esto, Epac-2 presenta un segundo sitio de unión a AMPc (CBD) de baja afinidad denominado dominio A, del cual aún se desconoce su función (de Rooij et al. 2000). Los resultados obtenidos podrían implicar que este dominio accesorio respondería a altas concentraciones de AMPc (o aumentos localizados) dando una respuesta diferencial con respecto a Epac-1, entre ellas, el aumento de la expresión de MRP4.

Por otra parte, la regulación de MRP4 mediada por AMPc demostró ser dependiente de las GTPasas Rap1a y 1b, efectores río abajo de Epac. En este sentido, ha sido demostrado que Epac-2, pero no Epac-1, posee un dominio RA (del inglés *Ras association*), el cual une específicamente Ras-GTP. De esta forma, este dominio permite que el oncogén Ras transloque a Epac-2 (pero no a Epac-1) desde el citosol a la membrana plasmática, en donde es capaz de activar un reservorio específico de Rap1 (Li et al. 2006).

Es interesante remarcar las implicancias que tendría, desde un punto de vista adaptativo, este mecanismo. Ante un aumento sostenido de AMPc, los mecanismos de regulación de este segundo mensajero descritos, tales como su degradación mediada por PDE, la desensibilización de receptores y su exclusión mediada por MRP4, actuarían de forma rápida, con el fin de limitar la respuesta de este segundo mensajero. Posteriormente, la activación de la cascada AMPc/Epac-2/Rap1, conduciría al aumento de la expresión de MRP4, actuando como un mecanismo adicional y más lento, dado que implica la transcripción de genes, que contribuiría a la restauración del sistema a sus niveles basales de AMPc, mediante el aumento de la exclusión del mismo al compartimiento extracelular (*Figura 50*). Es interesante destacar que, en estudios de genómica de muestras de PDAC humanos, se ha observado una correlación significativa entre la expresión de MRP4 y Epac-2, pero no de Epac-1. Más aún, este análisis determinó que este par de genes se encuentran aumentados o mutados en un 15,1% de las muestras analizadas (datos obtenidos utilizando el sitio cBioPortal) (Cerami et al. 2012). Por lo tanto, estos datos podrían implicar un traslado de nuestras observaciones *in vitro* a muestras de PDAC humanos e, incluso, podrían sugerir que, en algunos casos, el aumento de la expresión de MRP4 observada en PDAC, y vinculada a su malignidad, podría ser consecuencia de una exacerbación en la actividad de la cascada AMPc/Epac-2.

En la literatura científica ha sido descrito que la cascada AMPc/Epac-2/Rap1 posee numerosos efectores, siendo los principales: moléculas asociadas a adhesión y migración celular; y las cascadas de señalización de PI3K-Akt y MAPK. Los resultados obtenidos determinaron que la vía PI3K y mTOR, no se encuentra involucrada en la regulación de MRP4 mediada por AMPc. En cambio, la inhibición de la vía de MEK/ERK aumentó significativamente la actividad basal del promotor y potenció los efectos del db-AMPc. En forma similar, el tratamiento con EGF, activador clásico de

esta vía, disminuyó la actividad del promotor de MRP4. Estos resultados demuestran que la vía de MEK/ERK modula de forma negativa la transcripción de MRP4 en este sistema. Más aún, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con AMPc extracelular posee un efecto negativo sobre la actividad transcripcional del promotor de MRP4. Dado que el tratamiento con este nucleótido cíclico, a las mismas concentraciones, fue capaz de inducir, a tiempos cortos, la fosforilación de ERK, estos resultados indicarían que el AMPc-e reduciría la expresión de MRP4 mediante la activación de esta vía.

En cuanto a los mecanismos moleculares que gobiernan el balance entre las vías activadoras e inhibitorias de la transcripción de MRP4, ha sido reportado que Rap1 antagoniza la activación de Ras y, por lo tanto, inhibe la cascada de MEK/ERK. Por lo tanto, nuestros resultados podrían ser explicados en términos de la activación de la cascada AMPc/Epac-2/Rap1 (Stork and Schmitt 2002). En este sentido, de forma casi simultánea a la publicación de estos resultados, Bröderdorf y colaboradores observaron que la cascada AMPc-Epac modula la expresión de MRP4 en células de leucemia mieloide y células de músculo liso vascular (Broderdorf et al. 2014), lo cual apoyaría nuestras suposiciones. Sin embargo, los autores describen que dicha modulación se encuentra mediada por la activación de MEK. Las discrepancias en los efectos de la cascada de MEK/ERK sobre la transcripción de MRP4, probablemente se deban a diferencias en los tipos celulares. De hecho, ha sido descrito que el AMPc tiene la capacidad de regular de forma positiva o negativa la cascada de ERK vía Rap1 de forma dependiente del tipo celular (Stork and Schmitt 2002).

En relación a esto, cuando fueron evaluados los efectos del tratamiento con forskolina, activador de la AC, sobre la actividad del promotor, se obtuvo un comportamiento bifásico, en donde bajas concentraciones aumentaban la actividad de luciferasa mientras que las altas la disminuían. Dichas observaciones fueron explicadas en términos de la relación AMPc-i/AMPc-e, donde la actividad del promotor inducida por los agentes que incrementaban el AMPc se corresponde con el perfil de la relación evocada entre AMPc-i/AMPc-e. Más aún, el bloqueo farmacológico de la exclusión de AMPc mediante el tratamiento con MK571, concomitante a la estimulación con altas concentraciones de forskolina, provocó un aumento significativo de la relación de AMPc-i/-e inducida y revirtió el efecto negativo sobre la actividad de luciferasa. Por lo tanto, estas observaciones ponen de manifiesto la importancia del balance entre el

AMPc intra- y extracelular en la expresión de MRP4, sugiriendo que los agentes que aumentaban el AMPc únicamente inducían la expresión de este transportador si lograban una relación AMPc-i/-e significativamente mayor a la basal. Asimismo, sugerían que el AMPc en el compartimiento extracelular podría modular la expresión de MRP4. Al evaluar esta hipótesis, se observó que el tratamiento con AMPc tenía un efecto negativo sobre la actividad transcripcional del promotor de MRP4, en un proceso que era abolido por la inhibición de MEK/ERK mediante el tratamiento con PD98059. Dado que el tratamiento con este nucleótido cíclico a las mismas concentraciones fue capaz de inducir, a tiempos cortos, la fosforilación de ERK, estos resultados indicarían que el AMPc-e reduciría la expresión de MRP4 mediante la activación de esta vía. Con los resultados expuestos, no es posible afirmar si estos efectos serían mediados por el supuesto receptor a AMPc descrito anteriormente, o por alguno de sus metabolitos extracelulares, por lo cual, serían necesarios más experimentos a fin de resolver este interrogante. A pesar de ello, la fosforilación de ERK observada a tiempos cortos, menores a 5min, apoyaría la hipótesis de un efecto directo de este nucleótido cíclico.

Por lo tanto, estas observaciones implicarían la existencia de un mecanismo adicional de la regulación de este segundo mensajero. De forma paralela a los mecanismos antes descritos, los aumentos sostenidos de AMPc-i, y sus efectos antiproliferativos, serían limitados por los efectos del AMPc-e. De esta forma, el AMPc en el compartimiento extracelular activaría al hipotético receptor de AMPc, disminuyendo los niveles intracelulares del mismo. Por otro lado, al activar la cascada de MEK/ERK, tendría un efecto mitogénico, contrapuesto al del AMPc-i, a la vez que acotaría su respuesta a largo plazo, disminuyendo la expresión de MRP4 y, por lo tanto, su exclusión (*Figura 50*). En resumen, nuestros resultados demostrarían la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa entre los niveles y efectos del AMPc-i y -e, lo cual reflejaría la importancia del balance entre ambos compartimientos de este segundo mensajero en PDAC.

En conclusión, las observaciones experimentales obtenidas indican que MRP4 es regulado a nivel transcripcional por el AMPc a través de un mecanismo dual en las células de cáncer pancreático AR42J, en el cual el balance entre los niveles intra- y extracelulares de este segundo mensajero juega un papel clave en la regulación de la expresión del transportador. Por un lado, el aumento sostenido del AMPc-i aumenta la

actividad del promotor de MRP4 a través de la vía Epac-2/Rap1 mientras que el AMPc-e la inhibe a través de la cascada de MEK/ERK.

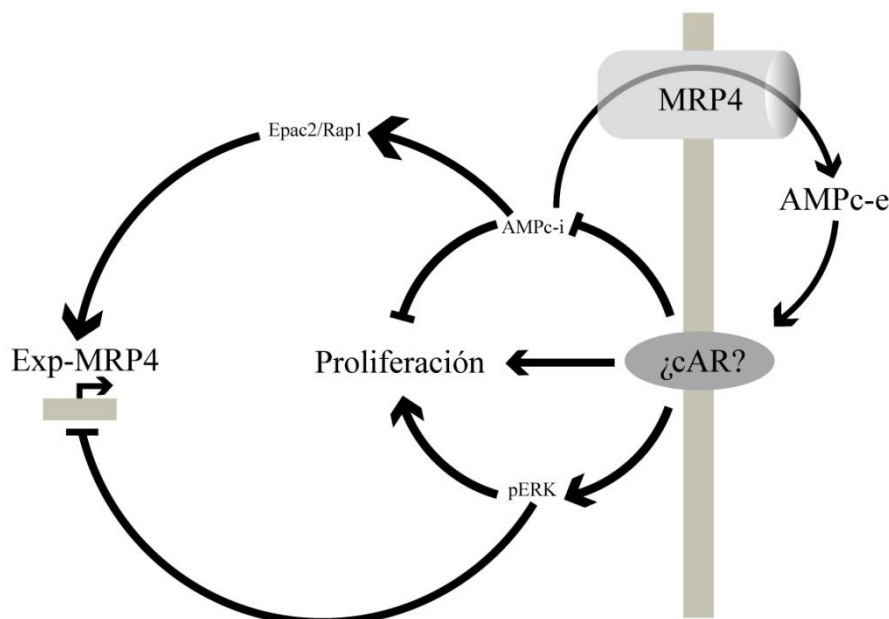


Figura 50. Modelo de los mecanismos de retroalimentación del balance AMPc-i/AMPc-e y su papel en la proliferación celular. Los aumentos sostenidos en los niveles de AMPc-i se encuentran asociados a una disminución de la proliferación de las células de PDAC. A fin de limitar esta señal y volver a los niveles basales de AMPc, los mismos son regulados de forma rápida, entre otros mecanismos, por la exclusión de este segundo mensajero mediada por MRP4; y de forma lenta, por el aumento de la transcripción de este transportador y el consecuente aumento de este proceso. A su vez, como mecanismo adicional, el AMPc excluido al compartimento extracelular actúa sobre un receptor específico aún no descrito (cAR), disminuyendo sus niveles intracelulares y activando la cascada de MEK/ERK. De esta forma, el AMPc-e, desencadena una señal mitogénica, a la vez que disminuye la expresión de MRP4, actuando, por lo tanto, como un mecanismo de retroalimentación negativa de los efectos del AMPc-i.

cAR: *cyclic AMP Receptor*

MRP4 y la exclusión de AMPc: nuevos blancos para el tratamiento del cáncer de páncreas

Como se mencionó en la sección *Introducción*, el paradigma actual de la farmacología sostiene que la clave del éxito en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer sería la terapia dirigida, es decir, fármacos que influyan en la acción o la actividad de una vía de señalización específica o algún constituyente de la misma.

A lo largo de este trabajo de tesis hemos demostrado mediante resultados experimentales y diversos reportes bibliográficos que el proceso de exclusión de AMPc

mediado por MRP4 es un atractivo blanco que debe ser considerado en la terapia de adenocarcinomas ductales pancreáticos, cumpliendo con las directrices principales de las tres estrategias para el proceso de validación de una diana contra el cáncer.

Por un lado, han sido descritos mayores niveles de proteína de MRP4 en tejidos de cáncer de páncreas con respecto a tejidos pancreáticos normales, estableciendo al mismo tiempo una correlación entre los niveles de expresión de esta proteína y el nivel de diferenciación de las células tumorales (Zhang et al. 2012). Esta correlación coincide con nuestros resultados experimentales, en dónde observamos una mayor expresión de MRP4 en las líneas celulares más indiferenciadas y, por ende, de mayor grado de malignidad. Estas observaciones podrían implicar que el aumento diferencial en la expresión de MRP4 conferiría una ventaja selectiva a una subpoblación de células, participando en el desarrollo o mantenimiento del cáncer.

Asimismo, en este trabajo de tesis demostramos que el balance entre los niveles de AMPc intra- y extracelular regula la expresión de MRP4. Por lo tanto, este incremento de los niveles de MRP4 observado en células tumorales de PDAC podría ser consecuencia, al menos en parte, de la exacerbación de la cascada del AMPc descrita en estos tejidos (O'Hayre et al. 2013).

La alta mortalidad de los PDAC es producto de su rápida progresión tumoral, un alto potencial metastático y una fuerte resistencia a quimioterápicos. En este trabajo de tesis, demostramos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 es crítico para la proliferación de las células tumorales y que su inhibición conduce a una marcada disminución de la malignidad y capacidad de invasión de las células de PDAC. Teniendo en cuenta que estas son dos de las razones principales de la dificultad del tratamiento de esta patología, los resultados obtenidos resultan muy promisorios.

En relación a esto, sería interesante evaluar la relación entre la expresión de MRP4 y la resistencia de las células de PDAC a los agentes citotóxicos utilizados de rutina, otra de las causas de la frecuente falla terapéutica de esta patología. A pesar que no todas las drogas utilizadas son sustratos de este transportador, ha sido descrito que la exposición prolongada a las mismas puede provocar un fenotipo quimiorresistente en PDAC, en el cual MRP4 puede encontrarse sobreexpresado (Hagmann et al. 2009). Esto podría implicar que, la aproximación terapéutica con agentes citotóxicos podría enriquecer a los tumores de células con mayores niveles de este transportador,

potenciando los efectos del circuito mitogénico del AMPc-e, y por ende, generando células con mayor grado de malignidad, lo cual explicaría la elevada tasa de relapso asociada a esta neoplasia. Por lo tanto, podría suponerse que un régimen de tratamiento de un agente citotóxico, en conjunto con un inhibidor de MRP4, podrían tener un efecto sinérgico y mejorar la eficacia del tratamiento.

Es interesante remarcar que, en los ensayos realizados en las líneas celulares de PDAC, se observó que los efectos antiproliferativos asociados a la inhibición del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 no se vieron asociados a aumentos globales en los niveles intracelulares de AMPc, sino que fueron consecuencia de la disminución de este segundo mensajero en el compartimiento extracelular. En tal sentido, nuestros resultados demostraron que el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 participa de un circuito mitogénico, en donde este segundo mensajero es capaz de estimular la proliferación celular por acción directa sobre un receptor de membrana aún no identificado. Estos resultados cobran especial relevancia teniendo en cuenta la actividad aumentada de varios componentes de la vía del AMPc en las distintas etapas del desarrollo de PDAC. Por lo tanto, estas observaciones podrían relacionar al transporte de AMPc al espacio extracelular a través MRP4 y el rol de este segundo mensajero como factor autocrino con la fisiopatogenia y/o el desarrollo del cáncer de páncreas, y aportarían evidencia de nuevos posibles blancos para el tratamiento de esta patología.

Teniendo en cuenta que el *knoqueo* de MRP4 en ratones no resulta letal (Russel et al. 2008) y que los mismos no presentan graves alteraciones fisiológicas, la seguridad de una posible terapia dirigida contra MRP4 resulta muy prometedora. Por lo tanto, en base a la evidencia acumulada, resulta fundamental el diseño racional de inhibidores farmacológicos selectivos para MRP4. Dado que aún no se dispone de la estructura cristalográfica de esta proteína, podrían emplearse al menos dos aproximaciones distintas para cumplir con dicho objetivo. Por un lado, dada la gran cantidad de sustratos e inhibidores descritos para este transportador, sería viable la determinación del farmacóforo de los inhibidores de MRP4 (unidad central molecular que transporta los rasgos esenciales responsables para la actividad biológica), mediante una aproximación indirecta, utilizando métodos de QSAR-3D (del inglés *quantitative structure-activity relationship 3D*) y su posterior utilización para el diseño de nuevos compuestos más selectivos. Por otro lado, existe la posibilidad de utilizar una aproximación directa

utilizando modelos moleculares de la estructura tridimensional de MRP4 obtenidos por homología con otros transportadores (Ravna et al. 2009, Wittgen et al. 2012). Por lo tanto, una estrategia alternativa, sería el desarrollo de modelos farmacofóricos a partir de estudios de docking de los sustratos disponibles en el sitio de unión de MRP4.

A su vez, es importante agregar que, a pesar de su falta de selectividad para MRP4, el probenecid es una droga ya aprobada para el uso en la clínica en el tratamiento de la gota y la artritis gotosa (Pea 2005), lo cual haría fácil su implementación en la terapia de PDAC en conjunto con algún agente citotóxico. Más aún, dada la capacidad del mismo de inhibir de forma general a los MRPs, el mismo podría tener un efecto sinérgico con varias drogas, como 5-FU y gemcitabina, ya utilizadas en el tratamiento de esta patología, pasando de un paradigma de “una droga, un blanco” al de “una droga, múltiples blancos”, pilar central de la polifarmacología. De hecho, existen reportes que describen que el probenecid también es capaz de inhibir la actividad de la ecto-PKA, la cual es señalada por algunos grupos como el efector del AMPc-e (Kondrashin et al. 1999). De ser así, esta droga estaría inhibiendo, a su vez, al circuito mitogénico del AMPc-e, lo cual implicaría una gran ventaja terapéutica.

Por otro lado, como alternativa al uso de inhibidores farmacológicos de MRPs, han sido desarrolladas nuevas estrategias basadas en la tecnología del ARNi. Además de ser una herramienta muy útil en el laboratorio, la misma ofrece la posibilidad de ser utilizada en el ámbito clínico a fin de silenciar genes involucrados en el desarrollo de ciertas patologías como el cáncer de páncreas (Lemoine 2005). Por ende, y debido a que aún no existe un inhibidor farmacológico específico de MRP4 validado adecuadamente, no se descartaría el potencial uso del ARNi para MRP4 utilizado en el presente trabajo de tesis para el tratamiento del cáncer de páncreas, u otros tipos de neoplasias en dónde MRP4 se encuentre involucrado. Sin embargo, aún son necesarios significativos progresos en la tecnología de entrega o *delivery* de los ARNi y una mayor experiencia en su uso antes de que esta estrategia terapéutica pueda beneficiar de manera realista a los pacientes.

Es importante remarcar, que el éxito de una nueva aproximación terapéutica radica, en gran parte, en la correcta validación de su blanco. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral aportamos evidencias significativas que indican que el proceso de exclusión de AMPc y MRP4 son blancos interesantes para el tratamiento del cáncer de páncreas. Para continuar con dicha validación será necesario profundizar el estudio

sobre los actores involucrados y verificar si las observaciones, conjeturas y modelos realizados se extrapolan a muestras de tumores humanos, a fin de completar los ensayos preclínicos.

En conclusión, los resultados de este trabajo de tesis demostraron que **“la exclusión de AMPc mediada por MRP4 cumple un papel crítico en el proceso de proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático, producto de la participación de este nucleótido cíclico en un circuito mitogénico al interactuar con receptores específicos en la membrana plasmática. Asimismo, el AMPc regula la transcripción de MRP4 a través de un mecanismo dual, en el cual, el balance entre los niveles intra- y extracelulares de este segundo mensajero, juega un papel clave en la regulación de la expresión del transportador. En la validación de un blanco molecular, no sólo resulta fundamental relacionar su expresión al proceso patológico, sino que es crítica la comprensión del mecanismo molecular de acción y los mecanismos que regulan dicha alteración en la expresión. En tal sentido los resultados experimentales descritos en este trabajo de tesis, junto a los reportes bibliográficos analizados, permiten fuertemente postular a MRP4 como un blanco validado para futuras intervenciones terapéuticas en PDAC.**

Yin y Yang

Cuando conocemos que lo bello es bello, también conocemos la fealdad que existe en el mundo.

Cuando conocemos que el bien es el bien, entonces conocemos el mal que existe en el mundo.

De este modo, la existencia sugiere la no existencia.

Lo fácil promueve lo difícil.

Lo más corto surge de lo largo por simple comparación.

Lo alto y lo bajo se diferencian por el lugar que ocupan.

La voz y el tono se armonizan uno a otro.

"Después" sigue el recorrido de "antes".

Por esto el hombre sabio actúa sin acción y enseña callando.

No se queda en la obra cumplida.

Lao Tsé – Tao Te Ching

A través de la contemplación activa de la naturaleza, los primeros pensadores chinos comenzaron a cuestionarse el origen de todas las cosas, representando a la totalidad como un círculo. Consideraron que de cada rasgo, objeto o pensamiento surge una oposición, cada aspecto posee una contracara. Comprendieron que las dualidades no son estáticas ni independientes, las fuerzas opuestas que las rigen interactúan y se vuelven complementarias. Por lo tanto, este paradigma, representado por el famoso dibujo *taijitu* (*Figura de tapa*) muestra que los opuestos complementarios, las fuerzas fundamentales denominadas *ying* y *yang*, se encuentran en equilibrio dinámico: donde crece uno disminuye el otro, donde uno es mayor el otro es menor, y en el centro de ambos segmentos, existe una semilla del opuesto, el origen de uno dentro del extremo del otro. De esta forma, se alcanza una circularidad infinita.

Sugiriendo un paralelismo, la regulación de los niveles de AMPc y de la expresión de MRP4 observada en las células de cáncer de páncreas cumplen un ciclo que podría considerarse similar. El incremento de este segundo mensajero en el compartimiento intracelular conlleva no sólo a la exclusión del mismo al espacio extracelular por medio de MRP4 sino también al aumento de la expresión de este transportador a fin de mantener la homeostasis celular. Una vez fuera de la célula, el AMPc actuaría sobre receptores específicos participando de dos mecanismos de retroalimentación negativa, cerrando de esta forma el círculo; por un lado atenuando sus niveles intracelulares por

medio de la posible activación de proteína G inhibitorias; y, por el otro, mitigando su exclusión al espacio extracelular por medio de la disminución de la expresión de MRP4.

A su vez, obedecen al mismo esquema la exclusión de AMPc mediada por MRP4 y sus implicancias fisiológicas y fisiopatológicas. Este proceso es un actor importante en distintos eventos fisiológicos como la homeostasis de células inmaduras y la excreción urinaria. A pesar de ello, su desregulación puede dar origen o participar del desarrollo y mantenimiento del cáncer de páncreas al aportar una señal mitogénica al nicho tumoral. Como contrapartida, esta ganancia de aptitud que le confiere a las células tumorales una ventaja de supervivencia y crecimiento, también estaría planteando inadvertidamente la semilla de su tratamiento, al hacerlas adictas a esta cascada y, en consecuencia, sensibilizándolas a su inhibición.

En conclusión, las observaciones experimentales obtenidas en este trabajo de tesis reflejan el carácter dinámico e interactuante de la naturaleza. A su vez, el hecho de que muchas de las hipótesis y mecanismos demostrados en esta tesis ya habían sido postuladas hace décadas y más tarde olvidados, pone en evidencia que la generación del conocimiento, a veces considerada como un evento lineal, resulta, en muchas ocasiones, circular.

5. Perspectivas futuras

Sobre la base de los reportes bibliográficos y los resultados experimentales presentados, quedan pendientes varias tareas e interrogantes. En tal sentido, resultará fundamental la **definición del blanco de acción del AMPc extracelular** y la descripción de los mecanismo moleculares asociados. Por otra parte, será importante continuar la **validación del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 y el circuito mitogénico como blanco terapéutico** por sus implicancias clínicas futuras.

Con el fin de validar el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 y el circuito mitogénico como blanco terapéutico, nos proponemos a futuro:

- **Completar el estudio de los cortes obtenidos de los ensayos *in vivo*.** Al presente nos encontramos evaluando, en colaboración con la Dra. María May, los cortes histológicos obtenidos de los ensayos en los ratones *nude* y *SCID*. En ellos se evaluará, mediante inmunohistoquímica, la expresión de MRP4, a fin de determinar que el silenciamiento del mismo fue efectivo *in vivo*. A su vez, se determinará la capacidad proliferativa y el porcentaje de células en mitosis por incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) y p21. Por último, se evaluará la distribución de las poblaciones en las distintas fases del ciclo celular mediante inmunohistoquímica con anticuerpos para ciclina A, B1 y D1, junto con el índice apoptótico, mediante la técnica de TUNEL.

- **Realizar estudios sobre muestras de pacientes con PDAC.** Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos han alentado a continuar el trabajo en un proyecto de Investigación Clínica. A fin de completar la validación del proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 como posible blanco para el tratamiento del cáncer de páncreas, actualmente nos encontramos elaborando un proyecto para su aprobación por los Comités de Ética correspondientes, en colaboración con el Instituto “Alexander Fleming”. El mismo pretende realizar un estudio retrospectivo, descriptivo y observacional sobre muestras parafinadas y sus historias clínicas, en pacientes con cáncer de páncreas. Incluiremos pacientes en cualquier estadio clínico de la enfermedad que hayan recibido o no tratamiento. Buscaremos una posible correlación entre el nivel de expresión y la localización subcelular de nuestro blanco de interés MRP4, con

parámetros clínicos vinculados a progresión. A su vez, intentaremos validar a los niveles de AMPc, en plasma u orina, como posible biomarcador del grado o progresión de la enfermedad.

- **Evaluar la interacción entre MRP4 y los agentes citotóxicos utilizados de rutina para el tratamiento de PDAC.** Una de las principales causas de la falla terapéutica en el tratamiento del cáncer de páncreas es la rápida aparición de resistencia a las terapias convencionales. Actualmente, nos encontramos evaluando los efectos del silenciamiento de MRP4 sobre la sensibilidad de las células PANC-1 al tratamiento con 5-FU y gemcitabina, dos de los fármacos de primera línea para el tratamiento de PDAC. Nuestro objetivo es determinar la existencia de un posible efecto sinérgico entre la inhibición de MRP4 y el tratamiento con agentes citotóxicos, que justifique su uso combinado en la clínica, mejorando la eficacia y reduciendo las dosis, y por lo tanto, los efectos adversos de estos últimos. Por otra parte, dado que contamos con el plásmido reportero conteniendo al promotor de MRP4, determinaremos los efectos de estos quimioterápicos sobre la actividad transcripcional de este transportador, con el fin de determinar si los agentes quimioterápicos mencionados regulan la misma. En el caso de confirmar esta hipótesis, el aumento de expresión de MRP4 inducido por la terapia citotóxica podría explicar la aparición de resistencia a la misma, sumado a que el incremento de la funcionalidad de este transportador, podría determinar la selección de células más malignas y adaptadas, lo cual explicaría las fallas actuales en el tratamiento de este tipo de neoplasias.

- **Diseñar inhibidores selectivos del transporte de AMPc mediado por MRP4.**

En base a la evidencia acumulada, resulta fundamental el diseño racional de inhibidores farmacológicos selectivos para MRP4. Dado que aún no se conoce la estructura tridimensional de esta proteína y se dispone mayoritariamente de información acerca de sus sustratos e inhibidores competitivos, abordaremos este objetivo en primera instancia mediante una aproximación indirecta. Para ello, hemos confeccionado una base de datos que contiene la estructura química y valores de actividad biológica de los sustratos e inhibidores de MRP4 descritos en bibliografía. A partir de estos datos, se realizarán estudios de QSAR-3D con el fin de desarrollar modelos farmacofóricos que describan las características fisicoquímicas y espaciales requeridas para la modulación

del transporte de AMPc mediado por MRP4. Utilizando dichos modelos, se realizará un *screening* virtual de quimiotecas, a partir del cual se seleccionarán aquellos compuestos que cumplan con los requisitos definidos previamente. La actividad biológica de estos últimos será evaluada mediante ensayos de transporte utilizando sistemas de sobreexpresión de MRP4 previamente validados, con el fin de identificar compuestos líder que podrán ser luego optimizados respecto de su perfil farmacológico. A su vez, estos resultados permitirán el refinamiento y validación del modelo farmacofórico desarrollado, pudiendo llevar a la obtención de un modelo de mejor capacidad predictiva.

Con el fin de definir el o los blancos, así como los mecanismos moleculares, mediante los cuales el AMPc extracelular ejerce sus efectos, nos proponemos a futuro:

- **Clonar y caracterizar los receptores de AMPc.** Nuestros resultados preliminares, sumados a aquellos obtenidos por el Dr. Diez durante el transcurso de su tesis doctoral, indican que el blanco sobre el que actúa el AMPc en la membrana plasmática, se trataría de un GPCR acoplado a proteína G α i. Actualmente, nos encontramos aislando, mediante el empleo de columnas de afinidad de AMPc y su posterior corrida electroforética, las distintas proteínas de interacción específica, provenientes de extractos de membrana de células HEK-293. Las bandas obtenidas serán caracterizadas mediante la técnica de MALDI-TOF, a fin de identificar las proteínas correspondientes.

- **Evaluar la modulación del transcriptoma de los clones de PANC-1 con MRP4 silenciado.** Finalmente, sobre la base de los estudios mostrados en el presente trabajo de tesis, que indican un papel fundamental de MRP4 en la proliferación y malignidad de las células tumorales, realizaremos estudios donde se evalúe como la modulación de la expresión de este transportador regula diferentes vías relacionadas a supervivencia, mitosis y migración. Para ello, identificaremos y cuantificaremos los transcritos modulados en los clones de células PANC-1 con MRP4 silenciado, obtenidos durante esta tesis, mediante la técnica de *RNA-Seq* (del inglés *RNA sequencing*). De esta forma, el conocimiento del transcriptoma y su regulación por MRP4 nos permitirá profundizar en el conocimiento de los diversos constituyentes

moleculares que integran su cascada y que se modulan como consecuencia de su inhibición. A su vez, este estudio abre la posibilidad de identificar posibles nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de páncreas, así como aportarnos un posible abordaje adicional para la búsqueda del receptor de este nucleótido cíclico y los agentes involucrados en su circuito mitogénico en el compartimiento extracelular.

Al presente no existen ni biomarcadores ni blancos moleculares claros para el tratamiento del cáncer de páncreas. Como se mencionó en el marco teórico al inicio de este trabajo de tesis, a pesar de ser un tumor relativamente raro (2% de todos los casos de cáncer), los PDAC son la cuarta causa de muerte por cáncer en países desarrollados; con una tasa de supervivencia media luego de su diagnóstico menor a 6 meses y una tasa de supervivencia a 5 años menor al 4%. La mala prognosis de los PDAC es el resultado de su diagnóstico tardío, su alto potencial metastásico y su elevada resistencia a terapias convencionales. Aunque en la última década se han logrado avances significativos en la comprensión de la biología y fisiopatogenia de los PDAC, estos no han sido acompañados de mayores avances en el tratamiento clínico de esta patología, siendo uno de los pocos cánceres sin una mejora substancial en la sobrevida de los pacientes en los últimos 40 años. Es así que, en el 2013, los PDAC fueron catalogados como cánceres recalcitrantes por el gobierno de los Estados Unidos, estableciendo, en consecuencia, un marco de trabajo para los siguientes años cuyos ejes son la detección de biomarcadores de detección temprana y la validación de nuevos blancos farmacológicos, entre otros. Los resultados presentados y sus perspectivas futuras nos permiten indicar que hemos iniciado un camino promisorio en dicho desafío.

6. Metodología

6.1. Mantenimiento de líneas celulares

Células PANC-1

La línea celular humana de carcinoma ductal pancreático PANC-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) fue cultivada en adhesión a 37°C en estufa con atmósfera humidificada con 5% CO₂, en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50µg/ml de gentamicina.

Células BxPC-3

La línea celular humana de carcinoma ductal pancreático BxPC-3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) fue cultivada en adhesión a 37°C en estufa con atmósfera humidificada con 5% CO₂, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y 50µg/ml de gentamicina.

Células HPAF-II

La línea celular humana de carcinoma ductal pancreático HPAF-II (American Type Culture Collection, Rockville, MD) fue cultivada en adhesión a 37°C en estufa con atmósfera humidificada con 5% CO₂, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y 50µg/ml de gentamicina.

Células AR42J

La línea AR42J proveniente de un tumor de páncreas exocrino de rata (American Type Culture Collection, Rockville, MD) fue cultivada en adhesión a 37°C en estufa con atmósfera humidificada con 5% CO₂, en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 50µg/ml de gentamicina.

6.2. Caracterización del proceso de exclusión de AMPc

Cinéticas de respuesta

Células PANC-1 (o clones derivados), BxPC-3 o HPAF-II: fueron sembradas en placas de 24 pocillos en su medio correspondiente a una densidad de 1.10^5 células/pocillo.

Células AR42J: fueron sembradas en placas de 24 pocillos en su medio correspondiente a una densidad de 2.10^5 células/pocillo.

En ambos casos, el medio fue removido a las 24h y las células fueron expuestas durante 3min a medio DMEM sin color con probenecid 500µM, IBMX 1mM, MK571

50 μ M o sus combinaciones, según se indica en las figuras correspondientes. Luego las células fueron estimuladas con forskolina 33 μ M o el agente indicado durante distintos tiempos, comprendidos entre 5 y 60min. Durante este período las células fueron incubadas en baño termostatzado a 37°C en un volumen final de 400 μ L. A los tiempos indicados, los sobrenadantes (conteniendo el AMPc extracelular) fueron separados en tubos eppendorf de las células adheridas (conteniendo el AMPc intracelular). La reacción fue detenida agregando a ambas fracciones 1 ml de etanol 95°. Las fases etanólicas obtenidas fueron luego llevadas a sequedad en baño termostatzado a 100°C y resuspendidas en buffer de ensayo (Tris-HCL 50mM pH 7,4; EDTA 4mM; 0,1% albúmina bovina). El contenido de AMPc fue determinado mediante un ensayo de competición con [³H]AMPc según se describe en esta sección. Los ensayos fueron realizados por duplicado en al menos tres experimentos independientes.

Ensayos concentración-respuesta

Células PANC-1 (o clones derivados), BxPC-3 o HPAF-II: fueron sembradas en placas de 24 pocillos en su medio correspondiente a una densidad de 1.10⁵ células/pocillo.

Células AR42J: fueron sembradas en placas de 24 pocillos en su medio correspondiente a una densidad de 2.10⁵ células/pocillo.

A las 24h, el medio fue removido y las células fueron expuestas durante 3min a medio DMEM sin color con probenecid 500 μ M, IBMX 1mM, MK571 50 μ M o sus combinaciones, según se indica en las figuras correspondientes. Luego las células fueron estimuladas con distintas concentraciones del agente indicado durante 15min. Durante este período las células fueron incubadas en baño termostatzado a 37°C en un volumen final de 400 μ L. Al cumplirse el tiempo, los sobrenadantes (conteniendo el AMPc extracelular) fueron separados en tubos eppendorf de las células adheridas (conteniendo el AMPc intracelular). La reacción fue detenida agregando a ambas fracciones 1 ml de etanol 95°. Las fases etanólicas obtenidas fueron luego llevadas a sequedad en baño termostatzado a 100°C y resuspendidas en buffer de ensayo (Tris-HCL 50mM pH 7,4; EDTA 4mM; 0,1% albúmina bovina). El contenido de AMPc fue determinado por un ensayo de competición con [³H]AMPc según se describe en esta sección. Los ensayos fueron realizados por duplicado en al menos tres experimentos independientes. El modelo ajustado a los datos experimentales corresponde a una curva

concentración-respuesta sigmoidea pudiéndose estimar la concentración efectiva 50 (CE50) empleando el programa Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6.3. Ensayos de unión de PKA para el dosaje de AMPc

Obtención de la proteína ligadora

La cuantificación del AMPc en las muestras se realizó mediante una adaptación de la técnica de unión a proteína ligadora (Gilman 1970) según Davio (Davio et al. 1995).

La proteína quinasa específica de AMPc (PKA) se obtuvo de tejido muscular bovino según la siguiente técnica: se homogenizó el tejido en buffer fosfato 50mM, pH 7,4 y EDTA 5mM, trabajando en frío sobre baño de hielo. Se centrifugó a 27000g durante 20min y el sobrenadante resultante se dejó sedimentar durante un día en heladera. Posteriormente se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una relación de 32,4 g por cada 100 ml de solución y se centrifugó a 16000g por 20min. El precipitado obtenido se resuspendió en 6% del volumen inicial en buffer fosfato 5mM. Posteriormente se dializó durante dos días a 4°C en el mismo buffer, se centrifugó a 27000g por 20min y el sobrenadante así obtenido se utilizó como fuente de proteína ligadora para el ensayo. El rendimiento fue de aproximadamente 60 ml de una solución cuya concentración proteica fue de 30 mg/ml.

Para determinar la concentración óptima de proteína ligadora a utilizar en los ensayos de competición con [^3H]-AMPc por la PKA, se realizaron curvas de B_0 en función de distintas diluciones de proteína, desde 1/10 hasta 1/500 en presencia de 40000 dpm de [^3H]-AMPc 2 nM (aproximadamente Kd). La proteína ligadora así titulada se utilizó en una dilución capaz de unir entre el 35 y 50% del trazador.

Condiciones del ensayo

Como trazador se utilizó [^3H]-AMPc en concentración final de 2 nM en el medio de incubación (0,205ng/tubo), equivalente a 40000dpm/tubo.

El buffer de incubación utilizado fue Tris-HCl 50mM pH 7,4; 0.1% albúmina bovina; EDTA 4mM y 0.1% de azida sódica. El ensayo se realizó incubando 50 μl de [^3H]AMPc, 100 μl de la dilución adecuada de proteína ligadora y 50 μl de los distintos estándares o muestras a analizar en tubos de vidrio por duplicado. Luego de 2h a 4°C se separó el AMPc unido del libre mediante precipitación con carbón-dextrán. Para ello, se agregaron 300 μl de una suspensión de carbón-dextrán, seguido de 15min de incubación

a 4°C y centrifugación a 3000 rpm durante 15min a igual temperatura. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales con solución centelladora. La actividad unida se midió en un equipo de centelleo líquido. Para el cálculo de unión inespecífica se trabajó con una concentración 1mM de AMPc en el medio de incubación.

Elección de los estándares

En los distintos ensayos realizados se utilizó el siguiente protocolo de trabajo:

B₀: para determinar la máxima unión del trazador a la proteína ligadora no se agregó AMPc frío.

I: inespecífico, unión en presencia de una concentración 1mM de AMPc.

Curva Standard: se construyó procesando ocho estándares de AMPc frío en concentraciones entre 0,07 y 95 pmol/tubo.

Las muestras problema, al igual que el resto de los tubos, se procesaron por duplicado.

El rango de estándares a emplear en la curva patrón se eligió en base a los coeficientes de variación para las distintas dosis.

Realizando el correspondiente perfil de imprecisión para las distintas curvas estándar se seleccionó el rango de dosis que presentara un coeficiente de variación por debajo del 10%. Las muestras a procesar se diluyeron en un volumen tal que se ajustaran al rango óptimo de trabajo previamente establecido en la selección de los estándares.

6.4. Detección de proteínas por Western Blot

Preparación de las muestras

Células PANC-1 (o clones derivados), BxPC-3 o HPAF-II: fueron sembradas en placas de 12 pocillos en su medio correspondiente suplementado con 10% de BSA a una densidad de $5 \cdot 10^5$ células/pocillo.

Células AR42J: fueron sembradas en placas de 12 pocillos en su medio correspondiente suplementado con 10% de BSA a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/pocillo.

A las 24h las células fueron tratadas con los agentes indicados en las figuras correspondientes.

En el caso de los experimentos en presencia de inhibidores tales como KT5720, DPSPX y el inhibidor de 5' nucleotidasas, las células fueron preincubadas con los mismos en las concentraciones indicadas durante 30min.

En los experimentos cuyo objetivo era determinar la fracción fosforilada de ERK, las células fueron previamente hambreadas mediante el cultivo de las mismas en ausencia de suero por 48h en PANC-1 y 24h en AR42J.

Finalizados los tratamientos las células fueron lavadas con PBS y lisadas en frío utilizando la solución de lisis (50mM Tris-HCl pH 6,8; 2%SDS; 100mM 2-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,05% azul de bromofenol). Luego fueron sonicadas y hervidas por 5min previo a su siembra.

Electroforesis y transferencia

Los extractos proteicos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 8% para la detección de MRP4 o al 10% para la detección de pERK, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El buffer de electroforesis utilizado consistió en Tris 25mM; glicina 192mM; 0,1% SDS pH 8,3. La electroforesis se desarrolló en minigeles a voltaje constante de 100V en una cuba "Trans-Blot Turbo™ Transfer System (BioRad). Al finalizar el fraccionamiento, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia (Tris-HCl 25mM pH 8,3; glicina 150mM; 20% metanol) durante 15min y transferido a membranas de nitrocelulosa a 25V, durante toda la noche (ON) a 4°C. Las proteínas transferidas a las membranas fueron teñidas en una solución 0,2% rojo Ponceau y 0,5% ácido acético, para visualizar las proteínas totales y constatar la eficacia de la transferencia en todos los carriles. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en PBS hasta la desaparición de la tinción.

Revelado de proteínas específicas

Luego de tratar las membranas con solución de bloqueo (5% leche en PBS-0,05% Tween) durante 1h, las mismas fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo correspondiente: 3µg/ml de anti-MRP4 M4I-10 hecho en rata (Alexis Biochemicals), 1µg/ml anti-p-ERK1/2 hecho en ratón o 1µg/ml anti-GAPDH hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology); preparados en TBS conteniendo 0,05% de Tween-20. La detección se llevó a cabo incubando con 0,2µg/ml de segundo anticuerpo anti-rata, anti-ratón o anti-conejo conjugado a peroxidasa durante 1 h, seguido de una

exposición a una solución sustrato de la peroxidasa y amplificadora de la quimioluminiscencia (Amersham Life Science, Inglaterra). El resultado se visualizó utilizando el equipo ImageQuant 350 (GE Healthcare).

6.5. Cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Lisis celular

En una primera instancia, 5×10^5 células en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Luego de 24h el sobrenadante se aspiró y sobre la monocapa de células se agregó 1 ml del reactivo Quick-Zol (Kalium Technologies) a fin de realizar una lisis celular activa. Los tubos conteniendo el lisado celular fueron inmediatamente llevados a un freezer de -80°C donde se conservaron hasta el momento de la purificación del ARN.

Purificación del ARN

Los tubos conteniendo el lisado celular fueron retirados de los -80°C e incubados a temperatura ambiente por 5min. Luego de dicha incubación se agregaron 200 μl de cloroformo a cada tubo, se los agitó vigorosamente de manera manual por 15 seg y se los incubó a temperatura ambiente por 5min. Inmediatamente después de esta segunda incubación se los centrifugó por 15min a 12000 g en centrífuga refrigerada (4°C). Mediante dicha centrifugación se logra la separación de las fases acuosa y orgánica (superior e inferior, respectivamente). La fase acuosa conteniendo el ARN fue transferida a otro tubo de centrífuga y la fase orgánica descartada. Luego el ARN fue precipitado por agregado de 0,5ml de isopropanol a la fase acuosa, incubación a temperatura ambiente durante 10min e inmediata centrifugación a 12000g por 10min en centrífuga refrigerada. El precipitado fue lavado con 500 μl de etanol 75%, centrifugado a 7000g por 5min en centrífuga refrigerada, secado a temperatura ambiente por 10min y resuspendido en 17 μl de agua libre de nucleasas. El ARN así resuspendido fue incubado durante 7min a 57°C para facilitar su disolución y posteriormente conservado a -80°C hasta el momento de ser utilizado. En todos los pasos de este procedimiento se utilizaron materiales y reactivos libres de nucleasas.

Tratamiento con DNasa

Con el fin de eliminar las posibles contaminaciones con ADN de las muestras a cuantificar por PCR se trataron las mismas con DNasas. Luego de descongelar en hielo

cada muestra de ARN se agregaron 2 μ L de solución BaseLine Zero y 1 μ L de DNasa a cada tubo. Esta mezcla se incubó 20min a 37°C. Luego del agregado de 2 μ L de Stop Solution, las mismas se incubaron nuevamente 10min a 65°C y posteriormente se conservaron a -80°C.

La calidad del RNA obtenido fue analizada por electroforesis en geles de agarosa 2% conteniendo bromuro de etidio (BrEtd), 0,1 mg/ml en buffer TAE 1X (50X: 242 g Tris-Base; 47,1 ml ácido; 100 ml EDTA 0,5mM; agua cantidad suficiente para 1000 ml; ajustar el pH a 8,0 con KOH). Se sembraron 500 ng de muestra, previamente diluida con xilencianol. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 30min en buffer TAE. Una vez finalizada la electroforesis el gel fue visualizado por emisión de la fluorescencia del bromuro de etidio intercalado al absorber luz ultravioleta (300 nm).

Síntesis del ADN copia (ADNc)

Cada muestra de ARN fue descongelada en hielo, su contenido de ARN fue cuantificado por absorbancia a 260nm y la ausencia de contaminación proteica fue verificada por cuantificación de la relación de absorbancias a 260 nm/280nm (relaciones inferiores a 1,7 indican contaminación con proteínas). Para la síntesis de ADNc se partió de 1 μ g de ARN y se le agregó 2 μ l de *primers* hexaméricos al azar (0,5 μ g/ μ l) y cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla se incubó 5min a 65°C e inmediatamente después se colocó la muestra en hielo y se procedió a la síntesis del ADNc por agregado de 2 μ l de buffer RT Buffer (5X - Promega); 1 μ l de transcriptasa reversa M-MLV 200 U/ μ l (Promega); 0,8 μ l de DNTPs 25mM (Invitrogen); 0,5 μ l de inhibidor de RNAsa 25U/ μ l (Invitrogen) y 6,2 μ l de agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción así preparada fue homogeneizada y sometida, en termocicladora, a un ciclo de:

- 1) 10min a 25°C
- 2) 90min a 42°C
- 3) 15min a 70°C
- 4) 4°C ∞

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación relativa del ARNm de MRP4 se utilizaron los siguientes pares de *primers* específicos:

	<i>Primer sentido (5'-3')</i>	<i>Primer antisentido (5'-3')</i>	Longitud amplicón
MRP4	GGACAAAGACAACACTGGTGTGCC	AATGGTTAGCACGGTGCAGTGG	156 pb

A su vez se realizó un control de PCR con los siguientes pares de *primers* dirigidos contra β -actina (β -Act) universalmente utilizado como gen de referencia (*housekeeping genes*).

	<i>Primer sentido (5'-3')</i>	<i>Primer antisentido (5'-3')</i>	Longitud amplicón
β -Act	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	193 pb

Es importante mencionar que tanto los *primers* como la secuencia blanco pueden afectar la eficiencia de la qPCR. Es por ello que los *primers* utilizados fueron elegidos debido a que reúnen las condiciones que se describen el manual de Biorad (*Real-Time PCR Applications Guide*) entre las que se destacan:

- La secuencia blanco debe ser de 75-200 pb
- Los *primers* deben tener un contenido de GC de 50-60%
- La temperatura de meeting (T_m) de los *primers* debe ser de 50-65°C

La cuantificación fue realizada utilizando como sistema de detección Rotor-Gene Q (QIAGEN). Cada muestra de ARN fue cuantificada por triplicado, en una mezcla de reacción preparada de la siguiente forma:

- 0,25 μ l de *primer* sentido 10 μ M
- 0,25 μ l de *primer* antisentido 10 μ M
- 4 μ l de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne)
- 13,5 μ l de agua libre de nucleasas
- 2 μ l de ADNc (previamente diluido 1/10).

Las mezclas de reacción así preparadas fueron procesadas de acuerdo al siguiente protocolo:

- | | | |
|------------------------------|--------------|-------------|
| 1. Desnaturalización inicial | 15min a 95°C | } 40 ciclos |
| 2. Desnaturalización | 15s a 95°C | |
| 3. Hibridización | 20s a 60°C | |
| 4. Elongación | 30s a 72°C | |

La especificidad de cada par de *primers* fue chequeada por el análisis de la curva de disociación realizada mediante una rampa de temperatura de 72 a 95°C aumentando 1°C en cada 5 segundos.

En cada tanda de cuantificación se incluyeron controles de contaminación con ADN genómico (procesando para ello muestras de ARN tratadas como se indica en el punto 6.3 pero reemplazando el volumen de enzima retrotranscriptasa por agua libre de nucleasas) y blancos de reacción (colocando agua libre de nucleasas en lugar del volumen de muestra).

Análisis de los resultados de qPCR

La cantidad relativa del ARNm de MRP4 fue calculada utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen 2001) normalizado por β -Actina (gen de referencia). Para ello, en una primera instancia se realizó una curva de calibración para determinar la eficacia de cada par de *primers*. Se realizaron mezclas en partes iguales de las muestras de ADNc que se deseaba comparar (dilución 1). Luego se realizaron 5 diluciones seriadas al tercio (dilución 2, 3, 4, 5 y 6) y se siguiendo el mismo protocolo que el indicado para las muestras en el punto anterior, se determinó el valor de Ct tanto para el gen de interés (MRP4) como para el gen de referencia (Actina). Estos valores se graficaron en función del logaritmo de cada dilución, obteniéndose una función lineal con su correspondiente ecuación ($y=m.x+b$). De esta forma, se obtuvieron dos gráficos: uno para MRP4 ($y_1=m_1.x+b_1$) y el otro para Actina ($y_2=m_2.x+b_2$). Finalmente, la eficiencia (E) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/m)} \text{ donde } E \text{ debe ser cercana a } 2$$

Una vez conocido el valor de eficiencia para cada *primer*, la cuantificación relativa de una muestra incógnita se calcula con la siguiente ecuación:

$$R_{2/1} = \frac{E_{MRP4}^{\Delta Ct_{MRP4}}}{E_{Actina}^{\Delta Ct_{Actina}}} \quad \text{donde,}$$

$R_{2/1}$ es la expresión de MRP4 normalizada a Actina de la muestra 2 relativa a la muestra 1,

$$\Delta Ct_{MRP4} = Ct(MRP4 \text{ muestra } 2) - Ct(MRP4 \text{ muestra } 1)$$

$$\Delta Ct_{ACTINA} = Ct(Actina \text{ muestra } 2) - Ct(Actina \text{ muestra } 1)$$

(Para una revisión más exhaustiva de este análisis de datos se recomienda la lectura de la guía de aplicaciones de Bio-Rad – “Real-Time PCR Applications Guide”).

6.6. Silenciamiento de MRP4 utilizando ARN de interferencia (ARNi)

Para llevar a cabo la disminución en la expresión del MRP4 se utilizó como estrategia el uso de ARNi. En particular, se seleccionó el sistema pSUPER ARNi (OligoEngine) que utiliza un vector de expresión en mamíferos que dirige la síntesis de transcritos con características de ARNi. El transcrito resultante del vector recombinante se enrolla para formar una horquilla de entre 19-21 pares de bases, conocido como ARN horquilla (shRNA). El vector pSUPER.retro.puro conteniendo la secuencia de shRNA específica fue cotransfectado junto a dos plásmidos, pVSV y pGAG, en células HEK293T empaquetadoras para obtener los retrovirus. Estos fueron infectados en las células PANC-1 y, luego de 3 semanas de selección con puromicina se obtuvieron células PANC-1 que establemente expresaban la secuencia de shRNA de interés.

Diseño de los oligonucleótidos

Los 3 pares de oligonucleótidos para el uso en el sistema de plásmidos de expresión pSUPER fueron diseñados siguiendo las especificaciones del Manual de OligoEngine (*pSUPER.retro.puro Manual, a vector system for expresión of short interfering RNA*) por la Dra. Copsel. Estos oligonucleótidos contienen específicamente dos secuencias distintas de MRP4-shRNA (MRP4-shRNA1 y MRP4-shRNA2) o una secuencia aleatoria (scramble-shRNA) que no interfiere con ningún gen humano, se detallan a continuación:

	<i>Primer sentido (5'-3')</i>	<i>Primer antisentido (5'-3')</i>
MRP4-shRNA1	GATCCCCCAGTGTCTTACA CTTCCTTCAAGAGAAGGAA GTGTAAGAACAACACTGTTTTTA	AGCTTAAAAACAGTGTCTT ACACTTCCTTCTCTTGAAAGG AAGTGTAAGAACAACACTGGGG
MRP4-shRNA2	GATCCCCGATGGTGCATGTG CAGGATTTCAAGAGAATCCTG CACATGCAGCATCTTTTTA	AGCTTAAAAAGATGGTGCAT GTGCAGGATTCTCTTGAAATC CTGCACATGCAGCATCGGG
scramble-shRNA	GATCCCCGAAACTGCTGACC GTAAATTTCAAGAGAATTAAC GGTCAGCAGTTTCTTTTTA	AGCTTAAAAAGAAACTGCTG ACCGTTAATTCTCTTGAAATT AACGGTCAGCAGTTTCGGG

En **negrita**: la región dirigida específicamente contra el ARNm de MRP4

En *itálica*: la región que forma la horquilla

En gris: las secuencias para el subclonado en el plásmido pSUPER utilizando los sitios *BglIII* y *HindIII*

Hibridación de los oligonucleótidos

Se incubaron 1µg del *primer* sentido y 1µg del *primer* antisentido para las distintas secuencias mencionadas en un volumen final de 50µl a 90°C por 4min y a 70°C por 10min. Se dejó enfriar lentamente y se utilizó posteriormente para la ligación con el vector pSUPER.

Linearización del vector pSUPER

Se realizó la digestión de 10µg del vector pSUPER.retro.puro (OligoEngine) incubando primero con la enzima de restricción *HindIII* en el buffer adecuado durante 1h a 37°C. Luego se agregó enzima de restricción *BglIII* y se incubó 2h a 37°C. Se utilizaron 5 unidades de cada enzima por cada µg de ADN. A continuación se procedió a realizar la purificación del vector linearizado enminigeles preparativos de agarosa 1% en TAE 1X con BrEt 1 µg/ml y sometida a 50V. El ADN fue extraído y purificado de la agarosa utilizando el protocolo de “*Ilustra GFX PCR DNA and gel band purification kit*” (GE) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Ligación

La ligación se realizó utilizando 30ng del vector pSUPER linearizado y 0,5µl de los oligonucleótidos hibridados. Se utilizaron 0,2-0,5 unidades Weiss de la enzima T4 ADN ligasa con el buffer correspondiente. La incubación se llevó a cabo durante 1h a 37°C en un volumen final de 10µl.

Transformación

Se incubaron 3µl de la mezcla de ligación con 50µl de suspensión de bacterias competentes *E.coli* DH5α durante 30min a 0°C. Luego las bacterias fueron sometidas a un *shock* térmico durante 90 seg a 42°C y llevadas rápidamente a 0°C durante 2min. Finalmente, se incubaron 1h a 37°C en 300µl de LB y se rastrillaron placas de LB-agar con ampicilina que fueron incubadas ON a 37°C.

Análisis de las colonias

Para la detección de las colonias positivas (aquellas que contienen el plásmido pSUPER ligado) se utilizaron los siguientes pares de *primers* específicos:

Primer 1: 5'-GGAAGCCTTGGCTTTTG-3'

Primer 2: 5'-GATGACGTCAGCGTTCG-3'

Para llevar a cabo la PCR se repicaron colonias al azar de las placas de LB-agar y se preparó la siguiente mezcla de reacción para realizar la PCR:

1 colonia

1µl de *primer* sentido 5µM

1µl de *primer* antisentido 5µM

0,3µl Taq Polimerasa 5U/µl

0,2µl DNTPs 25mM

2,5µl de Buffer 10X

0,5µl de MgCl₂ 50mM

17,5µl de agua libre de nucleasas

Las mezclas de reacción así preparadas para cada colonia se sometieron en termocicladora, al siguiente protocolo:

- 1) 15min a 95°C
 - 2) 30 seg a 95°C
 - 3) 30 seg a 53°C
 - 4) 1min a 72°C
 - 5) 10min a 72°C
 - 6) 4°C Over Night
- } 35 ciclos

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1%.

A continuación se realizó la purificación de los plásmidos utilizando columnas de QIAGEN TIP 100 y siguiendo el protocolo detallado en el manual “*QIAGEN plasmid midi kit*”. A fin de confirmar que estos plásmidos contenían las secuencias de interés se realizó la secuenciación (Macrogen) utilizando los mismos *primers* usados para la PCR.

Producción de retrovirus en HEK293T

Con el fin de producir retrovirus que contengan las secuencias de pSUPER-MRP4-shRNA y pSUPER-scramble-shRNA se requiere de una línea celular “empaquetadora”. Para ello se utilizó la línea celular HEK293T.

Las células fueron crecidas adheridas en estufa con atmósfera humidificada con 5% CO₂, a 37°C, en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 50µg/ml de gentamicina. Las células fueron subcultivadas mediante el agregado de una solución 0,05% de tripsina y 0,3mM de EDTA.

Las células HEK293T fueron plaqueadas a una densidad de 2x10⁵ células/ml en una placa de 100mm (p100) un día antes de realizar la transfección con los pSUPER-MRP4-shRNA o con el pSUPER-scramble-shRNA. Primeramente, se mezclaron 10µg del plásmido de interés con 8µg y 5µg de los plásmidos pGAG y pVSV respectivamente, necesarios para la formación del retrovirus. A esta mezcla se le agregaron 62µl de CaCl₂ 2M y agua hasta un volumen final de 500 µl. A posteriori, se incorporó gota a gota y en agitación constante 500µl de la solución HBS 2X estéril (Hepes 50mM; KCl 10mM; Glucosa 12mM; Na₂HPO₄ 1,5mM; NaCl 280mM; pH=7,05). Finalmente, la cotransfección se realizó agregando la mezcla de reacción a las células HEK293T. Luego de 12h se agregó medio fresco y a las 36h se realizó la recolección del sobrenadante viral. Este fue centrifugado por 10min a 1000 rpm, a fin de eliminar restos de células HEK293T, y fue conservado a -80°C.

Infección de células PANC-1

Células PANC-1 provenientes de cultivos en crecimiento exponencial fueron sembradas en placas de 6 pocillos en DMEM suplementado con 10%SFB a una densidad de 1x10⁶ células/pocillo. A las 24h de la siembra se agregó el sobrenadante viral y polybrene 10µg/ml (Sigma). A las 24h, nuevamente se repitió el procedimiento. Debido a que el plásmido pSUPER contiene el gen de resistencia a puromicina, el agregado de este antibiótico permite obtener células que expresen establemente el plásmido deseado. Por lo tanto luego de 24h de la infección las células PANC-1 fueron cultivadas en medio de cultivo fresco conteniendo 3 µg/ml de puromicina y seleccionadas durante tres semanas. Las células resistentes al agente de selección fueron amplificadas y mantenidas en DMEM con 1 µg/ml de puromicina. Así, se obtuvieron células que establemente expresaron: MRP4-shRNA1, MRP4-shRNA2 y scramble-shRNA. Para simplificar la nomenclatura, dichas células a lo largo de la tesis serán mencionadas como: PANC1-MRP4sh1, PANC1-MRP4sh2 y PANC1-scramble.

A fin de determinar si estas células expresaban menores niveles de MRP4 se realizaron ensayos de qPCR y Western blot, detallados en las secciones anteriores.

6.7. Ensayo de citotoxicidad

Las células PANC-1 en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placa de 12 pocillos a una densidad de 10^4 células/pocillo e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 . Luego, fueron tratadas durante 72 h con distintas concentraciones de los inhibidores de MRPs, MK571 y probenecid, en un rango de concentraciones de 0,1-50 μM y 0,05-1mM respectivamente, que incluía las concentraciones previamente utilizada para los ensayos de dosaje de AMPc. Las células control fueron incubadas con DMSO 0,05% (v/v).

Luego se tomó una alícuota de cada tratamiento y se mezcló con igual volumen de azul tripán 0,4%. La mezcla fue incubada a 37°C durante 5min. El número de células no viables se determinó mediante el conteo en cámara de Neubauer de las células teñidas con el colorante. Los valores de % de células viables fueron calculados en base a las células viables respecto de las células totales y relativizadas al grupo control.

Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

6.8. Ensayos de proliferación celular por conteo celular

Las células PANC-1 (o clones derivados), BxPC-3 o HPAF-II en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placa de 12 pocillos a una densidad de 10^4 células/pocillo e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 . Las células fueron tratadas con las distintas drogas, solas o combinadas, según se indica en las figuras correspondientes o con DMSO 0,05% (v/v) (grupo control de vehículo) por 96h. Luego las células fueron recolectadas y el número total de células fue determinado por el conteo en cámara de Neubauer de las células teñidas con azul tripán como se indicó anteriormente.

Los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes.

6.9. Análisis del ciclo celular

Las células PANC-1 (o clones derivados), BxPC-3 o HPAF-II en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 . A las 24h fueron

hambreadas durante 48h en su medio correspondiente en ausencia de suero. A continuación, las células fueron tratadas con los distintos compuestos que se mencionan en la figura respectiva o con DMSO 0,05% (v/v) (grupo control de vehículo) durante 72 h. Luego se centrifugaron a 1000 rpm por 10min y lavadas dos veces con PBS. Nuevamente fueron centrifugadas y el precipitado celular fue resuspendido con 500µl de etanol 70% (v/v) y fue incubado a -20°C hasta el momento del ensayo (tiempo menor a un mes). A continuación, las células fueron centrifugadas a 1000 rpm por 10min y al precipitado celular se le agregó 500µl de una solución de yoduro de propidio (yoduro de propidio 20µg/ml; RNAsa A 100µg/ml en PBS pH=7,4) e incubó en oscuridad por 30min. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para los distintos tratamientos fue determinado utilizando el citómetro de flujo PAS III (Partec, Görlitz, Alemania). Para cada muestra se adquirieron 15000 eventos y los resultados fueron analizados de al menos tres ensayos independientes utilizando el programa Cylchred 1.0.2 (Cardiff University, UK) (Thati et al. 2007).

6.10. Ensayos de cierre de herida

Las células PANC-1 en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placa de 24 pocillos a una densidad de 10^5 células/pocillo e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. A las 24h, se rasgaron dos líneas perpendiculares en la monocapa de células, utilizando una pipeta de 200µL. Las células fueron lavadas dos veces con PBS, y el medio fue removido y cambiado por DMEM base fresco con su respectivo tratamiento. Luego de 48h, las células fueron lavadas con PBS, y luego fijadas con paraformaldehído (PFA) 3,7%. Las células fijadas fueron teñidas con cristal violeta 1% por 30min y luego se fotografiaron 4 campos por pocillo, utilizando un microscopio de fluorescencia Eclipse E200 (Nikon), a 200x de magnitud. El número de células que migraron fueron evaluadas mediante conteo celular y expresadas respecto al control.

6.11. Ensayos de migración en *transwells*

Las células PANC-1 en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placas de transwell con poros de 8µM (Corning), a una densidad de 10^4 células/pocillo en un volumen final de 200µL de medio base. Como quimioattractante se utilizaron 600µL de medio completo en el compartimiento inferior. A las 48h, las células en la cara inferior del pocillo fueron fijadas con PFA 3,7% y teñidas con cristal violeta 1%

por 30min. El número de células que migraron fueron evaluadas mediante conteo celular y expresadas respecto al control.

6.12. Ensayos de estabilidad del AMPc

Las células PANC-1 fueron sembradas en placa de 48 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en un volumen final de 300 μ L de RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Luego de 24h, las células fueron tratadas con AMPc 10 μ M durante los tiempos indicados en la figura. En paralelo, igual volumen de medio suplementado con suero conteniendo AMPc 10 μ M fue incubado en las mismas condiciones en ausencia de células. Una vez cumplido los tiempos de tratamiento, se transfirió el contenido de cada pocillo de la placa a tubos *ependorf* conteniendo 800 μ L de etanol y se centrifugó a 1000 rpm durante 5min a 4°C. Luego se tomó del sobrenadante una alícuota de 50 μ L para la determinación del contenido de AMPc según se indicó anteriormente. Los resultados se expresaron como el porcentaje respecto al tiempo 0.

Los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes.

6.13. Ensayos de unión a [³H]-AMPc

Las células PANC-1 (o clones derivados), BxPC-3 o HPAF-II en etapa exponencial de crecimiento fueron sembradas en placa de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. A las 24h fueron incubadas en un volumen final de 100 μ L de DMEM base pH 7,4 durante 2h a 4°C con concentraciones crecientes de [³H]-AMPc (0,78-100nM). La unión inespecífica fue estimada para cada concentración según los datos de una regresión lineal, graficando la unión (obtenida de las incubaciones en presencia de AMPc frío 20 μ M). En todos los casos, los experimentos fueron finalizados mediante 3 inmersiones sucesivas con el buffer de reacción frío y posterior agregado de 300 μ L de etanol 95° para extraer el [³H]-AMPc. La radiactividad fue medida mediante un espectrómetro de centelleo líquido Pharmacia Wallac 1410.

El modelo ajustado para la estimación de los parámetros K_d y B_{max} , corresponde a la clásica ecuación general de unión para un sitio de unión atribuida a Irvin Langmuir.

El análisis de los datos fue realizado mediante métodos computarizados de regresión lineal utilizando el programa Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes.

6.14. Plásmidos y transfecciones transientes

Los plásmidos pCMV-Myc-Epac, pCMV-Myc-N-Epac, pMT2-HA-Epac-2, pCGN-HA-Rap1a, pCGN-HA-Rap1b y pMT2--HA-Rap1GAP fueron una cortesía del Dr. Omar Coso (Departamento de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA, Buenos Aires, Argentina). Los plásmidos pGFP-PKI, pGFP-PKI_{mut}, pcDNA3-DN-HRas y pcDNA3-DN-KRas fueron un gentil regalo del Dr. J. Silvio Gutkind (Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institutes of Health, Bethesda, USA). pACL4-AKT1-Δ4-129 (AKT_{myr}) fue un regalo de la Dr. Virginia Novaro (Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina).

En cada caso, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos 24h antes del ensayo a fin de que se encuentren al 80% de confluencia al momento de la transfección. Luego, se agregó 1μg de ADN, compuesto de los plásmidos de interés y/o el vector vacío, a 20μL de medio base. Paralelamente, 2μL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) se incubaron no más de 5min en 20μL de medio base y, posteriormente, se mezclaron e incubaron ambas alícuotas por 20min. Pasado este tiempo, se agregó la mezcla al pocillo correspondiente. A las 24h, las células fueron subcultivadas o tratadas dependiendo el ensayo a realizar. El protocolo de transfección fue optimizado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

6.15. Análisis *in silico* del promotor de MRP4

La secuencia promotora del gen de MRP4 fue obtenida analizando el cromosoma 13 utilizando el Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org). A partir de la misma, se analizó un fragmento de alrededor de 2,5kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS, del inglés *transcriptional start site*) del gen de MRP4 humano mediante el programa MatInspector (Genomatix Suite Software), generando, de esta forma, un mapa con los sitios putativos de unión a factores de transcripción.

6.16. Construcción del vector reportero MRP4-Luc

A fin de evaluar la actividad del promotor de MRP4 mediante ensayos con luciferasa como gen reportero, se clonó un fragmento de 2372pb, conteniendo las posiciones +48 a -2324 con respecto al TSS del gen de MRP4, en el vector reportero pGL3-Basic. Esta construcción fue denominada MRP4-Luc.

Adquisición de la licencia y purificación del clon BAC RP11-789G22

Con el fin de disponer de un templado conteniendo el promotor de MRP4, adquirimos del consorcio BACPAC Resources Online (bacpacorders@chori.org) la licencia del RP11-789G22, un clon BAC (del inglés *bacterial artificial chromosome*) con la fracción del cromosoma 13 humano que contiene la región río arriba del TSS de este gen. Este plásmido se recibió en bacterias E. coli DH10 transformadas en un *stab* de LB Agar conteniendo 12,5 microgramos/mL de cloranfenicol (Cl). Las bacterias fueron estriadas en una placa de LB agar con 12,5 µg/mL de cloranfenicol y se incubaron ON a 37°C en estufa. De esta placa, se picaron y crecieron dos colonias aisladas en 3mL de LB + Cl en shacker a 37°C. Se congelaron a -70°C con 20% de glicerol. A continuación, amplificamos y purificamos el BAC utilizando el protocolo de Lisis Alcalina, agregando un prelavado con STE y resuspendiendo el pellet final en un volumen de 50µL de TE.

Amplificación de la región promotora de MRP4 a partir del BAC purificado mediante PCR preparativa

Utilizando como templado el BAC obtenido, se realizó una PCR preparativa con el fin de amplificar la región promotora de MRP4 utilizando *primers* específicos.

El par de oligonucleótidos fueron diseñados con el programa Oligo7 (MBI).

	<i>Primer sentido (5'-3')</i>	<i>Primer antisentido (5'-3')</i>
Promotor MRP4 (2388pb)	CGC <u>agaTct</u> ACCTCAAGCAGGGATG (Posición +48 respecto TSS)	CT <u>ggtAcc</u> GCTGGGATTATGGGCTTG (Posición -2324 respecto TSS)

En **negrita**: las secuencias para el subclonado en el plásmido pGL3-Basic utilizando los sitios *BglII* y *KpnI* respectivamente.

Para llevar a cabo la PCR utilizamos la enzima AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma), una polimerasa de a

lta fidelidad específica para levantar secuencias de largas. Para realizar la PCR se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 1µL ADN templado (dilución 1/10)
- 4µL de *primer* sentido 10µM
- 4µL de *primer* antisentido 10µM
- 1µL Taq Polimerasa 5U/µl
- 2µL DNTPs 25mM
- 1µL DMSO
- 10µL de AccuTaq LA Buffer 10X
- 74µL Agua libre de nucleasas

Las mezclas de reacción así preparadas para cada colonia se sometieron en termocicladora, al siguiente protocolo:

- 1) 5min a 95°C
 - 2) 1min a 95°C
 - 3) 1min a 50°C
 - 4) 5min a 68°C
 - 5) 10min a 68°C
 - 6) 4°C ∞
- } 35 ciclos

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% y controlados mediante digestión con BglII y KpnI, obteniendo una banda de alrededor 2,4 kb correspondiente al amplicón y una banda en 4,8 kb correspondiente al plásmido digerido.

Corrida preparativa del amplicón y digestión

Preparamos un gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio, lavando bien previamente todo el material con etanol. A la totalidad del producto de PCR (90 µL) le agregamos 18 µL de azul de bromofenol. Corrimos la muestra a 70V hasta caída del frente. Cortamos las bandas con un bisturí bajo luz UV de alta longitud de onda, colocando el taco de agarosa en eppendorf de 1,5 mL previamente pesados. La

purificación del mismo se realizó mediante el *illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Life Science) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, digerimos la totalidad del producto de PCR purificado y 2µg del vector pGL3-Basic (Promega) utilizando la siguiente mezcla de reacción para cada caso:

ADN templado

2,5µL NEBuffer 2

0,2µL KpnI

0,2µL BglII

Agua libre de nucleasas csp 25µL

Incubamos a 37°C en estufa de cultivo durante 1,5h. La purificación del producto la realizamos nuevamente con el *illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit*, siguiendo el protocolo del fabricante.

Ligación

La ligación se realizó utilizando 50ng del vector pGL3-Basic digerido y 125ng del amplicón digerido. Se utilizaron la ligasa del *DNA Ligation Kit <Mighty Mix>* (Takara) en relación 1:1 con respecto al volumen utilizado de ADN, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La incubación se llevó a cabo durante 1h a 16°C.

Transformación

Se incubaron 10µL de la mezcla de ligación con 100µl de suspensión de bacterias competentes *E.coli* DH5α durante 10min a 0°C. Luego las bacterias fueron sometidas a un *shock* térmico durante 90 seg a 42°C y llevadas rápidamente a 0°C durante 2min. Finalmente, se incubaron 1h a 37°C en 900µl de LB y se rastrillaron en placas de LB-agar con ampicilina que fueron incubadas ON a 37°C.

Análisis de las colonias y purificación

Para la detección de las colonias positivas (aquellas que contienen el plásmido pGL3-Basic ligado con el promotor de MRP4 amplificado) purificamos los plásmidos de las colonias transformadas mediante lisis alcalina y evaluamos los mismos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio. Los productos cuyo peso

correspondieron con el esperado (aproximadamente 7,1kb) fueron controlados por digestión con BglII y KpnI como se indicó anteriormente.

A continuación, se realizó la purificación del plásmido de la colonia seleccionada, utilizando las columnas QIAGEN TIP 100 (Qiagen) y siguiendo el protocolo detallado en el manual “*QIAGEN plasmid midi kit*”. A fin de confirmar que este plásmido contenía la secuencia de interés se realizó la secuenciación (Macrogen) utilizando los mismos *primers* usados para la PCR.

6.17. Ensayo de gen reportero de luciferasa

Las células AR42J fueron sembradas en placas de 24 pocillos y se transfectaron utilizando el Lipofectamina 2000 con la construcción reportera MRP4-Luc mediante el protocolo descrito anteriormente. En algunos experimentos, las células fueron también cotransfectadas con alguno de los plásmidos previamente mencionados o con un vector vacío para mantener la cantidad total de ADN igual. Después de 6 h, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y, luego de 24 h, fueron estimuladas los con distintos agentes indicados en cada ensayo. La actividad de luciferasa fue medida 48h más tarde con el kit de luciferasa Steady-Glo (Promega Biosciences Inc, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando el lector de microplacas FlexStation3 (Molecular Devices, LLC). La actividad de luciferasa así obtenida se normalizó mediante el número de células utilizando el kit *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)* (Promega) y los datos se expresaron como un porcentaje de cada condición basal.

6.18. Animales

Fueron utilizados ratones *nude* (nu/nu, Universidad de La Plata) y *SCID* machos de seis semanas de edad. El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron cumpliendo con las recomendaciones de *United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia* (1998, Workman et al. 2010).

6.19. Experimentos *in vivo*

Las células PANC-scramble, PANC-MRPsh1 y PANC-MRP4sh2 fueron levantadas con tripsina-EDTA y resuspendidas en medio DMEM. A continuación 5.10^6

células fueron inyectadas de forma subcutánea en los ratones. Los tumores fueron medidos cada 3 días utilizando un calibre Vernier y su volumen fue calculado considerándolos óvalos, utilizando la fórmula: $V = \frac{4}{3} \times \pi \times (\text{radio menor})^2 \times \text{radio mayor}$

Al final del experimento, los animales fueron sacrificados y los tumores fueron removidos y fijados en formol para los estudios de inmunohistoquímica.

6.20. Estudios morfológicos

Las características morfológicas del parénquima del tumor (tipo celular, grado de diferenciación y patrón de crecimiento) y de su estroma (vasos sanguíneos, fibrosis e infiltrados inflamatorios) fueron evaluados mediante cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H&E).

6.21. Análisis estadístico

Todas las curvas fueron analizadas y sus parámetros ajustados utilizando el programa GraphPad Prism 6.00 para Windows (GraphPad Software, CA). Las diferencias estadísticas fueron determinadas con el test de ANOVA para comparación de multigrupos seguido del test de Bonferroni para comparación de datos no apareados. Un $p < 0,05$ fue adoptado para definir diferencias estadísticas significativas.

6.22. Materiales

RPMI 1640, DMEM, DMEM sin rojo fenol, gentamicina, puromicina, seroalbúmina bovina (BSA), buffer fosfatosalino (PBS), Metil-isobutilxantina (IBMX), AMPc, db-AMPc, forskolina, probenecid, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), adenosina (ADO), 5'AMP, α, β -metilen-adenosina-5'-difosfato (DPCPX) y Tween 20 fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). MK571 fue adquirido de Calbiochem (La Jolla, CA). [^3H]-AMPc fue adquirido de Perkin Elmer Life Science (Boston, MA, Estados Unidos).

El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Natocor (Argentina). Las enzimas de restricción fueron obtenidas de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

7. Abreviaturas

ABCC: Proteínas del tipo ABC subfamilia C
AC: Adenilato ciclasa
Ac: Anticuerpo
ADN: Ácido desoxi-ribonucleico
ADNc: ADN copia
ADO: Adenosina
AKAP: *A-kinase anchoring proteins*
AKT: PKB, del inglés *protein kinase B*
AMPc: Adenosina 3',5'- monofosfato cíclico
AMPc-e: AMPc extracelular
AMPc-i: AMPc intracelular
AMPCP: α,β -metilen-adenosina-5'-difosfato
Amtamina: 2-Amino-5-(2-aminoetil)-metiltiazol
ANOVA: Análisis de la varianza
AP-1: Complejo formado por las proteínas Jun y Fos
ARN: Ácido ribonucleico
ARNi: ARN de interferencia
ARNm: ARN mensajero
ATP: Adenosina trifosfato
ATF1: del inglés *activating transcription factor 1*
B₀: unión máxima del trazador
B_{máx}: unión específica máxima
BrEt: Bromuro de etidio
BSA: seroalbúmina bovina
BSS: Buffer salino para medir calcio
cARs: del inglés *cyclic AMP receptors*
CI₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de la proliferación
CREB: del inglés *cAMP response element binding protein*
CREM: del inglés *cAMP response modulator*
db-AMPc: Dibutiril AMPc
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

dpm: desintegraciones por minuto

DPSPX: 1,3-dipropil-8-p-sulfofenilxantina

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

Epac: del inglés *Exchange proteins directly activated by cAMP*

Esi-09: del inglés *Epac selective inhibitor 09*

ESM: Error estándar de la media

FDA: organismo regulador de drogas y alimentos de los Estados Unidos, del inglés *Food and Drugs Administration*

Fsk: forskolina

GAPDH: del inglés, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

G α : Subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica

GDP: Guanosina di fosfato

G $_i$: Proteína G en la cual el tipo de subunidad alfa es la “i” (inhibidora de la AC)

GMPC: Guanosina monofosfato cíclico

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GRKs: quinasas de GPCR, del inglés *protein-coupled receptor kinase*

Gs: Proteína G en la cual el tipo de subunidad alfa es la “s” (estimuladora de la AC)

GTP: Guanosina tri fosfato

h: Horas

Histamina: 2-[4-imidiazol]-etilamina

I: unión inespecífica

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IL: Interleuquina

IP3: Fosfatidil-Inositol 3 Fosfato

Kd: Constante de disociación

L: Ligando

Log: Logaritmo

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés *mitogen-activated protein kinases*

MK571: ácido 3-({3-(2-[7-cloro-2-quinolinil]vinil)fenil}-{[3-dimetilamino-3-oxopropil]tio}metil]tio)propanoico

Metotrexato: Acido N-[4-[(2,4-Diamino-6-pteridini)metil]metilamino]benzoil]-L-

glutámico

min: minuto

MRPs: Proteínas asociadas a la resistencia a multidroga

mTOR: del inglés *mammalian target of rapamycin*

n: número de experimentos independientes

N-Epac: dominante negativa de Epac

NDB: del inglés *nucleotide binding domain*

OMS: Organización Mundial de la Salud

pAKT: quinasa Akt fosforilada

PBS: Buffer fosfato salino

PDEs: Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

pERK1/2: quinasa ERK1/2 fosforilada

PDAC: del inglés *pancreatic ductal adenocarcnioma*

PGE₂: Prostaglandina E₂

PKA: Proteína kinasa dependiente de AMPc (Proteína kinasa A)

qPCR: PCR en tiempo real

R: Receptor

rH2: Receptor a Histamina H2

RPMI: Roswell Park Memorial Instiute Medium

s: Segundos

SDS: Dodecil sulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

shRNA: ARNi horquilla

Tris: 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

U.V.: Ultravioleta

V: Voltios

5'AMP: adenosina 5'-monofosfato

8. Referencias

(1998). "United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition)." Br J Cancer **77**(1): 1-10.

Adachi, M., G. Reid and J. D. Schuetz (2002). "Therapeutic and biological importance of getting nucleotides out of cells: a case for the ABC transporters, MRP4 and 5." Adv Drug Deliv Rev **54**(10): 1333-1342.

Ahlstrom, M. and C. Lamberg-Allardt (1999). "Regulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) accumulation in UMR-106 osteoblast-like cells: role of cAMP-phosphodiesterase and cAMP efflux." Biochem Pharmacol **58**(8): 1335-1340.

Bagnoli, M., G. L. Beretta, L. Gatti, S. Pilotti, P. Alberti, E. Tarantino, M. Barbareschi, S. Canevari, D. Mezzanzanica and P. Perego (2013). "Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma." Biomed Res Int **2013**: 143202.

Baillie, G. S. (2009). "Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases." FEBS J **276**(7): 1790-1799.

Bankir, L., M. Ahloulay, P. N. Devreotes and C. A. Parent (2002). "Extracellular cAMP inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved?" Am J Physiol Renal Physiol **282**(3): F376-392.

Barber, R. and R. W. Butcher (1981). "The quantitative relationship between intracellular concentration and egress of cyclic AMP from cultured cells." Mol Pharmacol **19**(1): 38-43.

Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). "Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 710-718.

Benson, J. D., Y. N. Chen, S. A. Cornell-Kennon, M. Dorsch, S. Kim, M. Leszczyniecka, W. R. Sellers and C. Lengauer (2006). "Validating cancer drug targets." Nature **441**(7092): 451-456.

Beretta, G. L., V. Benedetti, G. Cossa, Y. G. Assaraf, E. Bram, L. Gatti, E. Corna, N. Carenini, D. Colangelo, S. B. Howell, F. Zunino and P. Perego (2010). "Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin." Biochem Pharmacol **79**(8): 1108-1117.

Billiar, T. R., R. D. Curran, B. G. Harbrecht, J. Stadler, D. L. Williams, J. B. Ochoa, M. Di Silvio, R. L. Simmons and S. A. Murray (1992). "Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes." Am J Physiol **262**(4 Pt 1): C1077-1082.

Borst, P., C. de Wolf and K. van de Wetering (2007). "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5." Pflugers Arch **453**(5): 661-673.

Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." J Natl Cancer Inst **92**(16): 1295-1302.

Boucher, M. J., C. Duchesne, J. Laine, J. Morisset and N. Rivard (2001). "cAMP protection of pancreatic cancer cells against apoptosis induced by ERK inhibition." Biochem Biophys Res Commun **285**(2): 207-216.

Breckler, M., M. Berthouze, A. C. Laurent, B. Crozatier, E. Morel and F. Lezoualc'h (2011). "Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications." Cell Signal **23**(8): 1257-1266.

Broderdorf, S., S. Zang, Y. Schaletzki, M. Grube, H. K. Kroemer and G. Jedlitschky (2014). "cAMP regulates expression of the cyclic nucleotide transporter

MRP4 (ABCC4) through the EPAC pathway." *Pharmacogenet Genomics* **24**(10): 522-526.

Brown, J. E. and J. W. Adamson (1977). "Studies of the influence of cyclic nucleotides on in vitro haemoglobin synthesis." *Br J Haematol* **35**(2): 193-208.

Brunton, L. L. and L. E. Heasley (1988). "cAMP export and its regulation by prostaglandin A1." *Methods Enzymol* **159**: 83-93.

Cerami, E., J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander and N. Schultz (2012). "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data." *Cancer Discov* **2**(5): 401-404.

Copsel, S., A. Bruzzone, M. May, J. Beyrath, V. Wargon, J. Cany, F. G. Russel, C. Shayo and C. Davio (2014). "Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia." *Oncotarget* **5**(19): 9308-9321.

Copsel, S., C. Garcia, F. Diez, M. Vermeulem, A. Baldi, L. G. Bianciotti, F. G. Russel, C. Shayo and C. Davio (2011). "Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation." *J Biol Chem* **286**(9): 6979-6988.

Chan, A., E. P. Diamandis and I. M. Blasutig (2013). "Strategies for discovering novel pancreatic cancer biomarkers." *J Proteomics* **81**: 126-134.

Chen, Z. S., K. Lee and G. D. Kruh (2001). "Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine." *J Biol Chem* **276**(36): 33747-33754.

Cho-Chung, Y. S., T. Clair, G. Tortora and H. Yokozaki (1991). "Role of site-selective cAMP analogs in the control and reversal of malignancy." *Pharmacol Ther* **50**(1): 1-33.

Chong, C. R. and P. A. Janne (2013). "The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer." *Nat Med* **19**(11): 1389-1400.

Davio, C. A., G. P. Cricco, R. M. Bergoc and E. S. Rivera (1995). "H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers." *Biochem Pharmacol* **50**(1): 91-96.

Davoren, P. R. and E. W. Sutherland (1963). "The Effect of L-Epinephrine and Other Agents on the Synthesis and Release of Adenosine 3',5'-Phosphate by Whole Pigeon Erythrocytes." *J Biol Chem* **238**: 3009-3015.

de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer and J. L. Bos (2000). "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs." *J Biol Chem* **275**(27): 20829-20836.

de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer and J. L. Bos (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." *Nature* **396**(6710): 474-477.

Decleves, X., A. Fajac, J. Lehmann-Che, M. Tardy, C. Mercier, I. Hurbain, J. L. Laplanche, J. F. Bernaudin and J. M. Scherrmann (2002). "Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines." *Int J Cancer* **98**(2): 173-180.

Deeley, R. G., C. Westlake and S. P. Cole (2006). "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." *Physiol Rev* **86**(3): 849-899.

Deer, E. L., J. Gonzalez-Hernandez, J. D. Coursen, J. E. Shea, J. Ngatia, C. L. Scaife, M. A. Firpo and S. J. Mulvihill (2010). "Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines." *Pancreas* **39**(4): 425-435.

Delpu, Y., N. Hanoun, H. Lulka, F. Sicard, J. Selves, L. Buscail, J. Torrisani and P. Cordelier (2011). "Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis." Curr Genomics **12**(1): 15-24.

Detrick, M. S., R. Kreisberg, J. W. Koontz and R. N. Moore (1992). "Nanomolar cyclic adenosine and guanosine monophosphates stimulate macrophage colony-stimulating factor responsiveness by murine transitional progenitors." J Leukoc Biol **52**(3): 249-254.

Dremier, S., V. Pohl, C. Poteet-Smith, P. P. Roger, J. Corbin, S. O. Doskeland, J. E. Dumont and C. Maenhaut (1997). "Activation of cyclic AMP-dependent kinase is required but may not be sufficient to mimic cyclic AMP-dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells." Mol Cell Biol **17**(11): 6717-6726.

Dreuw, A., H. M. Hermanns, R. Heise, S. Joussen, F. Rodriguez, Y. Marquardt, F. Jugert, H. F. Merk, P. C. Heinrich and J. M. Baron (2005). "Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts." J Invest Dermatol **124**(1): 28-37.

Elalamy, I., F. A. Said, M. Singer, J. P. Couetil and M. Hatmi (2000). "Inhibition by extracellular cAMP of phorbol 12-myristate 13-acetate-induced prostaglandin H synthase-2 expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. Involvement of an ecto-protein kinase A activity." J Biol Chem **275**(18): 13662-13667.

Eser, S., A. Schnieke, G. Schneider and D. Saur (2014). "Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer." Br J Cancer **111**(5): 817-822.

Fehr, T. F., E. S. Dickinson, S. J. Goldman and L. L. Slakey (1990). "Cyclic AMP efflux is regulated by occupancy of the adenosine receptor in pig aortic smooth muscle cells." J Biol Chem **265**(19): 10974-10980.

Fernandez, N., F. Monczor, B. Lemos, C. Notcovich, A. Baldi, C. Davio and C. Shayo (2002). "Reduction of G protein-coupled receptor kinase 2 expression in U-937 cells attenuates H2 histamine receptor desensitization and induces cell maturation." Mol Pharmacol **62**(6): 1506-1514.

Fong, Z. V. and J. M. Winter (2012). "Biomarkers in pancreatic cancer: diagnostic, prognostic, and predictive." Cancer J **18**(6): 530-538.

Foord, S. M., T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding and A. J. Harmar (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." Pharmacol Rev **57**(2): 279-288.

Forte, L. R., W. T. Chao, J. Walkenbach and K. H. Byington (1975). "Studies of kidney plasma membrane adenosine-3',5'-monophosphate-dependent protein kinase." Biochim Biophys Acta **389**(1): 84-96.

Furukawa, T., Y. Kuboki, E. Tanji, S. Yoshida, T. Hatori, M. Yamamoto, N. Shibata, K. Shimizu, N. Kamatani and K. Shiratori (2011). "Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas." Sci Rep **1**: 161.

Gilman, A. G. (1970). "A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(1): 305-312.

Go, V. L. W. (2007). "Tumors of the Pancreas (Atlas of Tumor Pathology Series 4)." Pancreas **35**(4): 388.

Gori, I., Y. Rodriguez, C. Pellegrini, C. Achdari, D. Hornung, E. Chardonnens, D. Wunder, M. Fiche and G. O. Canny (2013). "Augmented epithelial multidrug resistance-associated protein 4 expression in peritoneal endometriosis: regulation by lipoxin A(4)." Fertil Steril **99**(7): 1965-1973 e1962.

Gradilone, A., F. M. Pulcinelli, L. V. Lotti, S. Martino, T. Mattiello, L. Frati, A. M. Agliano and P. Gazzaniga (2007). "Celecoxib induces MRP-4 in lung cancer cells: therapeutic implications." J Clin Oncol **25**(27): 4318-4320; author reply 4320.

Gradilone, A., F. M. Pulcinelli, L. V. Lotti, E. Trifiro, S. Martino, O. Gandini, W. Gianni, L. Frati, A. M. Agliano and P. Gazzaniga (2008). "Celecoxib upregulates multidrug resistance proteins in colon cancer: lack of synergy with standard chemotherapy." Curr Cancer Drug Targets **8**(5): 414-420.

Guo, Y., K. Kock, C. A. Ritter, Z. S. Chen, M. Grube, G. Jedlitschky, T. Illmer, M. Ayres, J. F. Beck, W. Siegmund, G. Ehninger, V. Gandhi, H. K. Kroemer, G. D. Kruh and M. Schaich (2009). "Expression of ABCC-type nucleotide exporters in blasts of adult acute myeloid leukemia: relation to long-term survival." Clin Cancer Res **15**(5): 1762-1769.

Guo, Y., E. Kotova, Z. S. Chen, K. Lee, E. Hopper-Borge, M. G. Belinsky and G. D. Kruh (2003). "MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine." J Biol Chem **278**(32): 29509-29514.

Hagmann, W., R. Jesnowski, R. Faissner, C. Guo and J. M. Lohr (2009). "ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells." Pancreatology **9**(1-2): 136-144.

Hall, J. E. and A. C. Guyton (2011). Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia, Pa., Saunders/Elsevier.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hara, Y., Y. Sassi, C. Guibert, N. Gambaryan, P. Dorfmueller, S. Eddahibi, A. M. Lompre, M. Humbert and J. S. Hulot (2011). "Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice." J Clin Invest **121**(7): 2888-2897.

Hartwell, L. (1994). "Cell cycle. cAMPing out." Nature **371**(6495): 286.

Henderson, M. J., M. Haber, A. Porro, M. A. Munoz, N. Iraci, C. Xue, J. Murray, C. L. Flemming, J. Smith, J. I. Fletcher, S. Gherardi, C. K. Kwek, A. J. Russell, E. Valli, W. B. London, A. B. Buxton, L. J. Ashton, A. C. Sartorelli, S. L. Cohn, M. Schwab, G. M. Marshall, G. Perini and M. D. Norris (2011). "ABCC multidrug transporters in childhood neuroblastoma: clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux." J Natl Cancer Inst **103**(16): 1236-1251.

Herzog, T. J. (2006). "The current treatment of recurrent ovarian cancer." Curr Oncol Rep **8**(6): 448-454.

Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy and R. A. Depinho (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Genes Dev **20**(10): 1218-1249.

Ho, L. L., J. G. Kench, D. J. Handelsman, G. L. Scheffer, P. D. Stricker, J. G. Grygiel, R. L. Sutherland, S. M. Henshall, J. D. Allen and L. G. Horvath (2008). "Androgen regulation of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in prostate cancer." Prostate **68**(13): 1421-1429.

Hochbaum, D., T. Tanos, F. Ribeiro-Neto, D. Altschuler and O. A. Coso (2003). "Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger." J Biol Chem **278**(36): 33738-33746.

Hofer, A. M. and K. Lefkimiatis (2007). "Extracellular calcium and cAMP: second messengers as "third messengers"?" Physiology (Bethesda) **22**: 320-327.

Houslay, M. D. (1998). "Adaptation in cyclic AMP signalling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases." Semin Cell Dev Biol **9**(2): 161-167.

Houslay, M. D. and G. Milligan (1997). "Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity." Trends Biochem Sci **22**(6): 217-224.

Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons and S. E. Kern (2000). "Progression model for pancreatic cancer." Clin Cancer Res **6**(8): 2969-2972.

Huynh, T., M. D. Norris, M. Haber and M. J. Henderson (2012). "ABCC4/MRP4: a MYCN-regulated transporter and potential therapeutic target in neuroblastoma." Front Oncol **2**: 178.

Insel, P., R. Balakir and B. Sacktor (1975). "The binding of cyclic AMP to renal brush border membranes." J Cyclic Nucleotide Res **1**(2): 107-122.

Ito, M., H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike and T. Nakahata (2002). "NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells." Blood **100**(9): 3175-3182.

Iwamura, T. and M. Hollingsworth (1999). Pancreatic Tumors. Human Cell Culture. J. W. Masters and B. Palsson, Springer Netherlands. **1**: 107-122.

Iyengar, R. (1996). "Gating by cyclic AMP: expanded role for an old signaling pathway." Science **271**(5248): 461-463.

Jackson, E. K. and R. K. Dubey (2001). "Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology." Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F597-612.

Jackson, E. K. and D. K. Raghendra (2004). "The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology." Annu Rev Physiol **66**: 571-599.

Jedlitschky, G., B. Burchell and D. Keppler (2000). "The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides." J Biol Chem **275**(39): 30069-30074.

Jedlitschky, G., K. Tirschmann, L. E. Lubenow, H. K. Nieuwenhuis, J. W. Akkerman, A. Greinacher and H. K. Kroemer (2004). "The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage." Blood **104**(12): 3603-3610.

Kanda, M., H. Matthaei, J. Wu, S. M. Hong, J. Yu, M. Borges, R. H. Hruban, A. Maitra, K. Kinzler, B. Vogelstein and M. Goggins (2012). "Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia." Gastroenterology **142**(4): 730-733 e739.

Karin, M. (1994). "Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors." Curr Opin Cell Biol **6**(3): 415-424.

Kasai, H. and O. H. Petersen (1994). "Spatial dynamics of second messengers: IP3 and cAMP as long-range and associative messengers." Trends Neurosci **17**(3): 95-101.

Kim, J. Y. and P. N. Devreotes (1994). "Random chimeragenesis of G-protein-coupled receptors. Mapping the affinity of the cAMP chemoattractant receptors in Dictyostelium." J Biol Chem **269**(46): 28724-28731.

Kleger, A., L. Perkhofer and T. Seufferlein (2014). "Smarter drugs emerging in pancreatic cancer therapy." Ann Oncol **25**(7): 1260-1270.

Klein, D. M. and R. F. Loizzi (1977). "Enhancement of R3230AC rat mammary tumor growth and cellular differentiation by dibutyl cyclic adenosine monophosphate." J Natl Cancer Inst **58**(3): 813-818.

Kondrashin, A., M. Nesterova and Y. S. Cho-Chung (1999). "Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on the external surface of LS-174T human colon carcinoma cells." Biochemistry **38**(1): 172-179.

Konig, J., M. Hartel, A. T. Nies, M. E. Martignoni, J. Guo, M. W. Buchler, H. Friess and D. Keppler (2005). "Expression and localization of human multidrug

resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma." Int J Cancer **115**(3): 359-367.

Kool, M., M. de Haas, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, M. J. van Eijk, J. A. Juijn, F. Baas and P. Borst (1997). "Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines." Cancer Res **57**(16): 3537-3547.

Krebs, E. G., R. B. Huston and F. L. Hunkeler (1968). "Properties of phosphorylase kinase and its control in skeletal muscle." Adv Enzyme Regul **6**: 245-255.

Kruh, G. D., M. G. Belinsky, J. M. Gallo and K. Lee (2007). "Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice." Cancer Metastasis Rev **26**(1): 5-14.

Kruh, G. D., Y. Guo, E. Hopper-Borge, M. G. Belinsky and Z. S. Chen (2007). "ABCC10, ABCC11, and ABCC12." Pflugers Arch **453**(5): 675-684.

Lemoine, N. R. (2005). "Silencing RNA: a novel treatment for pancreatic cancer?" Gut **54**(9): 1215-1216.

Levine, R. A. and J. A. Vogel (1965). "Cardiovascular and metabolic effects of adenosine 3',5'-monophosphate in vivo." Nature **207**(5000): 987-988.

Li, C., P. C. Krishnamurthy, H. Penmatsa, K. L. Marrs, X. Q. Wang, M. Zaccolo, K. Jalink, M. Li, D. J. Nelson, J. D. Schuetz and A. P. Naren (2007). "Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia." Cell **131**(5): 940-951.

Li, Y., S. Asuri, J. F. Rebhun, A. F. Castro, N. C. Parnavitana and L. A. Quilliam (2006). "The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane." J Biol Chem **281**(5): 2506-2514.

Lieber, M., J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan and G. Todaro (1975). "Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas." Int J Cancer **15**(5): 741-747.

Lin-Lee, Y. C., S. Tatebe, N. Savaraj, T. Ishikawa and M. Tien Kuo (2001). "Differential sensitivities of the MRP gene family and gamma-glutamylcysteine synthetase to prooxidants in human colorectal carcinoma cell lines with different p53 status." Biochem Pharmacol **61**(5): 555-563.

Lin, Z. P., Y. L. Zhu, D. R. Johnson, K. P. Rice, T. Nottoli, B. C. Hains, J. McGrath, S. G. Waxman and A. C. Sartorelli (2008). "Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response." Mol Pharmacol **73**(1): 243-251.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lohr, M., G. Kloppel, P. Maisonneuve, A. B. Lowenfels and J. Luttges (2005). "Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis." Neoplasia **7**(1): 17-23.

Lorenz, R., T. Aleksic, M. Wagner, G. Adler and C. K. Weber (2008). "The cAMP/Epac1/Rap1 pathway in pancreatic carcinoma." Pancreas **37**(1): 102-103.

Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvett, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

Maeng, H. J., W. J. Lee, Q. R. Jin, J. E. Chang and W. S. Shim (2014). "Upregulation of COX-2 in the lung cancer promotes overexpression of multidrug

resistance protein 4 (MRP4) via PGE2-dependent pathway." Eur J Pharm Sci **62**: 189-196.

Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." Cell **80**(2): 179-185.

Metzgar, R. S., M. T. Gaillard, S. J. Levine, F. L. Tuck, E. H. Bossen and M. J. Borowitz (1982). "Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies." Cancer Res **42**(2): 601-608.

Michel, J. J. and J. D. Scott (2002). "AKAP mediated signal transduction." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 235-257.

Mika, D., J. Leroy, G. Vandecasteele and R. Fischmeister (2012). "PDEs create local domains of cAMP signaling." J Mol Cell Cardiol **52**(2): 323-329.

Misek, D. E., T. H. Patwa, D. M. Lubman and D. M. Simeone (2007). "Early detection and biomarkers in pancreatic cancer." J Natl Compr Canc Netw **5**(10): 1034-1041.

Montagut, C. and J. Settleman (2009). "Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy." Cancer Lett **283**(2): 125-134.

Montani, M., T. Hermanns, M. Muntener, P. Wild, T. Sulser and G. Kristiansen (2013). "Multidrug resistance protein 4 (MRP4) expression in prostate cancer is associated with androgen signaling and decreases with tumor progression." Virchows Arch **462**(4): 437-443.

Moyer, A. M., Z. Sun, A. J. Batzler, L. Li, D. J. Schaid, P. Yang and R. M. Weinshilboum (2010). "Glutathione pathway genetic polymorphisms and lung cancer survival after platinum-based chemotherapy." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(3): 811-821.

Nies, A. T., G. Jedlitschky, J. Konig, C. Herold-Mende, H. H. Steiner, H. P. Schmitt and D. Keppler (2004). "Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain." Neuroscience **129**(2): 349-360.

Nishiyama, M. (2008). "Chemotherapy for gastric cancer in Japan." Int J Clin Oncol **13**(3): 191-192.

Norris, M. D., J. Smith, K. Tanabe, P. Tobin, C. Flemming, G. L. Scheffer, P. Wielinga, S. L. Cohn, W. B. London, G. M. Marshall, J. D. Allen and M. Haber (2005). "Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro." Mol Cancer Ther **4**(4): 547-553.

O'Hayre, M., J. Vazquez-Prado, I. Kufareva, E. W. Stawiski, T. M. Handel, S. Seshagiri and J. S. Gutkind (2013). "The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer." Nat Rev Cancer **13**(6): 412-424.

Oevermann, L., J. Scheitz, K. Starke, K. Kock, T. Kiefer, G. Dolken, J. Niessen, A. Greinacher, W. Siegmund, M. Zygmunt, H. K. Kroemer, G. Jedlitschky and C. A. Ritter (2009). "Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs." Int J Cancer **124**(10): 2303-2311.

Ohmura, E., K. Wakai, O. Isozaki, H. Murakami, N. Onoda, N. Emoto, K. Shizume, T. Tsushima, H. Demura and R. K. Robins (1993). "Inhibition of human pancreatic cancer cell (MIA PaCa-2) growth by cholera toxin and 8-chloro-cAMP in vitro." Br J Cancer **67**(2): 279-283.

Okami, J., H. Yamamoto, Y. Fujiwara, M. Tsujie, M. Kondo, S. Noura, S. Oshima, H. Nagano, K. Dono, K. Umeshita, O. Ishikawa, M. Sakon, N. Matsuura, S. Nakamori

and M. Monden (1999). "Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas." Clin Cancer Res **5**(8): 2018-2024.

Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.

Olsson, I., G. Bergh, M. Ehinger and U. Gullberg (1996). "Cell differentiation in acute myeloid leukemia." Eur J Haematol **57**(1): 1-16.

Omura, N., M. Griffith, A. Vincent, A. Li, S. M. Hong, K. Walter, M. Borges and M. Goggins (2010). "Cyclooxygenase-deficient pancreatic cancer cells use exogenous sources of prostaglandins." Mol Cancer Res **8**(6): 821-832.

Ottendorf, N. A., R. F. de Wilde, A. Maitra, R. H. Hruban and G. J. Offerhaus (2011). "Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma." Patholog Res Int **2011**: 620601.

Pandol, S., M. Edderkaoui, I. Gukovsky, A. Lugea and A. Gukovskaya (2009). "Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma." Clin Gastroenterol Hepatol **7**(11 Suppl): S44-47.

Parsons, B. L. and F. Meng (2009). "K-RAS mutation in the screening, prognosis and treatment of cancer." Biomark Med **3**(6): 757-769.

Pea, F. (2005). "Pharmacology of drugs for hyperuricemia. Mechanisms, kinetics and interactions." Contrib Nephrol **147**: 35-46.

Pedron, T., R. Girard and R. Chaby (1999). "Exogenous cyclic AMP, cholera toxin, and endotoxin induce expression of the lipopolysaccharide receptor CD14 in murine bone marrow cells: role of purinoreceptors." Clin Diagn Lab Immunol **6**(6): 885-890.

Peschle, C., I. A. Rappaport, A. D'Avanzo, S. Russolillo, G. Marone and M. Condorelli (1973). "Renal mechanisms underlying cyclic AMP action on erythropoiesis." Br J Haematol **25**(3): 393-398.

Pitcher, J., M. J. Lohse, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). "Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms." Biochemistry **31**(12): 3193-3197.

Plotnikov, A., E. Zehorai, S. Procaccia and R. Seger (2011). "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1619-1633.

Prasad, K. N. and S. Kumar (1975). "Role of cyclic AMP in differentiation of human neuroblastoma cells in culture." Cancer **36**(4): 1338-1343.

Rahib, L., B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman and L. M. Matrisian (2014). "Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States." Cancer Res **74**(11): 2913-2921.

Rama, A. R., P. J. Alvarez, R. Madeddu and A. Aranega (2014). "ABC transporters as differentiation markers in glioblastoma cells." Mol Biol Rep **41**(8): 4847-4851.

Ravna, A. W., I. Sylte and G. Sager (2009). "Binding site of ABC transporter homology models confirmed by ABCB1 crystal structure." Theor Biol Med Model **6**: 20.

Ritter, C. A., G. Jedlitschky, H. Meyer zu Schwabedissen, M. Grube, K. Kock and H. K. Kroemer (2005). "Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5)." Drug Metab Rev **37**(1): 253-278.

Rius, M., A. T. Nies, J. Hummel-Eisenbeiss, G. Jedlitschky and D. Keppler (2003). "Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane." Hepatology **38**(2): 374-384.

Robillard, K. R., T. Hoque and R. Bendayan (2012). "Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in rodent and human sertoli cells: relevance to the permeability of antiretroviral therapy at the blood-testis barrier." J Pharmacol Exp Ther **340**(1): 96-108.

Rodriguez, M. R., F. Diez, M. S. Ventimiglia, V. Morales, S. Copsel, M. S. Vatta, C. A. Davio and L. G. Bianciotti (2011). "Atrial natriuretic factor stimulates efflux of cAMP in rat exocrine pancreas via multidrug resistance-associated proteins." Gastroenterology **140**(4): 1292-1302.

Rosenberg, P. A. and M. A. Dichter (1989). "Extracellular cAMP accumulation and degradation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture." J Neurosci **9**(8): 2654-2663.

Russel, F. G., J. B. Koenderink and R. Masereeuw (2008). "Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules." Trends Pharmacol Sci **29**(4): 200-207.

Sack, T. L., J. R. Gum and Y. S. Kim (1988). "Cyclic-AMP-stimulated synthesis and release of carcinoembryonic antigen by pancreatic cancer cells." Int J Pancreatol **3**(2-3): 171-184.

Sassi, Y., Y. Hara, A. M. Lompre and J. S. Hulot (2009). "Multi-drug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) and cyclic nucleotides signaling pathways." Cell Cycle **8**(7): 962-963.

Sassi, Y., L. Lipskaia, G. Vandecasteele, V. O. Nikolaev, S. N. Hatem, F. Cohen Aubart, F. G. Russel, N. Mougenot, C. Vrignaud, P. Lechat, A. M. Lompre and J. S. Hulot (2008). "Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation." J Clin Invest **118**(8): 2747-2757.

Sauna, Z. E., K. Nandigama and S. V. Ambudkar (2004). "Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state." J Biol Chem **279**(47): 48855-48864.

Scavennec, J., Y. Carcassonne, J. A. Gastaut, A. Blanc and H. L. Cailla (1981). "Relationship between the levels of cyclic cytidine 3':5'-monophosphate, cyclic guanosine 3':5'-monophosphate, and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in urines and leukocytes and the type of human leukemias." Cancer Res **41**(8): 3222-3227.

Schooley, J. C. and L. J. Mahlmann (1975). "Adenosine, AMP, cyclic AMP, theophylline and the action and production of erythropoietin." Proc Soc Exp Biol Med **150**(1): 215-219.

Schuetz, J. D., M. C. Connelly, D. Sun, S. G. Paibir, P. M. Flynn, R. V. Srinivas, A. Kumar and A. Fridland (1999). "MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs." Nat Med **5**(9): 1048-1051.

Schwartz, G. K. and M. A. Shah (2005). "Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy." J Clin Oncol **23**(36): 9408-9421.

Shand, R. L. and E. P. Gelmann (2006). "Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis." Curr Opin Urol **16**(3): 123-131.

Sinha, C., A. Ren, K. Arora, C. S. Moon, S. Yarlagadda, K. Woodrooffe, S. Lin, J. D. Schuetz, A. G. Ziady and A. P. Naren (2015). "PKA and actin play critical roles as downstream effectors in MRP4-mediated regulation of fibroblast migration." Cell Signal **27**(7): 1345-1355.

Sinha, C., A. Ren, K. Arora, C. S. Moon, S. Yarlagadda, W. Zhang, S. B. Cheepala, J. D. Schuetz and A. P. Naren (2013). "Multi-drug resistance protein 4 (MRP4)-

mediated regulation of fibroblast cell migration reflects a dichotomous role of intracellular cyclic nucleotides." *J Biol Chem* **288**(6): 3786-3794.

Sipos, B., S. Moser, H. Kalthoff, V. Torok, M. Lohr and G. Kloppel (2003). "A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform." *Virchows Arch* **442**(5): 444-452.

Skrypek, N., B. Duchene, M. Hebbar, E. Leteurtre, I. van Seuningen and N. Jonckheere (2013). "The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family." *Oncogene* **32**(13): 1714-1723.

Sorbera, L. A. and M. Morad (1991). "Modulation of cardiac sodium channels by cAMP receptors on the myocyte surface." *Science* **253**(5025): 1286-1289.

Stork, P. J. and J. M. Schmitt (2002). "Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation." *Trends Cell Biol* **12**(6): 258-266.

Strewler, G. J. (1984). "Release of cAMP from a renal epithelial cell line." *Am J Physiol* **246**(3 Pt 1): C224-230.

Strouch, M. B., E. K. Jackson, Z. Mi, N. A. Metes and G. B. Carey (2005). "Extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in isolated adipocytes and adipose tissue." *Obes Res* **13**(6): 974-981.

Su, D. M., S. Navarre, W. J. Oh, B. G. Condie and N. R. Manley (2003). "A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation." *Nat Immunol* **4**(11): 1128-1135.

Sun, T. J., P. J. Van Haastert and P. N. Devreotes (1990). "Surface cAMP receptors mediate multiple responses during development in Dictyostelium: evidenced by antisense mutagenesis." *J Cell Biol* **110**(5): 1549-1554.

Sun, Y., N. Shi, H. Lu, J. Zhang, Y. Ma, Y. Qiao, Y. Mao, K. Jia, L. Han, F. Liu, H. Li, Z. Lin, X. Li and X. Zhao (2014). "ABCC4 copy number variation is associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma." *Carcinogenesis* **35**(9): 1941-1950.

Sutherland, E. W. and T. W. Rall (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles." *J Biol Chem* **232**(2): 1077-1091.

Tan, M. H., N. J. Nowak, R. Loo, H. Ochi, A. A. Sandberg, C. Lopez, J. W. Pickren, R. Berjian, H. O. Douglass, Jr. and T. M. Chu (1986). "Characterization of a new primary human pancreatic tumor line." *Cancer Invest* **4**(1): 15-23.

Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." *Physiol Rev* **84**(1): 137-167.

Tchernitsa, O. I., C. Sers, J. Zuber, B. Hinzmann, M. Grips, A. Schramme, P. Lund, A. Schwendel, A. Rosenthal and R. Schafer (2004). "Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells." *Oncogene* **23**(26): 4536-4555.

Thati, B., A. Noble, B. S. Creaven, M. Walsh, M. McCann, K. Kavanagh, M. Devereux and D. A. Egan (2007). "A study of the role of apoptotic cell death and cell cycle events mediating the mechanism of action of 6-hydroxycoumarin-3-carboxylatosilver in human malignant hepatic cells." *Cancer Lett* **250**(1): 128-139.

Tofovic, S. P., K. R. Branch, R. D. Oliver, W. D. Magee and E. K. Jackson (1991). "Caffeine potentiates vasodilator-induced renin release." *J Pharmacol Exp Ther* **256**(3): 850-860.

Torky, A. R., E. Stehfest, K. Viehweger, C. Taeye and H. Foth (2005). "Immunohistochemical detection of MRPs in human lung cells in culture." *Toxicology* **207**(3): 437-450.

Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin.

Tucker, O. N., A. J. Dannenberg, E. K. Yang, F. Zhang, L. Teng, J. M. Daly, R. A. Soslow, J. L. Masferrer, B. M. Woerner, A. T. Koki and T. J. Fahey, 3rd (1999). "Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer." Cancer Res **59**(5): 987-990.

Umezawa, A., K. Koyama, J. Tanaka, Y. Sato and Y. Asanuma (1995). "Effect of dibutyryl cyclic AMP on the cell cycle of human pancreatic cancer inoculated in nude mice." J Surg Oncol **58**(2): 129-133.

van Aabel, R. A., P. H. Smeets, J. G. Peters, R. J. Bindels and F. G. Russel (2002). "The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP." J Am Soc Nephrol **13**(3): 595-603.

van de Ven, R., G. L. Scheffer, A. W. Reurs, J. J. Lindenberg, R. Oerlemans, G. Jansen, J. P. Gillet, J. N. Glasgow, A. Pereboev, D. T. Curiel, R. J. Scheper and T. D. de Gruijl (2008). "A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration." Blood **112**(6): 2353-2359.

Vendetti, S., M. Patrizio, A. Riccomi and M. T. De Magistris (2006). "Human CD4+ T lymphocytes with increased intracellular cAMP levels exert regulatory functions by releasing extracellular cAMP." J Leukoc Biol **80**(4): 880-888.

Ventimiglia, M. S., A. C. Najenson, J. C. Perazzo, A. Carozzo, M. S. Vatta, C. A. Davio and L. G. Bianciotti (2015). "Blockade of Multidrug Resistance Associated Proteins Aggravates Acute Pancreatitis and Blunts Atrial Natriuretic Factor Beneficial Effect in Rats: Role of Mrp4/Abcc4." Mol Med.

Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban and M. Goggins (2011). "Pancreatic cancer." Lancet **378**(9791): 607-620.

Waldman, T., Y. Zhang, L. Dillehay, J. Yu, K. Kinzler, B. Vogelstein and J. Williams (1997). "Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy." Nat Med **3**(9): 1034-1036.

Wielinga, P. R., I. van der Heijden, G. Reid, J. H. Beijnen, J. Wijnholds and P. Borst (2003). "Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells." J Biol Chem **278**(20): 17664-17671.

Winter, J. M., A. Maitra and C. J. Yeo (2006). "Genetics and pathology of pancreatic cancer." HPB (Oxford) **8**(5): 324-336.

Wittgen, H. G., J. J. van den Heuvel, E. Krieger, G. Schaftenaar, F. G. Russel and J. B. Koenderink (2012). "Phenylalanine 368 of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) plays a crucial role in substrate-specific transport activity." Biochem Pharmacol **84**(3): 366-373.

Workman, P., E. O. Aboagye, F. Balkwill, A. Balmain, G. Bruder, D. J. Chaplin, J. A. Double, J. Everitt, D. A. Farningham, M. J. Glennie, L. R. Kelland, V. Robinson, I. J. Stratford, G. M. Tozer, S. Watson, S. R. Wedge, S. A. Eccles and I. Committee of the National Cancer Research (2010). "Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research." Br J Cancer **102**(11): 1555-1577.

Wu, J., H. Matthaei, A. Maitra, M. Dal Molin, L. D. Wood, J. R. Eshleman, M. Goggins, M. I. Canto, R. D. Schulick, B. H. Edil, C. L. Wolfgang, A. P. Klein, L. A. Diaz, Jr., P. J. Allen, C. M. Schmidt, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, R. H. Hruban and B. Vogelstein (2011). "Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development." Sci Transl Med **3**(92): 92ra66.

Xie, M., T. C. Rich, C. Scheitrum, M. Conti and W. Richter (2011). "Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP." *Mol Pharmacol* **80**(2): 281-293.

Xu, X. F., C. G. Xie, X. P. Wang, J. Liu, Y. C. Yu, H. L. Hu and C. Y. Guo (2008). "Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo." *Tohoku J Exp Med* **215**(2): 149-157.

Young, L. C., B. G. Campling, T. Voskoglou-Nomikos, S. P. Cole, R. G. Deeley and J. H. Gerlach (1999). "Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response." *Clin Cancer Res* **5**(3): 673-680.

Yu, Z., C. Zhang, R. Chai, Y. Du, X. Gao, J. Xing, E. Yu, W. Zhang, X. Zhang, G. Cao and C. Fu (2014). "Prognostic significance and molecular mechanism of ATP-binding cassette subfamily C member 4 in resistance to neoadjuvant radiotherapy of locally advanced rectal carcinoma." *PLoS One* **9**(1): e85446.

Yu, Z. Q., C. Zhang, H. Wang, X. Y. Lao, R. Chai, X. H. Gao, G. W. Cao and C. G. Fu (2013). "Downregulation of ATP-binding cassette subfamily C member 4 increases sensitivity to neoadjuvant radiotherapy for locally advanced rectal carcinoma." *Dis Colon Rectum* **56**(5): 600-608.

Zelcer, N., G. Reid, P. Wielinga, A. Kuil, I. van der Heijden, J. D. Schuetz and P. Borst (2003). "Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4)." *Biochem J* **371**(Pt 2): 361-367.

Zhang, Y. H., Q. Wu, X. Y. Xiao, D. W. Li and X. P. Wang (2010). "Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell." *Cancer Lett* **291**(1): 76-82.

Zhang, Z., J. Wang, B. Shen, C. Peng and M. Zheng (2012). "The ABCC4 gene is a promising target for pancreatic cancer therapy." *Gene* **491**(2): 194-199.

Zhao, X., Y. Guo, W. Yue, L. Zhang, M. Gu and Y. Wang (2014). "ABCC4 is required for cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer." *Oncotargets Ther* **7**: 343-351.

Zimmerman, N. P., I. Roy, A. D. Hauser, J. M. Wilson, C. L. Williams and M. B. Dwinell (2015). "Cyclic AMP regulates the migration and invasion potential of human pancreatic cancer cells." *Mol Carcinog* **54**(3): 203-215.

Zimmermann, H. (1992). "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects." *Biochem J* **285** (Pt 2): 345-365.