

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra

TESI DOCTORAL

PAPER DE SNAIL1 EN EL PÀNCREES ADULT

Memòria presentada per:

Jordina Loubat Casanovas

per optar al grau de Doctora

Aquets treball ha estat realitzat en el grup de Transició Epiteli Mesènquima i Progressió Tumoral dins del Programa de Recerca en Càncer de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica- Hospital del Mar (IMIM- Hospital del Mar)

Barcelona, 2015

Dr. Antonio García de Herreros Madueño
(co-director)

Clara Francí Carreté
(co-directora)

Jordina Loubat Casanovas
(estudiant de doctorat)



Als meus pares.

A MasValents



*Per tu Bruno,
sempre estaràs amb mí.*

***“Una mica de coneixement
genera consciència d’una gran ignorància”***

Kim Nasmyth

ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES	xvii
Abreviatures	xxiii
RESUM	xxvii
ABSTRACT	xxviii
INTRODUCCIÓ	1
1. EMT, TRANSICIÓ EPITELI MESÈNQUIMA	3
1.1 EMT: característiques generals	3
1.2 EMT: Rellevància fisiològica	5
1.2.1 EMT en desenvolupament	5
1.2.2 EMT en processos patològics	6
2. SNAIL1	8
2.1 Estructura i regulació de la proteïna	9
2.2 Dianes moleculars i mecanisme d'acció	10
3. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL1	16
3.1 Expressió de Snail1 en el desenvolupament	16
3.2 Snail1 en fibroblasts: fibrosi i cicatrització de la ferida	16
3.3 Rol de Snail1 en la progressió tumoral	20
3.4 Snail1 en l'embrió i en l'animal adult	22
4. EL RATOLÍ TRANSGÈNIC KO DE SNAIL1	24
5. EL PÀNCREES	26
OBJECTIUS	29
RESULTATS	33
1. OBTENCIÓ DEL MODEL ANIMAL: RATOLÍ KO CONDICIONAL PER SNAIL1	35

2. LA DELECIÓ DEL GEN SNAIL1 EN EL RATOLÍ ADULT PROVOCA ALTERACIONS EN EL PÀNCREES.	37
2.1. Els ratolins KO de Snail1 presenten una dràstica disminució de pes acompanyada d'alteracions en la morfologia del pàncrees.	37
2.2 Els ratolins KO de Snail1 tenen alterada la funció exocrina del pàncrees.	40
2.3 Els ratolins KO de Snail1 presenten defectes en la histologia del pàncrees.	42
3. SNAIL1 S'EXPRESSA EN ALGUNES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES (PMC)	56
4. LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES KO PER SNAIL1 NO EXPRESSEN β -CATENINA NUCLEAR	66
5. CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES AÏLLADES IN VITRO	69
5.1 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees cultivades " <i>in vitro</i> " expressen Snail1	69
5.2 La deleció de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees no efecte l'expressió d'altres marcadors mesenquimals.	70
5.3 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 proliferen igual que les cèl·lules CT.	71
6. LA DELECIÓ DE SNAIL1 EN LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES EN CULTIU DISMINUEIX L'EXPRESSIÓ DE GENS DIANA DE LA β -CATENINA	73
6.1 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 expressen menys IL-6 que les cèl·lules CT al ser estimulades amb TGF β .	73
6.2 La falta d'expressió de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees promou l'exclusió de la β -catenina nuclear	75

6.3 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 expressen menys PGE2, inclús després de l'estimulació amb IL-1 α	76
7. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL1 EN LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES CONTRIBUEIX AL MANTENIMENT DE LES CARACTERÍSTIQUES ACINARS DEL CULTIU DELS EXPLANTS ACINARS PANCREÀTICS.	78
7.1 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees retarden la pèrdua de marcadors acinars dels explants acinars en ser sembrats en cocultiu " <i>in vitro</i> ".	78
7.2 El cocultiu en matrigel de l'explant acinar amb les cèl·lules mesenquimals del pàncrees afavoreix la formació d'estructures esfèriques de cèl·lules epitelials.	79
7.3 L'expressió de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees millora el manteniment dels marcadors acinars dels explants acinars en cultiu.	83
8. LA DELECIÓ DE SNAIL1 EFECTE EL FENOTIP DELS TUMORS DE PÀNCREES.	86
8.1. Obtenció del model animal: ratolí Ela-Myc KO condicional per Snail1.	86
8.2. Snail1 s'expressa a l'estroma dels tumors pancreàtics dels ratolins control, al voltant de les àrees de fenotip acinars.	87
8.3. Els tumors dels ratolins KO no presenten diferències significatives ni en el volum ni en el pes respecte dels tumors dels ratolins CT.	89
8.4. Els tumors dels ratolins CT tenen un major component acinar i els dels ratolins KO tenen un major component ductal.	90
DISCUSSIÓ	93
CONCLUSIONS	107

MATERIALS I MÈTODES	111
1. MÈTODES RELACIONATS AMB LA MANIPULACIÓ D'ANIMALS	113
1.1. Manteniment de les línies de ratolins.	113
1.1.1 Línia de ratolins KO Condicional per Snail1: Snail flox/del2-B6.Cg-Tg (CAG-Cre/Esr1)5	113
1.1.2 Línia de ratolins Ela-Myc KO Condicional per Snail1: Snail1 flox/del2-B6.Cg-Tg (CAG-Cre/Esr1)5-GT(ROSA)26-Ela-Myc	114
1.2. Genotipatge dels animals	115
1.3. Preparació del tamoxifè	117
1.4. Necròpsies i presa de mostres.	118
1.4.1 Extracció de proteïnes dels pàncrees o tumors pancreàtics i anàlisi per Western Blot:	118
1.4.2 Anàlisi histològic per immunohistoquímica o per tinció amb hematoxilina-eosina dels diferents teixits:	119
1.4.3 Anàlisi per immunofluorescències del pàncrees:	120
1.5. Anàlises de sèrum	121
1.6. Anàlisi de la glucèmia	121
2. LÍNIA CEL·LULAR: PMC (Pancreatic Mesenchymal Cells)	121
2.1. Aïllament de les PMC	121
2.2. Purificació per SORTER de les PMC CD105 positives	122
2.3. Infecció retroviral i transfecció	123
2.3.1. Infecció amb pMXCre i pBABE:	123
2.3.2. Transfecció amb pIRES:	123
2.4. Determinacions de RNA i proteïnes	123
2.4.1. Extracció i anàlisi de RNA:	123
2.4.2. Extracció i anàlisi de proteïna:	124
2.4.3. Immunofluorescència:	125
2.4.4. Quantificació de PGE2:	125

3. EXPLANT ACINAR	126
3.1 Aïllament dels explants acinars	126
a) Cultiu 2D de l'explant acinar:	126
b) Cultiu 3D de l'explant acinar:	127
3.3. Immunofluorescència de les esferes	128
4. Estadística	128
BIBLIOGRAFIA	129
PUBLICACIONS	129

ÍNDEX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura I-1. Característiques de les cèl·lules epitelials i mesenquimals	4
Figura I-2. Transicions entre l'estat epitelial i l'estat mesenquimal durant la progressió tumoral.....	7
Figura I-3: Arbre filogenètic de la superfamília Snail.....	8
Figura I-4 Esquema de l'estructura de Snail1 en mamífers.....	9
Figura I-5 Vies involucrades en la regulació de Snail1	11
Figura I-6. Gens regulats per Snail1.	13
Taula I-1. Exemples d'EMT durant el desenvolupament embrionari.....	16
Figura I-7. En l'adult no hi ha expressió d' Snail1 i la seva activació patològica en el ronyó condueix a la fibrosi renal	17
Figura I-8. Activació de fibroblasts.....	18
Figura I-9. Els fibroblasts activats expressen Snail1 durant la reparació de les ferides a la pell de ratolins.	19
Figura I-10. Expressió de snail1 en embrions murins.....	22
Figura I-11: L'expressió d'E-cadherina es manté en el mesoderma dels embrions mutants Snail1 -/-.	24
Figura I-12: Anatomia del pàncrees.	26

RESULTATS

Figura R-1: Creuaments per obtenir la línia de ratolins KO condicional de Snail1.....	36
Figura R-2: Els Ratolins KO per Snail1 no presenten greix intraperitoneal ni subcutani després de l'administració de TAM.....	37
Figura R-3: El pàncrees dels ratolins KO per Snail1 presenten una pèrdua de pes comparat amb els CT.	38
Figura R-4: Els ratolins KO de Snail1 no presenten anomalies a nivell histològic en el ronyó, el fetge, el colon o l'intestí prim.	39

Figura R-5: Els ratolins KO de Snail1 tenen alterada la funció exocrina del pàncrees.....	41
Figura R-6: Els ratolins KO de Snail1 pateixen una pèrdua de la part exocrina del pàncrees acompanyada d'una aparició de cèl·lules adiposes en el teixit pancreàtic.....	42
Figura R-7: La part endocrina del pàncrees no es veu alterada per la falta de Snail.....	45
Figura R-8: La deleció del gen de Snail1 indueix apoptosi als pàncrees dels ratolins KO.....	46
Figura R-9: La deleció del gen de Snail1 indueix apoptosi de les cèl·lules acinars dels ratolins KO.....	48
Figura R-10: La deleció del gen de Snail1 indueix apoptosi de les cèl·lules acinars dels ratolins KO.....	49
Figura R-11: Els pàncrees dels ratolins KO presenten una ràpida pèrdua de les cèl·lules acinars.....	50
Figura R-12: Les cèl·lules ductals del pàncrees KO són més resistents després de la deleció del gen de Snail.....	52
Figura R-13: Recuperació del teixit exocrí pancreàtic 8 setmanes després de la deleció del gen de Snail1.....	53
Figura R-14: Els pàncrees regenerats als ratolins KO mostren una alta taxa proliferativa, inexistent en els pàncrees CT.....	55
Figura R-15: Snail1 s'expressa en algunes cèl·lules mesenquimals del pàncrees.....	56
Figura R-16: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1 expressen alhora CD105.....	58
Figura R-17: Les cèl·lules que expressen desmina al pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1.....	60
Figura R-18: Les cèl·lules que expressen vimentina al pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1.....	61

Figura R-19: Les cèl·lules que expressen α -SMA al pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1	62
Figura R-20: Les cèl·lules que expressen GFAP presenten un patró diferent de les cèl·lules positives per Snail1.....	63
Figura R-21: Les cèl·lules que expressen S100A4 presenten un patró diferent de les cèl·lules positives per Snail1.....	64
Figura R-22: Augment de cèl·lules mesenquimals positives per p-STAT3 en els pàncrees dels ratolins KO.	66
Figura R-23: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO perden l'expressió de β -catenina nuclear.....	67
Figura R-24: Les cèl·lules pancreàtiques mesenquimals positives per CD105 no expressen Snail1 després de ser infectades amb la CRE.....	71
Figura R-25: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees CT i KO per Snail1 no registren canvis ni en el cicle cel·lular ni en la velocitat de creixement.	72
Figura R-26: L'estimulació amb TGF β a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO no fa augmentar l'expressió de TGF β 1 i IL-6 de la mateixa manera que a les CT.....	74
Figura R-27: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees que no expressen Snail1 disminueixen l'expressió de la b-catenina nuclear i la dels seus gens diana.	75
Figura R-28: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 expressen menys PGE2 fins i tot després de l'estimulació amb IL-1.	77
Figura R-29: El cocultiu de les PMC amb l'explant acinar del pàncrees prevé la ràpida disminució dels marcadors acinars.....	79
Figura R-30: L'explant acinar en cultiu 3D forma més estructures esfèriques de cèl·lules epitelials quan es cocultiven amb les cèl·lules mesenquimals dels pàncrees.....	80
Figura R-31: Les esferes més grans no es detecten en els cultius dels explants acinars sembrats en absència de cèl·lules mesenquimals del	

pàncrees i són lleugerament més abundants en el cas dels cocultius amb cèl·lules mesenquimals que expressen Snail1.....	83
Figura R-32: L'expressió de Snail1 a les PMC en cocultiu amb els explants acinars en retarda la pèrdua de marcadors acinars.	85
Figura R-33: Procés de tumorogènesi de la línia Ela-Myc KO condicional per Snail1.....	86
Figura R-34: Snail1 s'expressa a les cèl·lules mesenquimals de l'estroma que rodeja les àrees de tumors acinars en els ratolins CT.	88
Figura R-35: Els tumors dels ratolins KO no presenten diferències significatives a nivell macroscòpic al ser comparats amb els tumors dels ratolins CT.....	89
Figura R-36 Histologia característica de les àrees de carcinoma acinar i d'adenocarcinoma ductal dels tumors de pàncrees del model Ela-Myc. 90	
Figura R-37: L'expressió de Snail1 contribueix al manteniment del fenotip acinar en els tumors dels ratolins CT.	91

MATERIALS I MÈTODES

Figura MM-1: Constructe del gen de Snail1 de la línia de ratolins KO condicional per Snail1.	114
Figura MM-2: Esquema dels creuaments realitzats per obtenir la línia Ela-Myc KO condicional per Snail1	116
Taula MM-1: Encebadors utilitzats en la PCR per genotipar.....	117
Taula MM-2: Condicions de la PCR utilitzades per genotipar.	117
Figura MM-3: Exemple de les bandes obtingudes per PCR dels diferents genotips.....	117
Taula MM-3: Anticossos i dilucions utilitzades per a western blot (WB), immunohistoquímica (IHQ) i immunofluorescència (IF) de teixit, de cèl·lules i d'esferes.....	120
Taula MM-4: Encebadors utilitzats per a realitzar la quantificació de l'expressió de l'RNA.	124

Figura MM-4: Esquema de l'explant acinar sembrat amb presència o absència de PMC..... 127

Figura MM-5: Esquema de l'explant acinar sembrat amb medi 3D 127

Abreviatures

15-HPGD: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase

3'UTR: three prime untranslated region

AMF: autocrine motility factor

BID: Bcl-interacting death agonist

BMP: bone morphogenetic protein

BSA: bovine serum albumin

CCK: Cholecystokinin

CDK: cyclin-dependent kinase

CEEA: ethical committee for animal experimentation

CMV: cytomegalovirus

COX-2: cyclooxygenase 2

CRE: *circular recombinase especific*

CT: control

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DFF: DNA fragmentation factor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: deoxyribonucleic acid

ECM: external cellulare matrix

EGF: epithelial growth factor

EMT: epithelial to mesenchymal transition

ERKs: extracellular signal regulated kinases

ERTM: estrogen receptor ligands 4-hydroxytamoxifen

FACS: fluorescence activated cell sorting

FBS: fetal bovine serum

FGF: fibroblast growth factor

GBSS: Gey's Balanced Salt Solution

GFP: green fluorescent protein

GSK3 β : glycogen-synthase kinase-3 β

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HDAC: histone deacetylase

HGF: hepatocyte growth factor

hGH: human growth hormone

HIF: hypoxia-inducible factor

IF: immunofluorescence

IGF: insuline-like growth factor 1

IHQ: immunohistochemistry

IL: interleukin

ILK: integrin-linked kinase

Ki-67: cell proliferation antigen of monoclonal antibody Ki-67

KO: knock-out

LSD: lysine-specific demethylase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCP1: monocyte chemoattractant protein-1

MEK: mitogen-activated protein kinase

MET: mesenchymal-to-epithelial transition

MMP: matrix metalloproteinase

MSC: mesenchymal stem cell

OCT: optimum cutting temperature

p21: cyclin-dependent kinase inhibitor

p53: tumour suppressor

PAK1: p21-activated kinase

PaSC: pancreatic stellate cells

PCR: polymerase chain reaction

Pdx1: pancreatic and duodenal homeobox 1

PFA: paraformaldehyde

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PMC: pancreatic mesenchymal cell

poly(A): polyadenylation

PTEN: phosphatase and tensin homolog

Ptf1a: pancreas transcription factor 1 alpha

PTH(rP)R: parathyroid hormone related peptide receptor

Rb: retinoblastoma

RNA: ribonucleic acid

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RT-qPCR: real time quantitative PCR

SCF: stem cell factor

SMA: smooth muscle actin

STAT 3: signal transducer and activator of transcription 3

TBS: tris-buffered saline

TBS-T: TBS 0,1% Tween

TCF4: T-cell factor-4

TFG β : transforming growth factor β

Wnt: wingless-related integration site

WT: wild type

XR11: *Xenopus* Bcl-xL homolog

Yap: yes-associated protein

RESUM

Snail1 és un factor de transcripció necessari per al desenvolupament embrionari; d'altra banda, l'expressió Snail1 en els animals adults és molt limitada. En aquesta tesi s'ha inactivat condicionalment Snail1 en ratolins adults i se n'ha analitzat el fenotip. Contràriament del que s'observa en altres òrgans, l'ablació de Snail1 altera ràpidament l'estructura del pàncrees: dues setmanes després de la deleció de Snail1 les cèl·lules acinars disminueixen dràsticament i el pàncrees comença acumular teixit adipós. Quatre setmanes més tard, aquesta conversió afecta la majoria dels acinis mentre que les cèl·lules ductals romanen més resistents i els illots no es veuen afectats. L'expressió de Snail1 no es detecta en l'epiteli, però sí en les cèl·lules mesenquimals del pàncrees (PMC). La deleció de Snail1 en les PMC en cultiu regulen a la baixa l'expressió de diversos gens diana del complex β -catenina / Tcf-4 i preveu parcialment la resposta d'aquestes cèl·lules a la IL-1. A més, l'ablació de Snail1 en les PMC també disminueix l'efecte d'aquestes cèl·lules en el manteniment dels marcadors acinars del pàncrees quan els explants acinars són cocultivats en presència de les PMC. Finalment, també s'ha observat que la deficiència de Snail1 modifica el fenotip dels tumors pancreàtics generats en ratolins transgènics que expressen c-myc sota el control del promotor de l'elastasa: la falta d'expressió de Snail1 no altera significativament la mida dels tumors, però va disminuir la proporció de cèl·lules acinars, afavorint la metaplàsia acinar-ductal. Aquests resultats demostren que Snail1 s'expressa en les PMC jugant un paper fonamental en el manteniment de les cèl·lules acinars del pàncrees tant en condicions normals com en patològiques.

ABSTRACT

Snail1 transcriptional factor is required for a correct embryonic development; however, in adult animals Snail1 expression is very limited. In this thesis a conditionally inactivated Snail1 in adult mice was generated and analyzed the phenotype of these animals. Contrarily to other organs, Snail1 ablation rapidly altered pancreas structure: two weeks after Snail1 depletion acinar cells were markedly depleted and pancreas accumulated adipose tissue. By four weeks this conversion affected most of acini whereas ductal cells were more resistant and islets were not modified. Snail1 expression was not detected in the epithelium but in pancreatic mesenchymal cells (PMCs). Snail1 ablation in cultured PMCs down-regulated the expression of several b-catenin/Tcf-4 target genes and partially prevented the response of these cells to IL-1. Moreover, has been observed that Snail1 depletion in PMCs also decreased the effect of these cells in the maintenance of acinar markers in cultured pancreas explants. Finally, Snail1 deficiency also modified the phenotype of pancreatic tumors generated in transgenic mice expressing c-myc under the control of the elastase promoter: Snail1 depletion did not significantly alter the size of the tumors but decreased the proportion of acinar cells by favoring acinar-ductal metaplasia. These results demonstrate that Snail1 is expressed in PMCs and plays a pivotal role in the maintenance of acinar cells in the pancreas in normal and pathological conditions.

INTRODUCCIÓ



1. EMT, TRANSICIÓ EPITELI MESÈNQUIMA

1.1 EMT: característiques generals

La transició epitelial mesènquima (EMT, de l'anglès *Epithelial-Mesenchymal Transition*) fa referència a una sèrie d'esdeveniments durant els quals cèl·lules epitelials, en resposta a diferents senyals, pateixen profunds canvis moleculars i fenotípics que els porta a adquirir, de forma reversible o irreversible, propietats típicament de cèl·lules mesenquimals com són la pèrdua d'estructures d'adhesió cèl·lula-cèl·lula, la modulació de la polaritat cel·lular, la reorganització del citosquelet i l'adquisició de propietats migratòries, invasives i antiapoptòtiques ¹⁻⁴.

En una capa epitelial típica, sovint una monocapa, les cèl·lules epitelials es distribueixen de forma contigua les unes amb les altres i es mantenen unides mitjançant estructures especialitzades de la membrana com ara les unions estretes (*tight junctions*), les unions adherents (*adherent junctions*) i els desmosomes. Aquestes unions específiques estableixen una forta adherència entre cèl·lules que facilita la comunicació intercel·lular i restringeix la mobilitat, tot preservant la integritat del teixit, permetent que les cèl·lules individuals funcionin com una unitat cohesiva ¹. A més, les cèl·lules epitelials presenten polarització apico-basolateral que ve determinada per l'organització de les unions cèl·lula-cèl·lula, l'organització del citosquelet d'actina i la presència de la làmina basal a la base de la capa de cèl·lules (Fig. I-1).

L'E-cadherina és una proteïna de transmembrana que es localitza a les unions adherents, té un domini extracel·lular que estableix interaccions homotípiques dependents de calci entre molècules d'E-cadherina de les cèl·lules adjacents, i un domini intracel·lular que connecta amb el citosquelet d'actina indirectament mitjançant les catenines. L'E-cadherina és la responsable dels primers contactes entre dues cèl·lules. La pèrdua d'E-cadherina és per si mateix un marcador d'EMT, ja que s'associa amb la pèrdua de fenotip epitelial. Altres marcadors epitelials estan regulats a la baixa durant l'EMT, com claudines i ocludinas, que també formen part de les unions entre cèl·lules. En cultiu, les cèl·lules epitelials creixen formant clústers de cèl·lules que mantenen les unions amb les cèl·lules veïnes.

D'altra banda, les cèl·lules mesenquimals formen teixits menys organitzats i compactes. En molts casos juguen un paper de suport i estan més separades les unes de les altres, tenen una forma més allargada i una polaritat front-cua que en facilita la motilitat i la locomoció²⁻⁵.

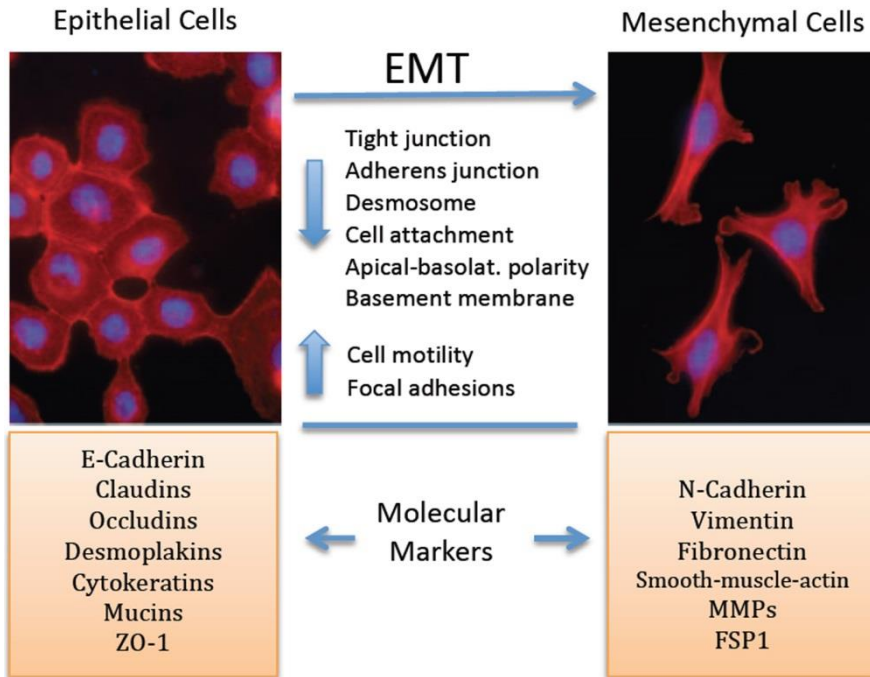


Figura I-1. Característiques de les cèl·lules epitelials i mesenquimals: Esquema on es resumeixen les diferències morfològiques i físiques entre les cèl·lules epitelials i les mesenquimals.

Durant l'EMT hi ha un augment de diferents marcadors mesenquimals, com la N-Cadherina, filaments del citoesquelet, com la Vimentina, components de la matriu extracel·lular (ECM de *External Cellular Matrix*), com la Fibronectina o les metal·loproteinases de matriu (MMP) i de receptors de la família de les integrines. També s'observa una translocació cap al nucli de la β -catenina i un augment en la producció de factors de transcripció tals com Snail, Slug, Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, i/o E47⁶⁻⁸

També s'ha descrit el procés invers, conegut com MET (*Mesenchymal-Epithelial Transition*). Aquest procés es dona en diferents estadis

morfogènics del desenvolupament, en processos metastàtics i en la reprogramació de les cèl·lules mare pluripotents⁹⁻¹¹.

1.2 EMT: Rellevància fisiològica

Les cèl·lules epitelials fan servir l'EMT per dissociar-se de l'epiteli i migrar com a cèl·lules individuals per dirigir-se a diferents localitzacions. A més, l'EMT ha estat reconeguda pels biòlegs del desenvolupament com un important procés per la generació de teixits i òrgans durant l'embriogènesi de vertebrats i invertebrats. De fet, diverses rondes de EMT i MET són necessàries per a la diferenciació de diferents tipus de cèl·lules especialitzades i l'adquisició de la complexa estructura tridimensional d'òrgans interns¹²⁻¹³. Aquests tipus de processos tenen lloc tant en fases clau del desenvolupament embrionari com en diferents processos patològics, com la fibrosi, la cicatrització d'una ferida a la pell i la progressió tumoral.

1.2.1 EMT en desenvolupament

Durant el desenvolupament embrionari diferents senyals extracel·lulars poden engegar un procés d'EMT i convertir cèl·lules epitelials en cèl·lules mesenquimals. Dits processos d'EMT han esdevinguts claus durant l'evolució dels éssers vius, ja que han permès l'aparició d'estructures tissulars molt elaborades. En la majoria de metazous el primer estadi del desenvolupament on es dona l'EMT és en el procés de gastrulació. L'ectoderma presumptiu de la blàstula, constituït per capes de cèl·lules fortament unides entre elles per les unions adherents i a la matriu extracel·lular, s'invagina i es delamina per donar lloc a cèl·lules mesenquimals que migraran i constituïran l'endoderma i el mesoderma. En vertebrats, es dona una segona EMT en la formació de les cèl·lules de la cresta neural a partir de la delaminació d'una petita porció de cèl·lules del tub neural. Després del procés d'EMT, les cèl·lules de la cresta neural migren i es diferencien en una àmplia gamma de teixits⁸. Però els processos d'EMT no es donen només durant el desenvolupament embrionari, s'han descrit també en estadis normals del desenvolupament d'un organisme adult, com són la formació de la placenta¹⁴ o en els ovaris de dones adultes¹⁵.

1.2.2 EMT en processos patològics

L'EMT també té lloc en certs processos patològics on també es donen canvis cel·lulars. Estudis recents mostren una gran similitud entre les vies de senyalització que regulen l'EMT en aquests processos patològics:

Re-epitelització: Durant la re-epitelització d'una ferida a la pell els queratinòcits pateixen una sèrie de canvis que recorden l'EMT: pèrdua de polaritat, alteracions del citoesquelet d'actina, trencament de contactes cèl·lula-cèl·lula i descomposició de la membrana basal. Aquestes cèl·lules canvien les seves propietats motrius i migren cap a la zona que cal re-epitelitzar. En el darrer estadi de re-epitelització, els queratinòcits recuperen els trets epitelials ¹⁶.

Fibrosi: Els principals efectors de la fibrosi en diferents òrgans, coma ara en ronyons, pulmons i fetge, són els fibroblasts intersticials que deriven de cèl·lules de l'epiteli danyat del propi òrgan i que han patit una EMT ¹⁷. L'acumulació d'aquets fibroblasts, l'excés de col·lagen i altres components de la matriu extracel·lular en regions d'inflamació crònica, condueix a un progressiu dany de teixit.

Càncer: Cada cop sembla més evident la idea que l'EMT té un rol central en la progressió tumoral. Durant aquets procés les cèl·lules del carcinoma adquireixen propietats i patrons d'expressió de gens mesenquimals que provoquen canvis fenotípics a les cèl·lules. Aquests canvis els permeten abandonar la capa epitelial organitzada i iniciar un procés metastàtic, que conduirà les cèl·lules a migrar a través del teixit hoste cap al torrent sanguini per a establir-se en llocs distants del tumor primari on podran iniciar un nou focus tumoral (Fig. 1-2). Les cèl·lules mare canceroses (CSC) són més propenses a fer metastasi i es detecten amb més freqüència al torrent sanguini i a les micrometàstasis. No obstant això, les metastasis macroscòpiques distants són amb més freqüència formades de cèl·lules canceroses epitelials diferenciades. Això pot explicar-se per la reversió de l'EMT mitjançant la MET degut a la pressió selectiva local per a la derivació de cèl·lules tumorals amb característiques més epitelials o per l'absència de senyals inductores d'EMT en el nou microambient.

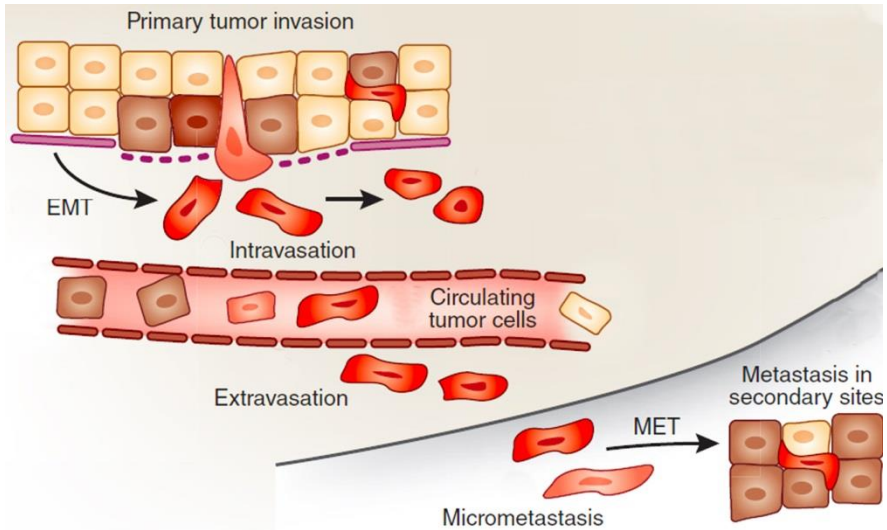


Figura I-2. Transicions entre l'estat epitelial i l'estat mesenquimal durant la progressió tumoral. En el tumor primari, les transicions epiteli-mesenquimal (EMT) i mesenquimals a epitelials (MET) contribueixen a l'heterogeneïtat intratumoral que pot influir en les respostes terapèutiques i la capacitat de fer metàstasi. Adaptat de ¹⁸.

2. SNAIL1

Snail1 pertany a la superfamília de Snail, un conjunt de gens que codifiquen per factors de transcripció del tipus dits de zinc. Tots ells comparteixen un paper evolutiu molt conservat, actuant com a repressors de l'expressió de gens implicats en el desenvolupament embrionari primerenc.¹⁹⁻²²

El primer membre d'aquesta superfamília en ser identificat va ser Snail1, durant l'anàlisi del patró de desenvolupament dors-ventral en *Drosophila melanogaster* (els embrions mutants per Snail1 no gastrulaven correctament i adoptaven forma de cargol).²¹⁻²³⁻²⁴. Posteriorment s'han trobat homòlegs de Snail1 en molts organismes evolutivament molt distants, des d'insectes com la mosca fins a mamífers com els humans o en ratolins²⁵⁻²⁶ (Fig I-3).

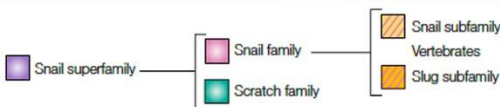
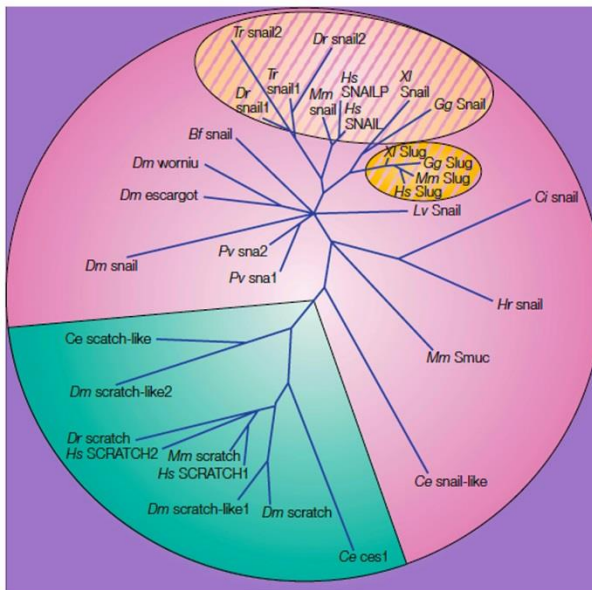


Figura I-3: Arbre filogenètic de la superfamília Snail.

Arbre filogenètic de la superfamília Snail. El requadre lila fosc inclou a tots els membres de la superfamília. El fons rosat agrupa als membres de la família Snail mentre que el fons verd destaca els membres de la família Scratch.

Les subfamílies de vertebrates Snail i Slug es mostren mitjançant una trama groc clar o groc fort respectivament. Les espècies mostrades representen membres dels protostomats: **Pv**, *Patella vulgata*; **Ce**,

Caneohabditis elegans; **Dm**, *Drosophila melanogaster*; i deuterostomats: **Bf**, *Brachyostoma floridae* (amphioxus); **Ci**, *Ciona intestinalis* i **Hr**, *Holocynthia roretzi* (ascidia); **Dr**, *Danio rerio* (peix zebra); **Gg**, *Gallus gallus*; (pollastre), **Hs**, *Homo sapiens* (home); **Lv**, *Lytechinus variegatus*; **Mm**, *Mus musculus*; **Tr**, *Takifugu rubripes*; i **XI**, *Xenopus laevis*. Pres de²⁶.

2.1 Estructura i regulació de la proteïna

Snail1 és una proteïna de 264 aminoàcids formada per dos dominis ben diferenciats que interactuen entre si ²⁷: l'aminoterminal (1-151) i el carboxiterminal (151-264) (Fig. I-4).

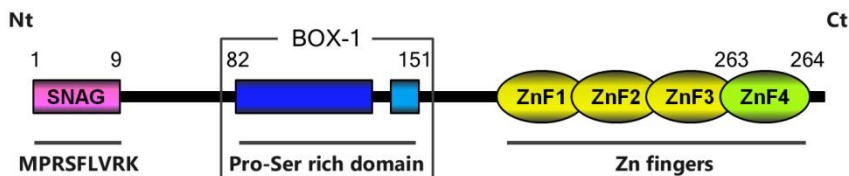


Figura I-4 Esquema de l'estructura de Snail1 en mamífers. La regió N-terminal situada entre els aminoàcids 1-151 i conté el domini SNAG necessari per a l'activitat repressora de Snail1. En aquesta regió també es troba el domini ric en serines involucrat en la regulació de la localització i l'estabilitat de la proteïna i una seqüència de export nuclear (NES). A la regió C-terminal trobem els quatre dits de zinc. Adaptat de ²⁸.

A l'extrem N-terminal trobem el domini SNAG que identifica tots els membres de la superfamília i està implicat en la regulació de l'activitat repressora de Snail1. Dins el nucli el domini repressor SNAG és necessari per a la repressió de la transcripció reclutant membres de la família de les histones desacetilases (HDAC) 1 i 2 ²⁹ i el complex repressiu Polycomb 2 (PRC2) ³⁰. La interacció d'aquestes proteïnes amb Snail1 no és directa, sinó mitjançant altres proteïnes, com ara Sin3A i Ajuba ²⁹⁻³¹. A la part central de la proteïna (dins el domini N-terminal) trobem una regió rica en serines on trobem la senyal d'export nuclear (NES), implicada en la seva localització, i una seqüència de destrucció (DB) implicada en la seva estabilitat. L'activitat repressora de Snail1 pot ser modulada per almenys dos mecanismes moleculars: per una banda, per la fosforilació en la seqüència rica en prolines i serines situades en el domini regulador, en el qual s'han descrit dos llocs de fosforilació per GSK3 β . Un d'ells està involucrat en l'export nuclear i l'altre en la seva degradació mitjançant la interacció amb la lligasa b-TrCP1 que l'ubiquitina al citoplasma ²⁷⁻³². Recentment investigadors del nostre grup han descrit una altra lligasa que interacciona amb Snail1 en línies cel·lulars i promou la seva ubiquitinació i posterior degradació pel proteosoma ³³. Cal assenyalar que Snail1 és una proteïna molt inestable amb una vida mitjana d'entre 20 a 45 min.

El domini C-terminal de la proteïna Snail1 amb quatre dits de zinc del tipus C_2H_2 , en què les dues cisteïnes i histidines coordinen l'ió de zinc i són els responsables de la unió al DNA i presenta especificitat per a les seqüències 5'-CAGGTG-3, anomenades "caixa E", presents a la zona promotora dels seus gens diana. Cal assenyalar la conservació de la funció repressora de les proteïnes Snail en l'evolució²⁵⁻²⁶⁻³⁴. A més a més, aquest domini també pot ser fosforilat per la quinasa PAK-1 retenint-la dins el nucli.³⁵

2.2 Dianes moleculars i mecanisme d'acció

Hi ha poca informació sobre els factors que controlen directament el promotor Snail1. Es coneix que la proteïna està regulada per diversos estímuls que formen una xarxa integrada i complexa de senyals a nivell transcripcional i post-transcripcional que convergeixen en la inducció de l'expressió de Snail1. Entre aquests estímuls hi ha citoquines (interleuquina-6), factors de creixement com el factor de creixement tumoral (TGF β), el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) o els factors de creixement fibroblàstics (FGFs) que transdueixen la seva senyal a través de l'activació dels seus receptors tirosina quinasa (RTKs) corresponents. També trobem les vies de senyalització de desenvolupament com Wnt, Hedgehog i Notch, així com l'oncogen H-Ras o la quinasa associada a integrines (ILK)³⁶⁻³⁷. Tots ells indueixen Snail1 en diferents contextos cel·lulars (Fig. I-5).

De totes les vies que augmenten l'expressió de Snail1, l'activada pels membres de la superfamília de **TGF β** ha estat la més ben caracteritzada, tant in vitro com in vivo: en hepatòcits de rata³⁸, en el tancament del paladar en mamífers³⁹, en cèl·lules epitelials en cultiu induint l'EMT³⁷ en cèl·lules mesotelials⁴⁰⁻⁴¹ i durant el desenvolupament de la pell en ratolí⁴². La inducció de l'expressió de Snail1 per **TGF β 1** depèn de l'activitat de PI3K i MAPK, molt probablement a través de l'activació de **Ras**³⁷⁻⁴³. Aquests resultats coincideixen amb les dades que mostren que l'expressió de Snail1 desencadena l'activació constitutiva d'Akt, una quinasa *downstream* de PI3K⁴⁴.

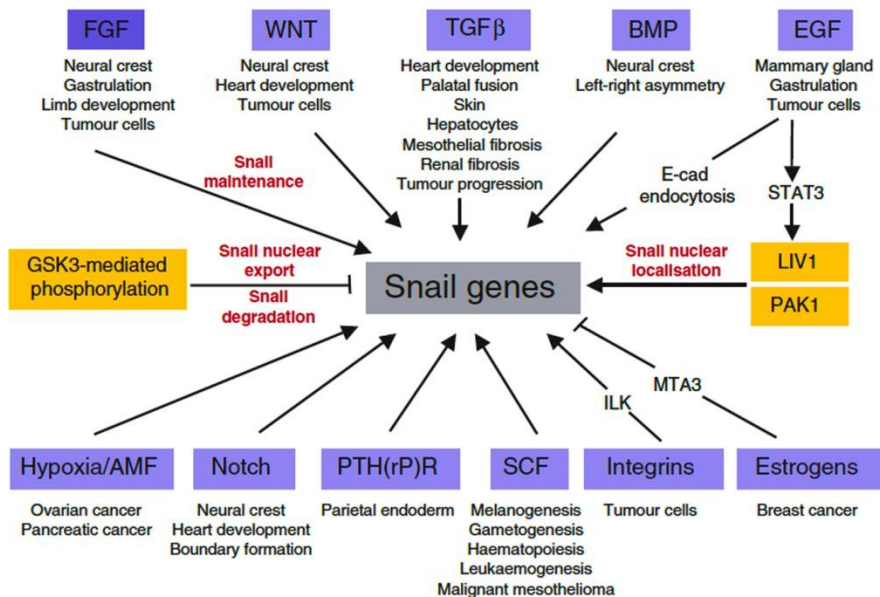


Figura I-5 Vies involucrades en la regulació de Snail1. Esquema on es mostren els diferents estímuls capaços de regular l'expressió de Snail1. A sota cada senyal s'indica el teixit o processos en els quals han estat estudiats. A més de ser estrictament regulat a nivell transcripcional, l'activitat de Snail1 també està regulada per la seva localització subcel·lular controlada, almenys per dues quinases: GSK3 i PAK1. **BMP**, proteïna morfogenètica de l'ós; **FGF**, factor de creixement de fibroblast; **ILK**, quinasa unida a integrina; **PTH(rP)R**, receptor de pèptid vinculat a l'hormona paratiroide; **TGF-β**, factor de creixement β transformant; **AMF**, factor autocrí de la motilitat; **EGF**, factor de creixement de l'epidermis; **PAK1**; quinasa activadora de p21; **SCF**, factor de cèl·lules mare. Adaptat de ⁴⁵.

Per altra banda, està demostrat que **TGFβ1** pot cooperar amb altres inductors, com **Raf** ⁴⁶, **FGF2** ³⁷, **Notch** ⁴⁷⁻⁴⁹, amb les proteïnes morfogèniques òssies (**BMPs**) ³⁸⁻⁵⁰ o amb l'oncogen **c-Myc** ⁵¹ per tal d'activar l'expressió de Snail1.

Wnt també indueix l'expressió de Snail1 suprimint l'activitat de GSK-3β, i per tant estabilitzant la proteïna de Snail1 ⁵². La unió de Wnt als receptors Frizzled i LRP5/6 inactiva la GSK3β, i dona lloc a una estabilització i acumulació de la β-catenina al nucli on pot actuar com activador transcripcional dels promotors TCF4/LEF.

Cal assenyalar, que investigadors del nostre grup han descrit com Snail1 pot controlar la seva pròpia expressió mitjançant la unió a una caixa E en el seu propi promotor ⁵³.

D'altra banda, els senyals dependents d'estrògens també estan implicats en la regulació de l'expressió de Snail1, en aquest cas, induint-ne la seva repressió transcripcional mitjançant el reclutament de **MTA3** (gen 3 associat a metàstasi) al propi promotor de Snail1. L'absència del receptor d'estrògens i/o el seu funcionament anòmal permetrien una expressió aberrant de Snail1 amb la conseqüent pèrdua de la E-cadherina i altres gens diana, com passa en molts carcinomes de mama⁵⁴.

Així doncs, veiem que diferents vies convergeixen en què Snail1 engegui l'EMT, situant-lo en una posició central en aquest procés. Cal una estricta regulació de l'expressió gènica per induir l'EMT i mantenir el fenotip migratori i per tant és essencial la cooperació entre les diferents cascades de senyalització. S'ha postulat un model que integra les diferents vies de senyalització: membres de la família TGF- β /BMP activarien els gens Snail1 i els nivells d'aquests serien mantinguts per la via FGF. Snail1 provocava la repressió de l'E-cadherina, fet que permetria que la β -catenina, estabilitzada per inducció de la via Wnt, entrés al nucli i s'unís a les proteïnes TCF/LEF-1 i activés la transcripció gènica²⁶.

Hi ha estudis que defensen que la pèrdua d'expressió de l'E-cadherina és suficient per induir EMT i metàstasi⁵⁵⁻⁵⁶ tot i que altres autors afirmen que aquesta pèrdua és necessària, però no suficient⁵⁷ i que, Snail1 ha de tenir dianes addicionals independents d'E-cadherina. Diferents experiments demostren que altres gens són regulats per Snail1, i que no es poden considerar un efecte secundari de la pèrdua d'E-cadherina, ja que la seva transfecció no és suficient per a revertir el fenotip mesenquimal a epitelial⁵⁸. Per produir-se una EMT completa, a part de la disrupció de les unions adherents, s'han de trencar els altres tipus de contactes que presenten les cèl·lules epitelials i s'han de regular altres gens relacionats amb l'adhesió cel·lular, la migració, els canvis en la forma de la cèl·lula, el moviment cel·lular i la capacitat d'invasió. L'EMT va acompanyada d'una repressió de la proliferació cel·lular i un augment de la supervivència cel·lular. S'ha constatat que Snail1 és imprescindible per a una correcta EMT, ja que regula gens implicats en tots aquests processos.

Recentment, han aparegut dos estudis d'expressió gènica induïda per Snail1, un en cèl·lules de carcinoma de còlon⁵⁹, i l'altre en cèl·lules MDCK (ronyó de gos) estables per a Snail1⁶⁰. Tot i que aquests treballs presenten poques similituds en els gens que es veuen regulats per Snail1, atribuïbles al diferent disseny experimental i la plataforma d'arrays emprada, confirmen la implicació de Snail1 en la regulació d'una gran diversitat de gens. Aquests es troben implicats en diversos processos cel·lulars, on entre d'altres cal destacar l'adhesió cel·lular, la diferenciació epitelial, el metabolisme cel·lular, el cicle cel·lular i la transducció de senyals (Fig. I-6).

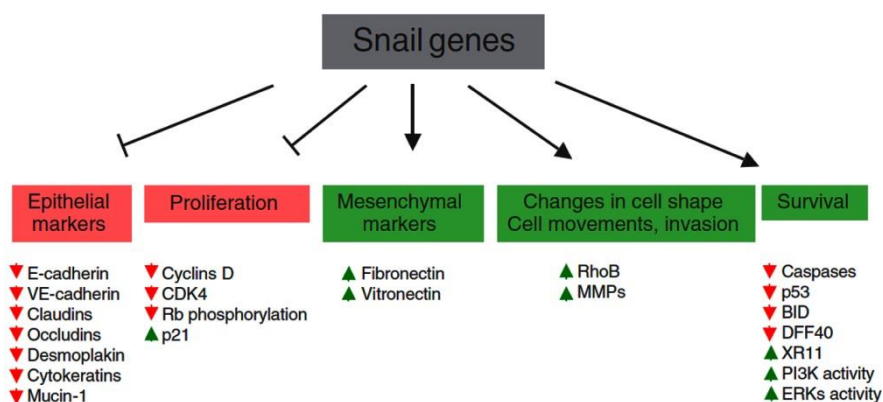


Figura I-6. Gens regulats per Snail1. L'expressió de Snail1 induïx la pèrdua de marcadors epitelials i l'adquisició de marcadors mesenquimals. A més, induïx canvis en la morfologia i en l'adquisició de motilitat i capacitat invasiva. També regula la proliferació i la mort cel·lular. No tots són regulats directament per Snail1. **BID**, Bcl-interacció agonista de la mort; **CDK**, quinasa dependent de ciclina; **DFF**, factor de fragmentació de l'ADN; **ERKs**, senyals extracel·lulars reguladores de quinases; **MMPs**, metal·loproteïnases; **PI3K**, fosfoinositol 3-quinases; **p21**, inhibidor de la quinasa dependent de ciclina; **p53**, supressor de tumor; **Rb**, retinoblastoma; **XR11**, *Xenopus* Bcl-xL homòleg. Pres de⁴⁵.

Així mateix, s'ha comprovat que Snail1 és capaç de regular els tres tipus d'unions que formen les cèl·lules epitelials: les unions adherents, les unions estretes i els desmosomes; que constitueixen el que podríem anomenar el complex "junctional" epitelial⁶¹. Les unions adherents són modificades regulant a la baixa l'**E-Cadherina**³⁴⁻⁵⁸. Respecte a les unions estretes, en cèl·lules EpH4 establiment transfectades per Snail1 s'ha observat que els nivells de proteïna **Claudina-3** i **Ocludina** són indetectables⁶¹. Tot i que la majoria de treballs han descrit que la repressió de l'Ocludina té lloc a nivell transcripcional, certs autors han

suggerit que Snail1 podria tenir també un efecte a nivell post-transcripcional ⁶².

Així doncs, Snail1 no només actua directament sobre proteïnes d'unions entre cèl·lules sinó que també és capaç de reprimir directament la transcripció d'altres marcadors epitelials, per unió a les caixes E-box presents en el promotor. La mucina epitelial **MUC-1**, que es una glicoproteïna associada a la membrana cel·lular ⁶³, i la **Citoqueratina-18**, que forma els filaments intermedis del citosquelet ⁶¹⁻⁶³ són alguns exemples. Altres dianes de Snail1 com a repressor transcripcional són el **Receptor de Vitamina D** ⁶⁴, la subunitat beta de la **Na/K- ATPasa**, relacionada amb la motilitat cel·lular ⁶⁵, **p53** ⁶⁶ i **PTEN** ⁶⁷.

La regulació a l'alça de gens induïts per Snail1 ha estat demostrat en condicions experimentals en les quals les cèl·lules en cultiu es veuen obligades a adoptar un fenotip mesenquimal; per exemple, després de llargs tractaments amb citoquines com el TGF- β o la interleuquina 6 o per la sobreestimulació dels receptors tirosina quinases ⁶⁸. S'ha observat que en estudis on s'ha expressat ectòpicament Snail1 en cèl·lules epitelials i s'ha induït una EMT completa, l'expressió de Snail1 també induïx l'expressió de gens mesenquimals. Alguns exemples de gens regulats a l'alça per Snail1 són els marcadors típicament mesenquimals: **Vimentina**, que forma els filaments intermedis del citosquelet ⁵⁸ i **Fibronectina**, que es un component de la ECM ⁶³. Aquestes dues proteïnes estan implicades en l'adhesió al substrat i són importants, doncs, per a la migració cel·lular. Altres factors que augmenten després de l'expressió de Snail1 són els factors de transcripció **LEF1 i ZEB1** ⁶³, la **p21waf/CIP**, relacionada amb el cicle cel·lular ⁶⁹ i el factor **Wnt3a**.

RhoB (membre de la família de les Rho-GTPases), també sembla ser augmentat per Snail1 ⁷⁰. També és regulen a l'alça les metal·loproteïnases de matriu (**MMP**), un grup de proteases que degraden la matriu extracel·lular i que permeten a la cèl·lula una major motilitat. En línies cel·lulars de carcinoma hepatocel·lular (HCC) s'ha trobat que els nivells de certes **MMP** incrementen després de l'expressió de Snail1, fet que estaria relacionat amb la invasió vascular i la metàstasi intrahepàtica en els tumors primaris de HCC ⁷¹. Un treball realitzat pel

nostre grup demostra que la baixada d'E-cadherina és necessària per a l'expressió d'aquests gens, ja que permet que la β -catenina i NF- κ B s'alliberin de les unions adherents, puguin translocar al nucli i activar la transcripció dels gens mesenquimals⁷².

3. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL1

Tots els esdeveniments relacionats amb l'EMT que tenen lloc en el desenvolupament embrionari, en la fibrosi i el càncer estan associats a l'activació del gen de Snail1⁷³.

3.1 Expressió de Snail1 en el desenvolupament

Durant el desenvolupament, el procés de EMT es va observar com a base d'una gran varietat d'esdeveniments de remodelació de teixit, incloent la formació del mesoderma, la formació de la cresta neural, el desenvolupament de la vàlvula del cor i la formació del paladar secundari, entre altres⁷⁴⁻⁷⁸. Donada la importància de l'EMT durant el desenvolupament embrionari, a la taula I-1 es resumeixen diverses situacions en les quals aquesta transició és fonamental perquè es duiguin a terme.

	Stage (Mouse)	Transition	
Gastrulation	6.5d	Epiblast	Three cell layers
Pre-valvular mesenchyme (Heart formation)	8d	Endothelium	Atrial and ventricular septum
Neural crest cells	8d	Neural plate	Several derivatives (bone, muscle, PNS, etc)
Somitogenesis and sclerotome differentiation	9d	Somite walls	Sclerotome
Palate formation	3.5d	Oral epithelium	Mesenchymal and epithelial cells, combined with apoptosis
Mullerian tract regression	15d	Mullerian tract	Mesenchymal cells, combined with apoptosis

Taula I-1. Exemples d'EMT durant el desenvolupament embrionari. Pres de⁷⁹.

El procés d'EMT dóna lloc als progenitors de molts teixits diferents. Per exemple, del mesoderma sorgeixen les cèl·lules que donaran lloc al teixit muscular, els ossos i al teixit connectiu. Un altre exemple són les cèl·lules de la glia i les neurones, els teixits glandulars de les suprarenals o les cèl·lules pigmentoses de l'epidermis, totes elles provenen de les cèl·lules progenitores de la cresta neural.

3.2 Snail1 en fibroblasts: fibrosi i cicatrització de la ferida

Com ja hem mencionat, durant l'embriogènesi l'EMT és necessària per a la correcta formació de diferents teixits, però d'altra banda, també està implicada en estats patològics com el càncer i la fibrosi²⁶⁻⁸⁰⁻⁸¹. Un bon

exemple és en el desenvolupament del ronyó i la fibrosi renal. Durant el desenvolupament, inicialment les cèl·lules mesenquimals es formen per EMT i, posteriorment, algunes d'aquestes cèl·lules se sotmeten a MET per formar l'epiteli de les pronefres, mesonefres i metanefres. En l'adult el procés invers (MET) està implicat en el progrés de la fibrosi del mateix òrgan. La fibrosi està considerada com l'esdeveniment principal que condueix a l'etapa terminal de la insuficiència renal en la majoria de les malalties renals progressives ⁴.

Estudis en ratolins transgènics, han demostrat que una activació aberrant de Snail1 al ronyó adult és suficient per induir EMT i desenvolupar fibrosi renal (Figura I-7). També s'ha detectat l'expressió patològica de Snail1 en àrees fibròtiques de ronyons humans ⁸². Fins fa poc es pensava que la fibrosi renal podia ser provocada per l'activació de fibroblasts intersticials que dipositaven un excés de fibres de col·lagen. No obstant això, estudis recents han demostrat que les cèl·lules epitelials tubulars renals també pateixen EMT ¹⁷. A més, Snail1 és regulat a l'alça durant l'EMT d'hepatòcits ³⁸ i cèl·lules mesotelials en pacients sotmesos a diàlisi peritoneal ⁸³.

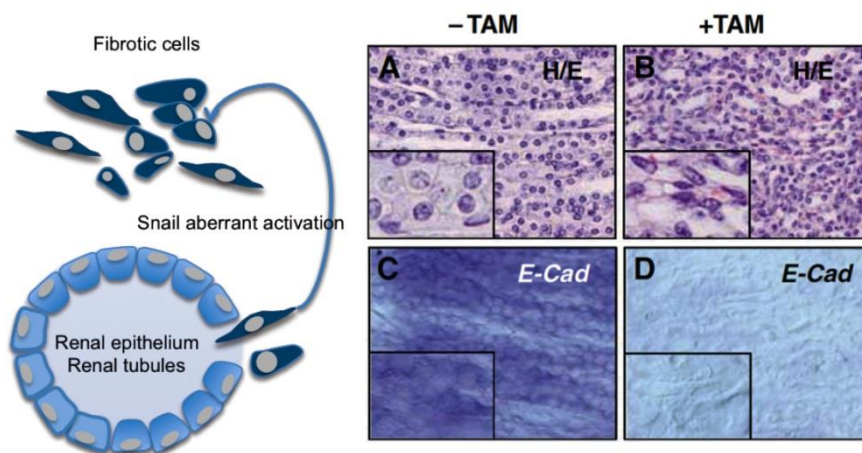


Figura I-7. En l'adult no hi ha expressió d' Snail1 i la seva activació patològica en el ronyó condueix a la fibrosi renal. L'expressió de Snail1 induïx EMT i les característiques de la fibrosi en els ratolins transgènics postnatsals. (A i B) tinció hematoxilina-eosina de seccions del ronyó. Anotar la morfologia dels fibroblasts despolaritzada i de les cèl·lules dels conductes de recollida a la regió de la medul·la dels animals tractats amb tamoxifè (TAM). Snail1 activació induïx l'expressió d'E-cadherina (C i D). Adaptat de ⁸².

La cicatrització de les ferides és el resultat d'un procés seqüencial on s'observa inflamació i infiltració de leucòcits, alliberament de citoquines i factors de creixement i la formació d'un entramat compost de col·lagen i altres molècules de la matriu on els fibroblasts entren i proliferen. En la cicatrització de les ferides, a diferència de la fibrosi, l'activació de fibroblasts s'inverteix, i tornen a un estat quiescent (no activat) un cop atenuat l'estímul que inicialment els havia activat.

En condicions normals els fibroblasts estan entre la matriu extracel·lular fibril·lar del teixit conjuntiu i expressen constitutivament vimentina. Un fibroblast normal pot activar-se, el que provoca un canvi en el fenotip. Aquests fibroblasts activats normalment es caracteritzen per tenir un gran nucli oval eucromàtic amb un o dos nuclèols, reticle endoplasmàtic rugós, i un destacat aparell de Golgi ⁸⁴ (Fig. I-8). En fibroblasts adults inactius, el reticle endoplasmàtic és més petit i el nucli aplanat i heterocromàtic. L'activació de fibroblasts és induïda per diversos estímuls que s'alliberen quan es produeix la lesió del teixit ⁸⁵. Aquests estímuls, inclosos factors de creixement com ara TGF- β , EGF, PDGF i FGF2, s'alliberen de les cèl·lules epitelials lesionades i de les cèl·lules infiltrades, com ara monòcits i macròfags. A més, els fibroblasts s'activen

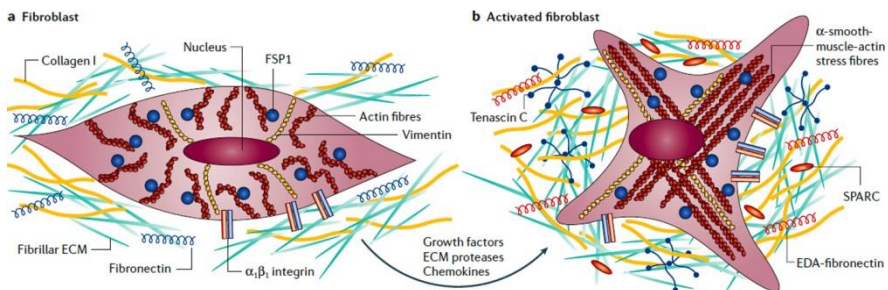


Figura I-8. Activació de fibroblasts. **A)** els fibroblasts normals estan incrustats dins de la matriu extracel·lular (ECM) del teixit conjuntiu, que es compon principalment de col·lagen de tipus I i fibronectina. Els fibroblasts interactuen amb el microambient a través d'integrines. En general, els fibroblasts apareixen com cèl·lules fusiformes amb un citosquelet d'actina prominent i filaments intermedis de vimentina. **B)** Els fibroblasts poden adquirir un fenotip activat, que s'associa amb un augment de l'activitat proliferativa i la secreció de proteïnes de la ECM com ara col·lagen tipus I, tenascina C, i fibronectina. Fenotípicament, els fibroblasts activats es caracteritzen sovint per l'expressió de α -SMA, S100A4 i l'augment dels nivells de proteïnes de degradació de la ECM, com ara la MMP-2, MMP3 i MMP9, facilitant la renovació de la composició alterada de la ECM. Pres de ⁸⁶.

per la comunicació directa cèl·lula-cèl·lula i els contactes amb els leucòcits a través de molècules d'adhesió com VCAM1⁸⁷, ICAM1 o través espècies reactives d'oxigen (ROS), pel factor de complement C1 o per la composició alterada de la ECM.

In vitro, els fibroblasts activats aïllats de les ferides o àrees fibròtiques mantenen el seu fenotip durant diversos passos, fins que entren en senescència. Investigadors del nostre grup van detectar expressió de Snail1 només en fibroblasts actius en un assaig de cicatrització de ferides

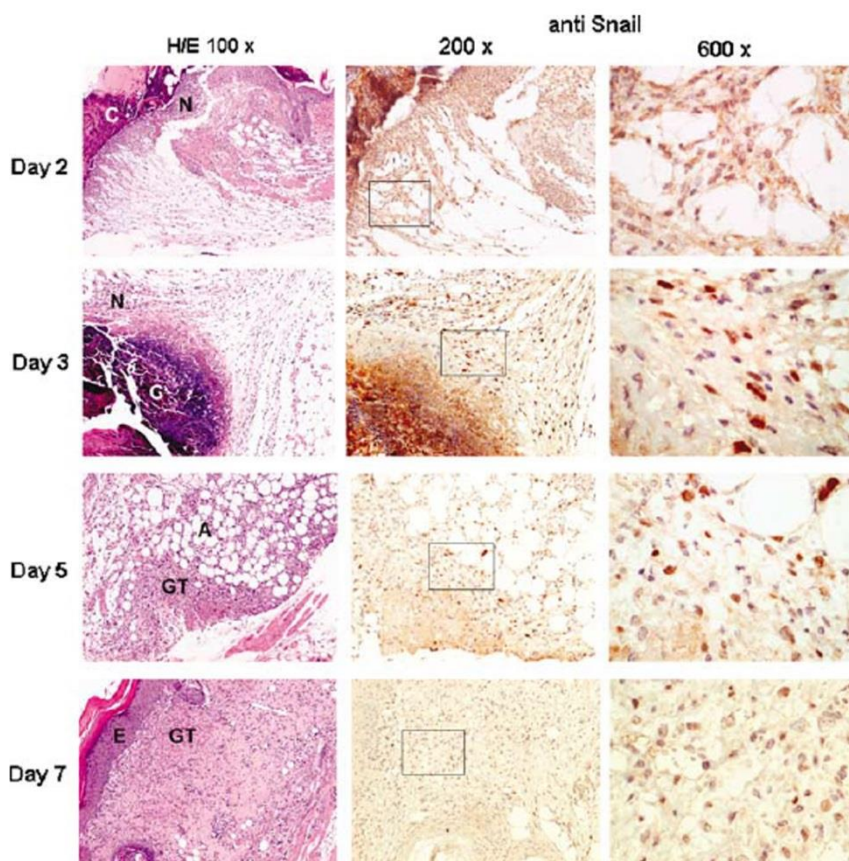


Figura 1-9. Els fibroblasts activats expressen Snail1 durant la reparació de les ferides a la pell de ratolins. Ferides de la pell de 2 mm de diàmetre es van fer asèpticament en ratolins CD-1. Teixits de la ferida es van recollir dels ratolins als 2, 3, 5 i 7 dies. Seccions de parafina van ser tenyides amb hematoxilina-eosina (panells de l'esquerra) i van ser analitzades amb l'anticòs monoclonal Snail1 (panells centrals). Ampliació de les zones indicades dels panells centrals es mostren a la columna de la dreta. **A**, teixit adipós; **C**, coàgul; **e**, epiteli; **GT**, teixit de granulació (immadur, a dia 5; madur a dia 7); **E**, epiteli **N**, neutròfils i macròfags. Pres de⁷⁷.

en ratolins ⁷⁷. En els animals, la curació de la pell és un procés ben conegut que requereix el reclutament de fibroblasts cap a la zona de la ferida ⁸⁴. Com s'observa a la Figura I-9, la immunoreactivitat per Snail1 es va detectar en fibroblasts actius que migraven durant la fase proliferativa. Quan la ferida estava curada i la pell completament re-epitelitzada els nivells d'expressió de Snail1 tornaven a ser indetectables.

3.3 Rol de Snail1 en la progressió tumoral

Com ja s'ha comentat, la funció més conservada de la proteïna Snail1 és controlar de la mobilitat cel·lular. El fet que el càncer tingui lloc per una desdiferenciació incontrolada, acompanyada de canvis en l'adherència i en les capacitats invasives d'un grup de cèl·lules, feia esperar que Snail1 jugués un paper en la progressió tumoral. En realitat, hi ha pocs treballs que abordin aquesta qüestió, en part, per l'absència d'un bon anticòs, un tema actualment superat ⁷⁷. No obstant això, d'ençà que originalment es va d'escriure que Snail1 s'expressava en cèl·lules de carcinoma humà i de ratolí i en tumors primaris invasius com a responsable de la repressió de l'E-cadherina, molts autors han estudiat amb èxit el paper de Snail1 en diferents càncers humans.

Actualment, diversos estudis amb mostres de carcinomes humans de mama, demostren que l'expressió de Snail1 i de E-cadherina es correlacionen amb les característiques patològiques dels tumors i amb el grau de diferenciació dels tumors. A més, Snail1 s'expressa en carcinomes ductals infiltrants (IDC) amb metàstasi en els ganglis limfàtics i en alguns tumors desdiferenciats amb un estat ganglionar negatiu ⁸⁸. Per exemple, Snail1 s'activa en el front invasiu de tumors a la pell induïts en ratolins. A més a més, donat que la pèrdua d'E-cadherina en tumors s'associa a un mal pronòstic ⁵⁵, Snail, com a repressors de l'E-cadherina, podria ser considerat com a un marcador primerenc de la malignitat del tumor.

La importància de Snail1 en el càncer de mama també s'ha associat amb la recurrència del tumor⁸⁹, una manifestació clínica fonamental de la progressió, i que representa la principal causa de mort per aquesta malaltia. Aquestes observacions també s'han confirmat en el càncer

d'ovari metastàtic en què la presència de Snail1 s'associa amb unes baixes taxes de supervivència ⁹⁰.

Altres estudis descriuen associacions entre els alts nivells de transcripció de Snail1 i la hipòxia, en càncer d'ovari o els baixos nivells de receptor de vitamina D en el càncer de còlon ⁶⁴⁻⁹¹⁻⁹², amb la invasió i metàstasi en el carcinoma de cèl·lules escamoses de l'esòfag ⁹³, amb la capacitat invasiva ⁹⁴ i de mal pronòstic ⁷¹ en el carcinoma hepatocel·lular. A part d'això, també s'ha detectat expressió de Snai1 a nivell de transcripció en condicions benignes com ara fibrosi tissular ⁴¹⁻⁹⁵, una sèrie de neoplàsies malignes ⁹³⁻⁹⁶, i en el teixit normal adjacent al tumor ⁹⁷.

La detecció immunohistoquímica de Snail1 s'ha documentat en una gamma de càncers incloent en carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll ⁹⁸⁻¹⁰⁰, en càncer colorectal ¹⁰¹⁻¹⁰², en els tumors neuroendocrins de l'ili ¹⁰³, en carcinoma de coll uterí ⁷⁷, d'endometri ¹⁰⁴, d'ovari ¹⁰⁵⁻¹⁰⁶, de pròstata ¹⁰⁷, de bufeta ¹⁰⁸, de la glàndula suprarenal ¹⁰⁹, de la glàndula tiroide ¹¹⁰ i de la glàndula paratiroides ¹¹¹.

Com s'ha indicat fins al moment, la relació entre Snail1 i el càncer s'ha demostrat en tumors epitelials⁷⁷. No obstant això, alguns estudis recents han revelat que Snail1 és altament expressat en sarcomes i fibrosarcomes (tumors mesenquimals). En aquest mateix estudi, mostren com en els tumors epitelials Snail1 es presenta en una distribució limitada, restringida a les cèl·lules de l'estroma col·locades a la proximitat del tumor i a les cèl·lules tumorals en les mateixes àrees. Aquests resultats demostren que Snail1 està present en les cèl·lules mesenquimals activades, que intervenen en la comunicació entre el tumor i l'estroma, suggerint que Snail1 podria promoure la conversió de cèl·lules de carcinoma de cèl·lules de l'estroma.

3.4 Snail1 en l'embrió i en l'animal adult

Estudis recents van analitzar l'expressió de la proteïna Snail1 durant diferents etapes del desenvolupament embrionari i van obtenir resultats similars descrits anteriorment on analitzaven l'mRNA de Snail1²², a més van detectar immunoreactivitat de la proteïna Snail1 en els teixits extraembrionics en les primeres etapes del desenvolupament⁷⁷ (Figura I-10a). En embrions de dia 7.5 (E7.5) l'expressió de Snail1 es restringeix al

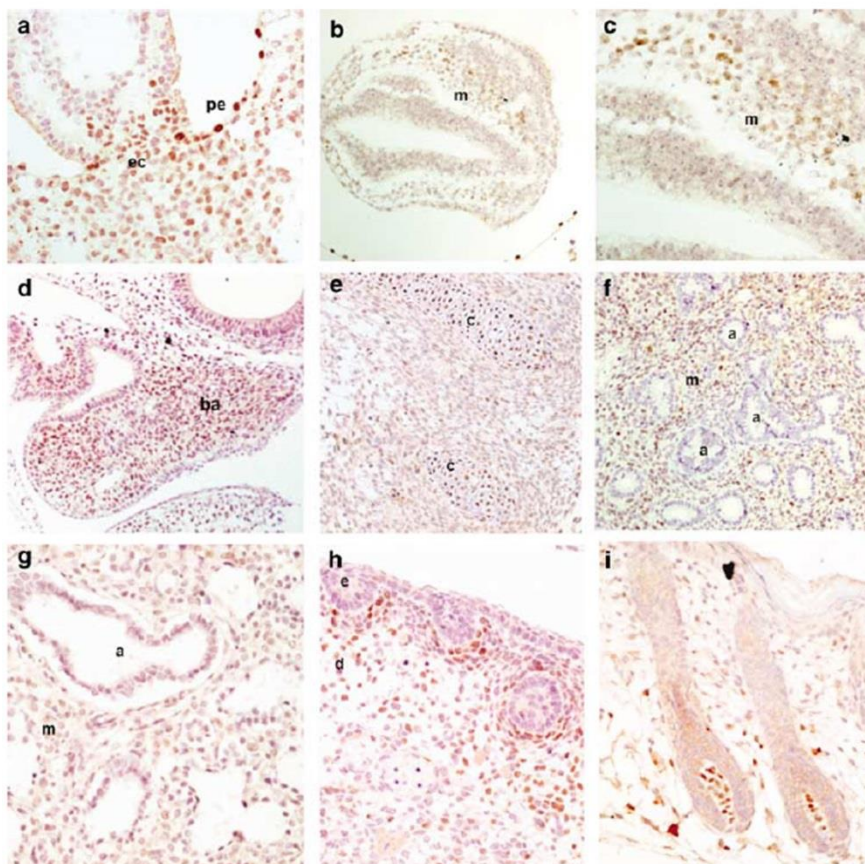


Figura I-10. Expressió de snail1 en embrions murins. Expressió de la proteïna snail1 es va detectar en els embrions a dia E7.5 (a-c), E9.5 (d) i E15.5 (e, f i h) del desenvolupament. També es van prendre mostres dels animals 2 dies després del naixement (g i i). En el panell a es mostra l'expressió de Snail1 en l'ectoplacenta (ec) i les cèl·lules de l'endoderm parietal (pe). En el panell c correspon a un augment del panell b on es mostra l'expressió snail1 al mesoderma (m). L'expressió de Snail1 en els arcs branquials (ba) es mostra en el panell d; en el cartílag (c), en el panell e; i en el mesènquima (m) de pulmó embrionari, en panell f, (a) indica els alvèols. Pres de⁷⁷.

mesoderma, i l'endoderma parietal. Al dia E9.5, es va detectar reactivitat de Snail1 en arcs branquials (Figura I-10d). En el dia E15, la immunoreactivitat va ser particularment alta en el cartílag (Figura I-10e). També es va detectar expressió de Snail1 en cèl·lules mesenquimals dels pulmons, com es mostra a la figura I-10f. Els nivells de la proteïna Snail1 van ser significativament més baixos en aquestes mateixes cèl·lules després del naixement (Figura I-10g).

Recentment, s'ha demostrat que Snail1 té un paper en la morfogènesi del fol·licle pilós⁴². En aquest treball es va detectar immunoreactivitat per Snail1 en cèl·lules mesenquimals de la dermis adjacents al bulb de pèl, però no en les cèl·lules epitelials (Figura I-10h). D'altra banda, es va detectar poca reactivitat en teixits adults i l'expressió de Snail1 es limitava a les cèl·lules mesenquimals de la papil·la dèrmica (Figura I-10i) i al cartílag⁷⁷.

4. EL RATOLÍ TRANSGÈNIC KO DE SNAIL1

Gridley et al van descriure la construcció i l'anàlisi d'una mutació que anul·lava el gen de Snail1 en ratolí ¹¹². Els embrions mutants Snail1^{del1/del1} són letals embrionaris, ja que moren durant la gestació. Els embrions mutants mostren defectes en la gastrulació i en la transició epitelial-mesènquima requerit per a la generació de la capa de cèl·lules del mesoderma. En aquests ratolins la formació de la capa de cèl·lules del mesoderma pot generar-se, tot i la retenció de l'expressió d'E-cadherina (Fig. I-11). No obstant això, moltes cèl·lules en el mesoderma dels embrions mutants retenen la polaritat apical-basal i una morfologia epi-

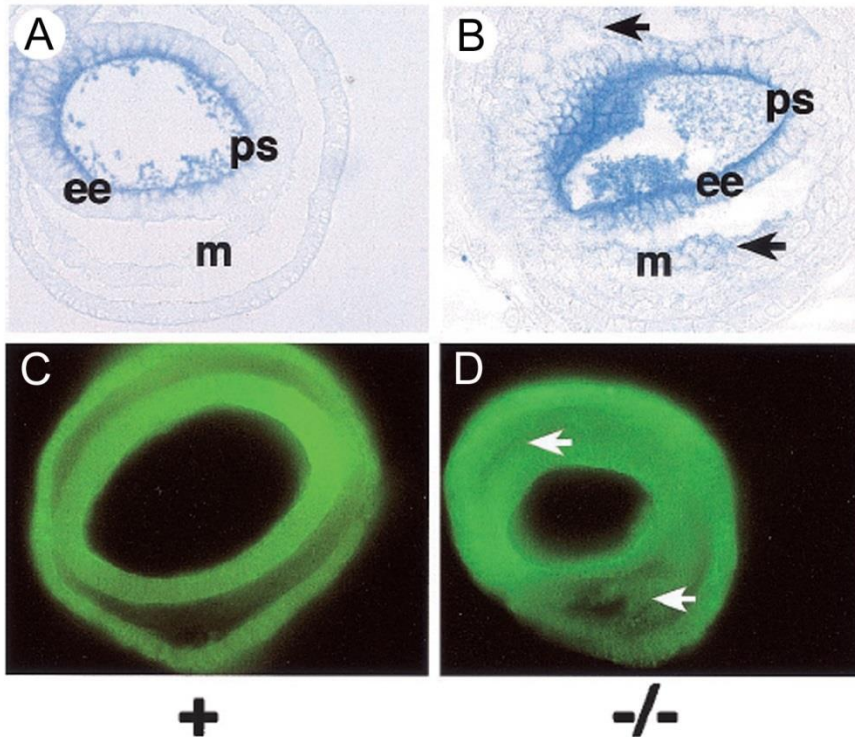


Figura I-11: L'expressió d'E-cadherina es manté en el mesoderma dels embrions mutants Snail1^{-/-}. Hibridació in situ contra l'E-cadherina de les seccions d'un embrió (A) control Snail1^{+/+} i (B) d'un mutant Snail1^{-/-}. L'expressió d'RNA de l'E-cadherina és disminuïda al mesoderma de l'embrió control (B), però l'expressió es conserva en el mesoderma del mutant Snail1^{-/-} (indicat amb una fletxa). Immunofluorescència contra l'E-cadherina de l'embrió (C) control Snail1^{+/+} i (D) mutant de Snail1^{-/-}, on l'expressió de la proteïna E-cadherina es manté en la capa del mesoderma (fletxes). ee, ectoderma embrionari; m, mesoderma; ps, línia primitiva. Adaptat de ¹¹².

telial, presumiblement a causa de la retenció de les unions adherents entre les cèl·lules del mesoderma en els embrions mutants. Els defectes fenotípics que s'observaven en els embrions *Snail1*^{del1/del1} de ratolí són sorprenentment similars als defectes observats en la gastrulació dels embrions de *Drosòphila* mutants de *Snail1*¹¹³. El gen de l'E-cadherina en *Drosòphila* s'expressa normalment en les cèl·lules epitelials de l'embrió en l'etapa de blastoderma, però és regulat a la baixa en les cèl·lules precursors del mesoderma abans de la invaginació. En els embrions de *Drosòphila* homozigots per a una mutació nul·la de *Snail1* la E-cadherina no és disminuïda i els precursors del mesoderma de la regió ventral de l'embrió retenen les unions adherents i la polaritat apical-basal¹¹³.

A més a més, s'ha constatat que *Snail* participa en altres processos que tenen lloc durant el desenvolupament, com ara la diferenciació de condrocits en ratolí, on regula l'expressió del Col·lagen tipus II i de l'agrecà¹¹⁴; la divisió asimètrica en neuroblasts¹¹⁵ i l'establiment de l'asimetria dreta-esquerra en el desenvolupament d'embrions de ratolins¹¹⁶. *Snail* també participa en la morfogènesi del pèl, expressant-se en les cèl·lules de l'epiteli que perden l'expressió d'E-Cadherina i s'invaginen per formar els bulbs fol·liculars⁴², i en el tancament del paladar, que dóna lloc a una correcta separació entre les cavitats nasal i bucal³⁹.

5. EL PÀNCREES

El pàncrees dels mamífers és una glàndula mixta, endocrina i exocrina, responsable del metabolisme de la glucosa i la digestió dels aliments. La part exocrina de l'òrgan (80% de la massa del teixit pancreàtic) està formada per les cèl·lules acinars, organitzades en unitats funcionals anomenades acinis, les cèl·lules ductals i les cèl·lules centroacinars.

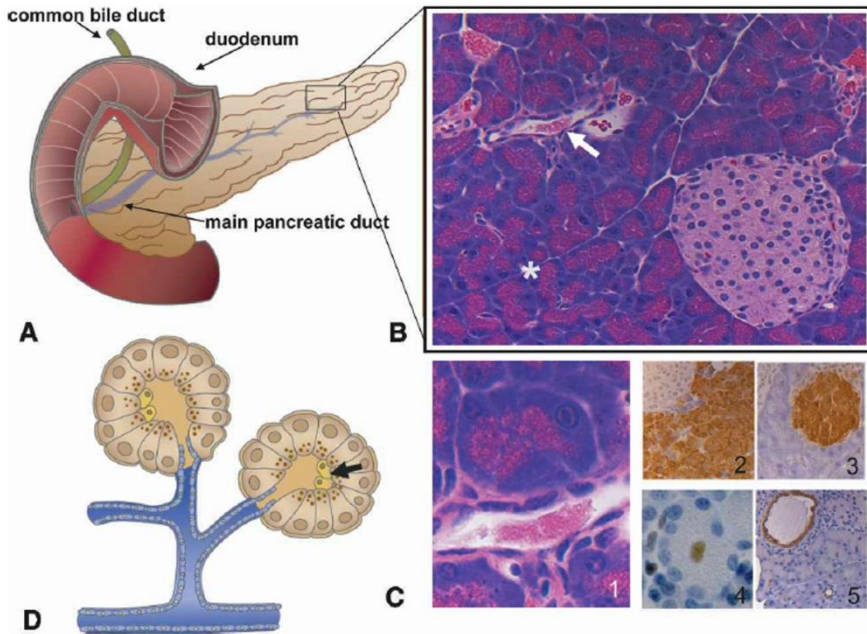


Figura 1-12: Anatomia del pàncrees. El pàncrees està format per unitats separades funcionalment que regulen dos importants processos fisiològics: la digestió i el metabolisme de la glucosa. **(A)** Anatomia macroscòpica del pàncrees que demostra la seva estreta relació anatòmica amb el duodè i el conducte biliar comú. **(B)** Els components principals del parènquima pancreàtic a un nivell histològic. A baix, a la dreta es troba un illot de Langerhans, la part endocrina del pàncrees. L'asterisc està col·locat entre els acinis, implicats en la secreció de diversos enzims digestius (zimògens) cap als ductes (indicat per la fletxa sòlida). **(C)** Imatges de diferents tincions de les seccions de teixit pancreàtic que demostren els diversos tipus de cèl·lules. **(1)** Tinció amb hematoxilina-Eosina d'unitat acinar en relació al conducte. **(2)** Tinció amb un anticòs contra l'amilasa d'un conjunt de cèl·lules. **(3)** Tinció amb un anticòs contra insulina d'un illot de Langerhans. **(4)** Tinció amb un anticòs contra Hes1 d'una cèl·lula centroacinar. **(5)** Tinció amb un anticòs contra citoqueratina 19 d'unes cèl·lules ductals (vistes aquí en secció transversal). **(D)** Representació d'una unitat acinar que mostra la relació dels conductes pancreàtics. A més es mostren les cèl·lules centroacinars (fletxa), situades entre la unió dels ductes i els acinis. Pres de ¹¹⁷.

Els acinis produeixen i secreten zimògens, que donaran lloc a la tripsina, la quimotripsina, la carboxipeptidasa, l'amilasa i la lipasa. Les cèl·lules ductals, positives per CK19, formen una xarxa de conductes responsables de portar els enzims de les cèl·lules acinars al tracte gastrointestinal. Per altra banda, la part endocrina del pàncrees la formen els illots de Langerhans, formats per les cèl·lules α i β que regulen l'ús de la glucosa per als diferents teixits de l'organisme, mitjançant la producció de glucagó i insulina respectivament¹¹⁷. (Fig. I-12)

OBJECTIUS



Caracteritzar el paper de Snail1 en el teixit adult utilitzant un model animal de ratolí KO condicional de Snail1

Apartir dels resultats inicials estudiar el paper de Snail1 en les cèl·lules mesenquimals del pàncrees (PMC), fent servir també models de cèl·lules mesenquimals en cultiu, així com el rol que exerceixen en el manteniment de les cèl·lules acinars en cultiu.

Analitzar el paper de Snail1 en els tumors de pàncrees utilitzant el model tumoral d'expressió de l'oncogen c-Myc a les cèl·lules acinars, el ratolí transgènic Ela-Myc.

OBJECTIUS

RESULTATS



1. OBTENCIÓ DEL MODEL ANIMAL: RATOLÍ KO CONDICIONAL PER SNAIL1

Per tal d'estudiar el paper de Snail1 en teixit adult en primer lloc es va obtenir un model animal. Com s'ha mencionat, Snail1 és necessari per al desenvolupament embrionari; els embrions que no expressen aquest gen no es desenvolupen correctament, ja que no gastrulen i per tant els animals no arriben a néixer ¹¹². Per evitar aquesta letalitat embrionària es va optar per generar una línia de ratolins *knock out* condicional per Snail1. Per fer-ho, es va utilitzar el ratolí generat prèviament per Gridley ¹¹⁸, un heterozigot per Snail1, el qual conté un al·lel del gen flanquejat per dues seqüències LoxP i l'altre al·lel deletat. Aquest ratolí, completament viable, es va creuar amb un ratolí que expressa, sota el promotor ubic de la β -actina, la recombinasa CRE fusionada a un receptor d'estrogen modificat que respon al tamoxifè (TAM) ¹¹⁹. Els constructes d'aquests dos animals utilitzats s'especifiquen a la figura MM-1.

D'aquests creuaments es van obtenir els ratolins *knock out* condicional per Snail1 (Fig. R-1), amb un al·lel prèviament deletat i l'altre floxejat i que expressa la recombinasa CRE. Els germans de camada amb un dels al·lells WT (*wild type*) i l'altre floxejat es van utilitzar com a controls (CT). Tots aquests animals es van genotipar per PCR; els encebadors utilitzats i un exemple de les diferents bandes obtingudes es poden observar també a la figura MM-1.

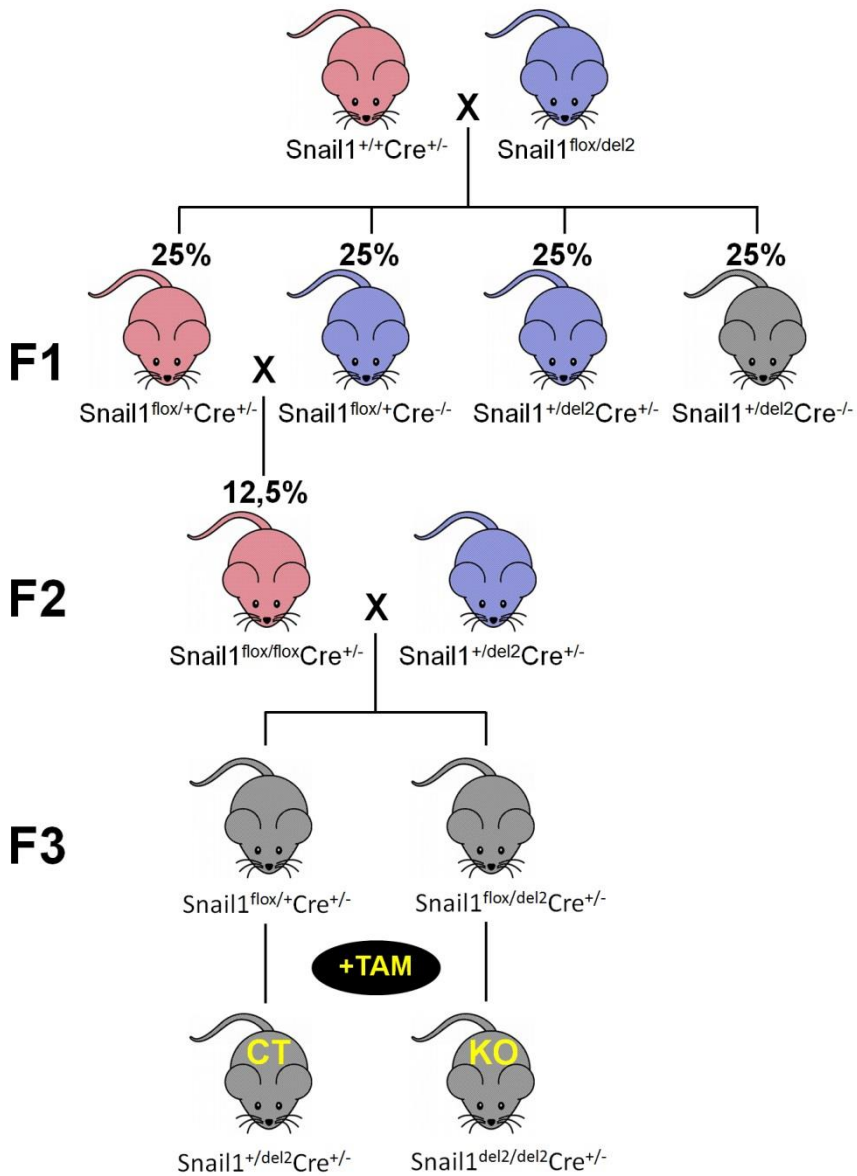


Figura R-1: Creuaments per obtenir la línia de ratolins KO condicional de Snail1. Els ratolins de color vermell representen els mascles, els de color blau representen les femelles i els de color gris representa un ratolí de qualsevol sexe. Els ratolins indicats com a CT (control) i KO (Knock Out de Snail1) són els utilitzats per l'estudi d'aquesta tesi i tots ells han estat tractats prèviament amb TAM, sinó s'indica específicament el contrari.

2. LA DELECCIÓ DEL GEN SNAIL1 EN EL RATOLÍ ADULT PROVOCA ALTERACIONS EN EL PÀNCREES.

2.1. Els ratolins KO de Snail1 presenten una dràstica disminució de pes acompanyada d'alteracions en la morfologia del pàncrees.

Un cop generada la colònia de ratolins *Knock Out* condicional per Snail1, es va procedir a delectonar el gen en qüestió. Per fer-ho, com s'ha comentat anteriorment, es van administrar quatre dosis de TAM intraperitonealment als ratolins de dos mesos d'edat, prèviament genotipats i tres setmanes més tard, se'ls va sacrificar i realitzar la necròpsia.

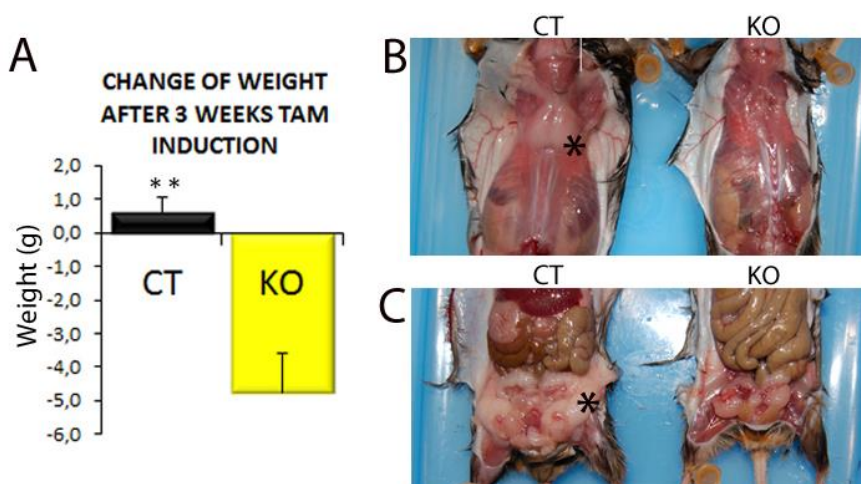


Figura R-2: Els Ratolins KO per Snail1 no presenten greix intraperitoneal ni subcutani després de l'administració de TAM. Necròpsia dels ratolins CT i KO per Snail1 tractats amb TAM als dos mesos d'edat i sacrificats tres setmanes després de la primera injecció intraperitoneal. **A)** Gràfica del canvi de pes dels animals CT i KO. La barra d'error indica la desviació estàndard dels valors dels pesos de 6 animals analitzats. Dos asteriscs indiquen $p < 0,05$. **B)** Imatge d'un animal CT i un KO: el greix subcutani és indicat amb un asterisc en l'animal CT. **C)** Imatge d'un animal CT i un KO el greix intraperitoneal és indicat en el CT amb un asterisc.

El primer que es va observar va ser una diferència significativa en el pes dels animals KO respecte dels CT. Tres setmanes després de la primera administració de TAM els ratolins als qui s'havia delectonat el gen de Snail1 (KO) mostraven una pèrdua del 15% del seu pes global comparat

amb un guany del 2% en els germans de camada CT (Fig. R-2A). Aquesta pèrdua de pes en els animals KO es correlacionava amb una falta de greix subcutani (Fig. R-2B) i una falta de greix intraperitoneal (Fig. R-2C).

Per altra banda, els ratolins KO tenien els intestins plens de menjar però no presentaven defecacions dures a colon i recte a diferència dels CT. En els KO, les femtes són d'un color més clar i de poca consistència (Fig. R-3A), el que suggereix una possible disfunció en l'absorció de lípids en el tracte digestiu d'aquests animals.

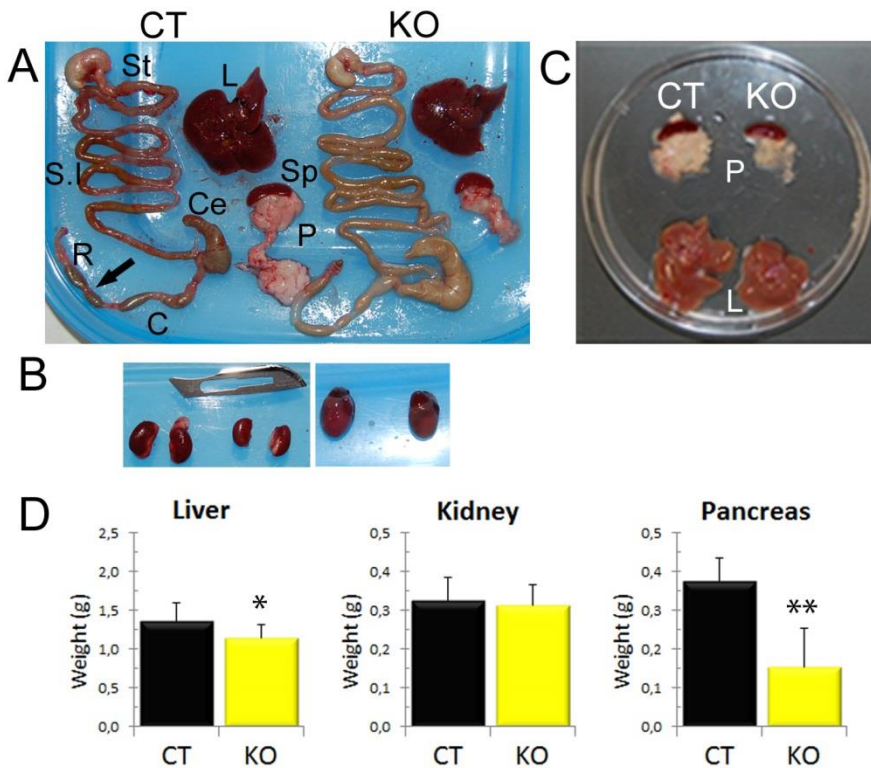


Figura R-3: El pàncrees dels ratolins KO per Snail1 presenten una pèrdua de pes comparat amb els CT. A) Imatge detalla de la necròpsia realitzada als ratolins CT i KO; **St**, Estomac; **L**, fetge; **S.I.**, Intestí prim; **Sp**, melsa; **Ce**, cec; **P**, pàncrees; **R**, recte; **C**, colon. **B)** Imatge dels ronyons a l'esquerra i del cor a la dreta dels ratolins CT i KO. **C)** Imatge amplificada del pàncrees i el fetge dels ratolins CT i KO. **D)** Pes del fetge, ronyons i pàncrees de les imatges de A, B i C. La barra d'error indica la desviació estàndard dels pesos de 6 animals analitzats. Un asterisc indica $p < 0,1$; dos asteriscs indiquen $p < 0,05$

En analitzar macroscòpicament els diferents òrgans el més destacat va ser la dràstica pèrdua del teixit pancreàtic en els ratolins KO de Snail1 (Fig. R-3A i C). A simple vista, aquests pàncrees eren notablement més petits i el seu pes significativament inferior que el dels ratolins CT (Fig. R-3D). El pes del fetge també era lleugerament més petit que en els animals KO. A la resta d'òrgans, com els ronyons, cor o melsa no es van observar diferències significatives en la mida o el pes (Fig. R-3).

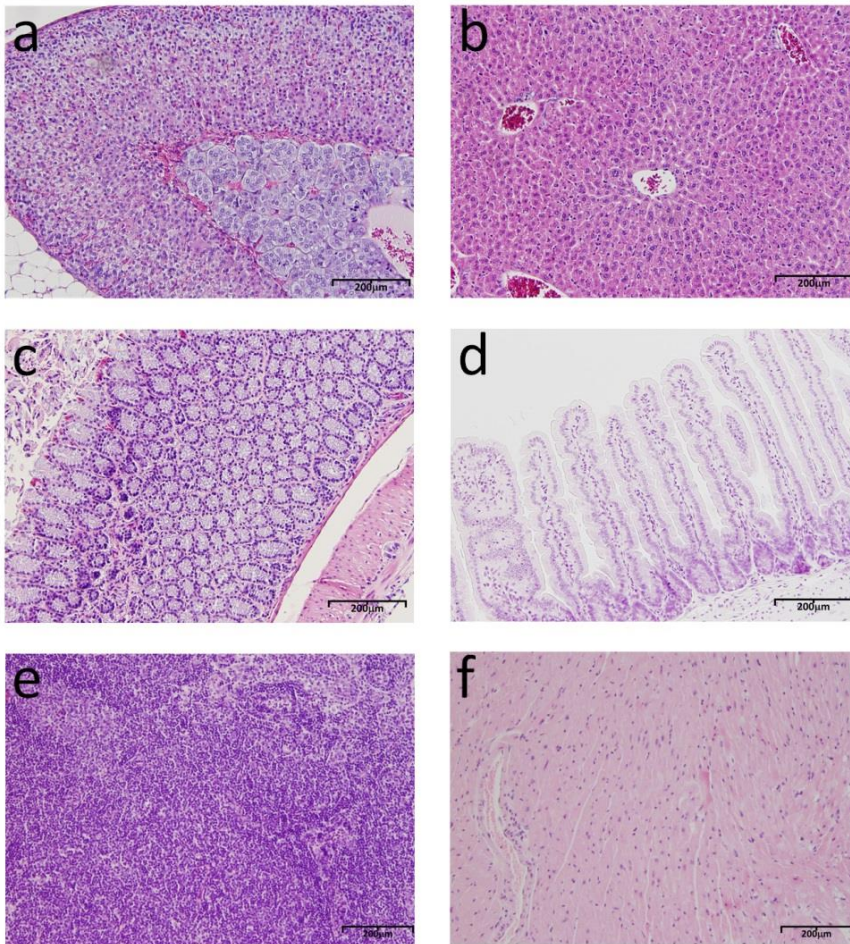


Figura R-4: Els ratolins KO de Snail1 no presenten anomalies a nivell histològic en el ronyó, el fetge, el colon o l'intestí prim. Tinció amb hematoxilina-eosina dels talls histològics d'un ratolí KO per Snail1 induït amb TAM als 2 mesos d'edat i sacrificat 3 setmanes després. Els talls pertanyen: **a)** ronyó; **b)** fetge; **c)** colon; **d)** intestí prim; **e)** melsa; **f)** cor. L'escala gràfica indica 200µm.

Tanmateix, tot i no mostrar diferències a nivell macroscòpic es va realitzar una tinció amb hematoxilina-eosina dels talls histològics de diferents òrgans, per tal de descartar diferències. No es van observar anomalies morfològiques en ronyons, fetge, intestí prim, colon, melsa ni cor dels ratolins KO de Snail1 (Fig. R-4).

La falta de greix intraperitoneal i subcutani sumat a la presència de defecacions greixoses al colon i recte són un conjunt de trets que apunten a una incorrecta digestió lipídica en els animals KO.

2.2 Els ratolins KO de Snail1 tenen alterada la funció exocrina del pàncrees.

Per tal de seguir amb la caracterització del ratolí KO de Snail1 es va realitzar una analítica del sèrum d'aquests animals (Fig. R-5). Per determinar les possibles alteracions de les funcions dels òrgans implicats en la digestió dels aliments, així com detectar qualsevol anomalia a nivell sistèmic.

Es varen analitzar la lipasa i l'amilasa, dos enzims digestius secretats per les cèl·lules acinars del pàncrees¹¹⁷, implicats en la hidròlisi dels greixos i dels carbohidrats respectivament. A les analítiques del sèrum dels ratolins KO es va detectar una disminució significativa de la lipasa i amb menys mesura de l'amilasa al comparar-les amb els valors dels ratolins CT. Els resultats d'aquests dos enzims revelen una alteració de la funció exocrina del pàncrees. Per altra banda, els nivells de glucosa, indicadors de la funció endocrina del pàncrees, no mostren diferències entre els valors dels animals CT dels KO (Fig. R-5).

També es va analitzar els nivells de l'alanina transaminasa (ALT), enzim produït per les cèl·lules del fetge, per avaluar la correcta funció hepàtica. Un altre enzim que es troba al fetge és la fosfatasa alcalina (ALP), produïda a les vies biliars i als ossos, també és utilitzada per detectar dany hepàtic. Aquest últim es va trobar elevat en les analítiques dels animals KO, però els valors de les transaminases descarten un problema hepàtic en aquests ratolins.

Tot i no trobar diferències significatives en el pes ni en la histologia dels ronyons, es va analitzar els valors de creatinina (CRE), un compost orgànic generat com a subproducte del metabolisme dels músculs que és filtrat pel ronyó i excretat amb l'orina. Els valors de creatinina en sèrum són l'indicador més comú de la funció renal. Els valors de creatinina, similars en CT i KO descarten un problema renal.

Per últim es van analitzar diferents minerals essencials, implicats en nombrosos processos vitals per a les cèl·lules; els nivells de calci (Ca^{2+}), sodi (Na^+), potassi (K^+), i fòsfor (P) tampoc es trobaven alterats al comparar les mostres de les dues poblacions, CT i KO per Snail1.

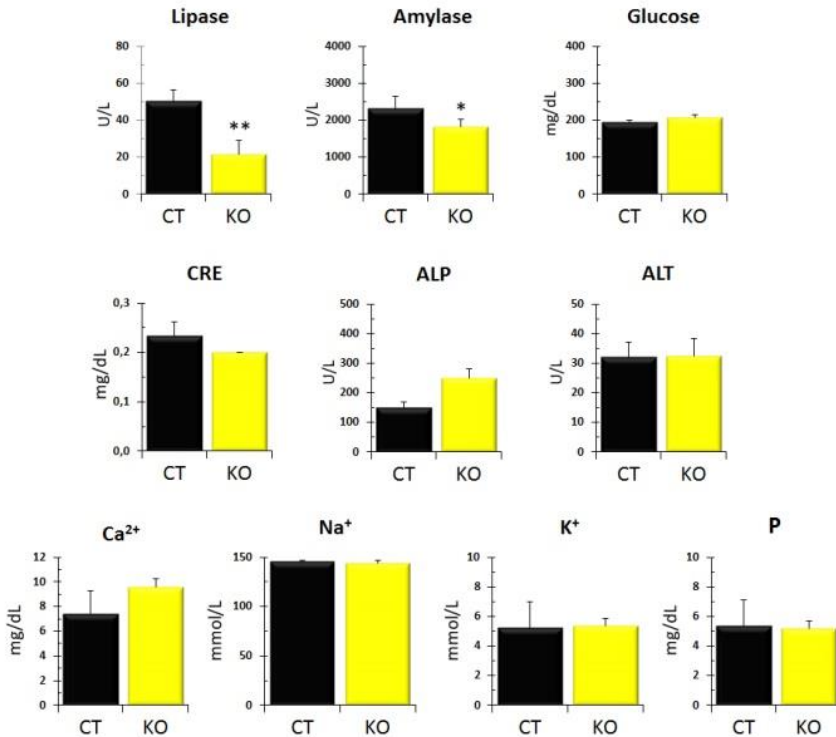


Figura R-5: Els ratlons KO de Snail1 tenen alterada la funció exocrina del pàncrees. Analítica de diferents paràmetres de la funció exocrina del pàncrees (lipasa i amilasa), de la funció endocrina (glucosa), de la funció renal (CRE; creatinina), de la funció hepàtica (ALP; fosfatasa alcalina i ALT; transaminases) i de diferents electròlits (Ca^{2+} ; calci, Na^+ ; sodi, K^+ ; potassi, P; fòsfor) del sèrum dels animals CT i KO. La barra d'error indica la desviació estàndard de les analítiques de 6 animals per a la funció pancreàtica, 3 animals per a la funció renal i hepàtica i 2 animals per als diferents electròlits. Un asterisc indica $p < 0,1$; dos asteriscs indiquen $p < 0,05$.

2.3 Els ratolins KO de Snail1 presenten defectes en la histologia del pàncrees.

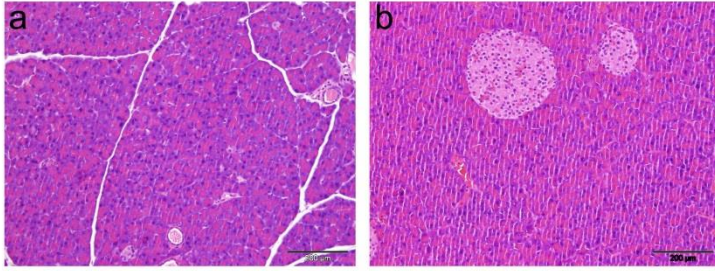
Fins ara s'ha demostrat que la deleció del gen de Snail1 en el teixit murí adult provoca dràstiques repercussions a nivell pancreàtic. Tant la mida, el pes com la funció exocrina del pàncrees es mostren seriament compromeses en els ratolins KO per Snail1. Per tal d'esbrinar si la manca d'expressió del gen implicat en la morfogènesi de l'embrió podia també estar implicat en la morfologia cel·lular en el pàncrees adult es va analitzar histològicament aquest teixit. A la figura R-6g i 6h s'observa que tres setmanes després de l'administració de TAM el pàncrees dels ratolins KO presentaven una completa desorganització del teixit exocrí caracteritzada per la falta de cèl·lules acinars; per contra, s'observaven un gran nombre de cèl·lules adiposes.

Per tal d'analitzar en detall aquesta cinètica de desestructuració del teixit pancreàtic es va realitzar un estudi de la histologia dels pàncrees KO obtinguts a diferents temps després de l'administració de TAM (Fig. R-6). Tan sols una setmana després de la primera administració de TAM la histologia dels pàncrees dels ratolins KO ja es veia afectada en compararla amb els talls histològics dels pàncrees CT (Fig. R-6a i 6b). La tinció amb hematoxilina-eosina mostrava que els pàncrees KO presentaven una desorganització de la part exocrina: els acinis s'observaven menys compactes amb una pèrdua parcial de la seva estructura (Fig. R-6c).

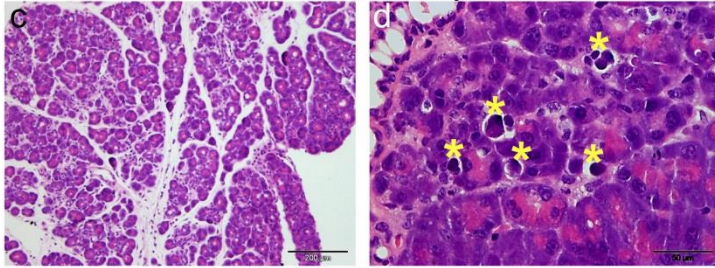
Després de dues setmanes aquests pàncrees havien perdut aproximadament el 50% de les cèl·lules acinars que inicialment formaven el teixit exocrí (Fig. R-6e) i en canvi es començaven a observar alguns

Figura R-6: Els ratolins KO de Snail1 pateixen una pèrdua de la part exocrina del pàncrees acompanyada d'una aparició de cèl·lules adiposes en el teixit pancreàtic. Imatges d'una tinció amb hematoxilina-eosina de talls histològics de: (a, b) pàncrees d'animals CT, tres setmanes després de l'administració de TAM; (c, d) pàncrees d'un animal KO una setmana després de l'administració amb TAM, els asteriscs grocs indiquen nuclis apoptòtics; (e, f) pàncrees d'animals KO dues setmanes després de l'administració de TAM; (g, h) pàncrees d'animals KO tres setmanes després de l'administració de TAM; (i, j) pàncrees d'animals KO un mes després de l'administració de TAM. L'escala gràfica indica: 200µm a (a-c,e,g,i), 100µm a (f,h,j) i 50 µm a (d)

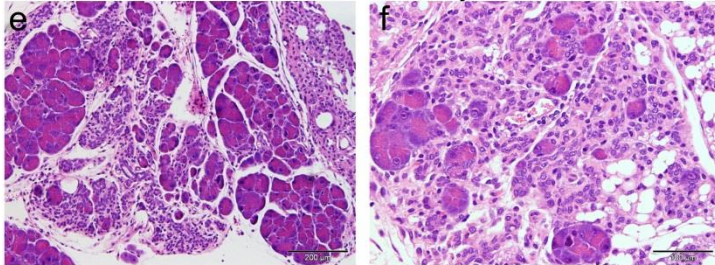
CT



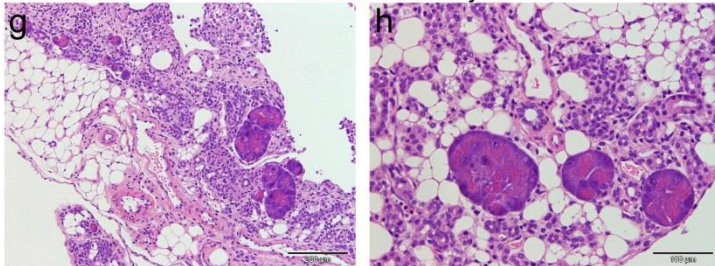
KO one week after TAM injection



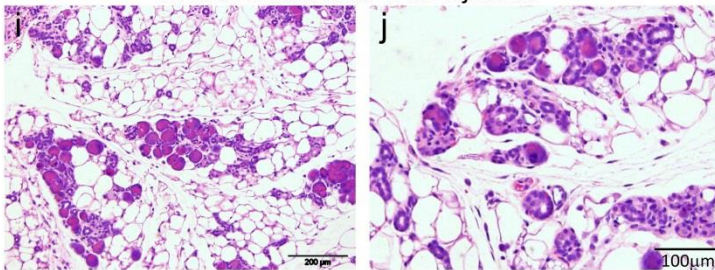
KO two weeks after TAM injection



KO three weeks after TAM injection



KO four weeks after TAM injection



adipòcits (Fig. R-6f). Tres setmanes després de l'administració de TAM, molt poques eren les cèl·lules acinars que es podien observar (Fig. R-6g). El que sí es va observar, és el notable increment d'adipòcits (Fig. R-6h). Quatre setmanes després de l'administració de TAM aquests adipòcits havien reemplaçat completament la part exocrina del pàncrees. (Fig. R-6i i 6j)

Per tant, la falta de Snail1 provocava que els ratolins KO patissin una pèrdua progressiva de les cèl·lules acinars, acompanyada d'una progressiva aparició de cèl·lules adiposes que acabaven substituint el teixit pancreàtic exocrí. Amb aquestes dades podem afirmar que Snail1 està fortament implicat en l'homeostasi d'aquest òrgan i que la seva presència és necessària per al manteniment de les cèl·lules acinars.

Tot i la massiva pèrdua de la fracció exocrina observada en els ratolins KO per Snail1, la fracció endocrina no es veu alterada. La tinció amb hematoxilina-eosina mostra com l'estructura dels illots de Langerhans es manté intacta en tots els temps analitzats fins i tot al cap de quatre setmanes després de l'administració de TAM (Fig. R-7A), tot i estar envoltada d'un gran nombre de cèl·lules lipídiques. Per confirmar la correcta organització de les cèl·lules dels illots es va realitzar una cotinció de la insulina i el glucagó, marcadors de les cèl·lules β i α respectivament. La figura R-7C mostra com els illots KO conserven una correcta organització de les cèl·lules α i β confirmant la correcta arquitectura de la fracció endocrina en els ratolins KO. Això confirma l'anàlisi de la glucèmia en sang abans i després de 4 h de dejú, que no mostra diferències respecte a la dels animals CT, assenyalant que la funció endocrina és correcta (Fig. R-7B).

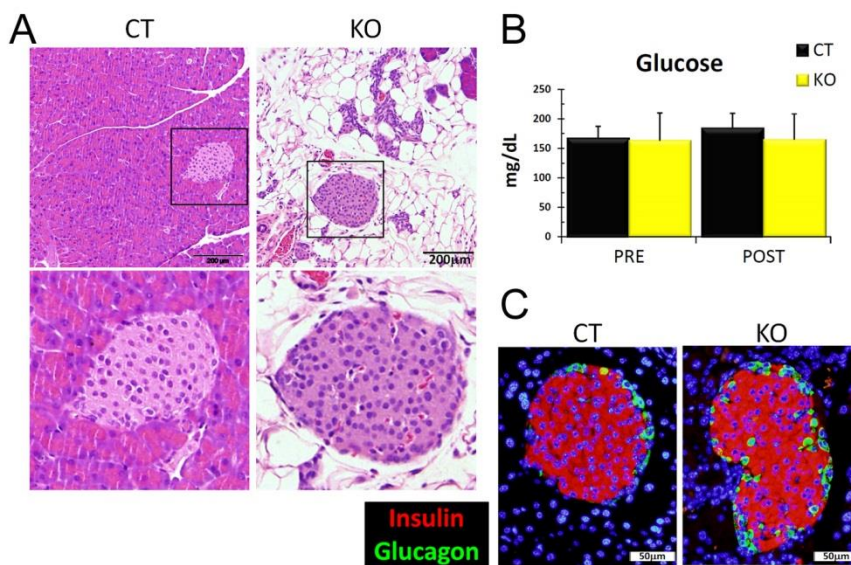


Figura R-7: La part endocrina del pàncrees no es veu alterada per la falta de Snail. (A) Tinció amb hematoxilina-eosina dels talls histològics del pàncrees CT i KO. A sota imatge amplificada dels illots de Langerhans de les respectives imatges superiors. L'escala gràfica indica 200µm. (B) Gràfica dels nivells de glucosa en sang abans (PRE) i després (POST) de 4 hores de dejú. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels valors obtinguts de 10 animals CT i 10 animals KO diferents. (C) Cotinció amb anticossos contra insulina (vermell) i Glucagó (verd) dels talls histològics dels illots de Langerhans d'un animal CT i un animal KO. L'escala gràfica indica 50µm.

D'altra banda, la tinció amb hematoxilina-eosina revelava una setmana després de la deleció del gen de Snail1 una alta concentració de nuclis apoptòtics de les cèl·lules acinars (Fig. R-6d). Per tal de confirmar-ho, es va realitzar una IHQ (immunohistoquímica) utilitzant un anticòs contra Caspasa-3 activa, un marcador de cèl·lules apoptòtiques¹²⁰. Es pot observar a la figura R-8 (d-i) com una setmana després de la deleció del gen de Snail1 moltes cèl·lules amb fenotip acinar pateixen apoptosi. Aquest gran nombre de cèl·lules apoptòtiques disminueix dràsticament a la segona setmana després de l'administració de TAM, com s'observa a la figura R-8 (j-l), on només unes poques cèl·lules són positives per caspasa-3 activa.

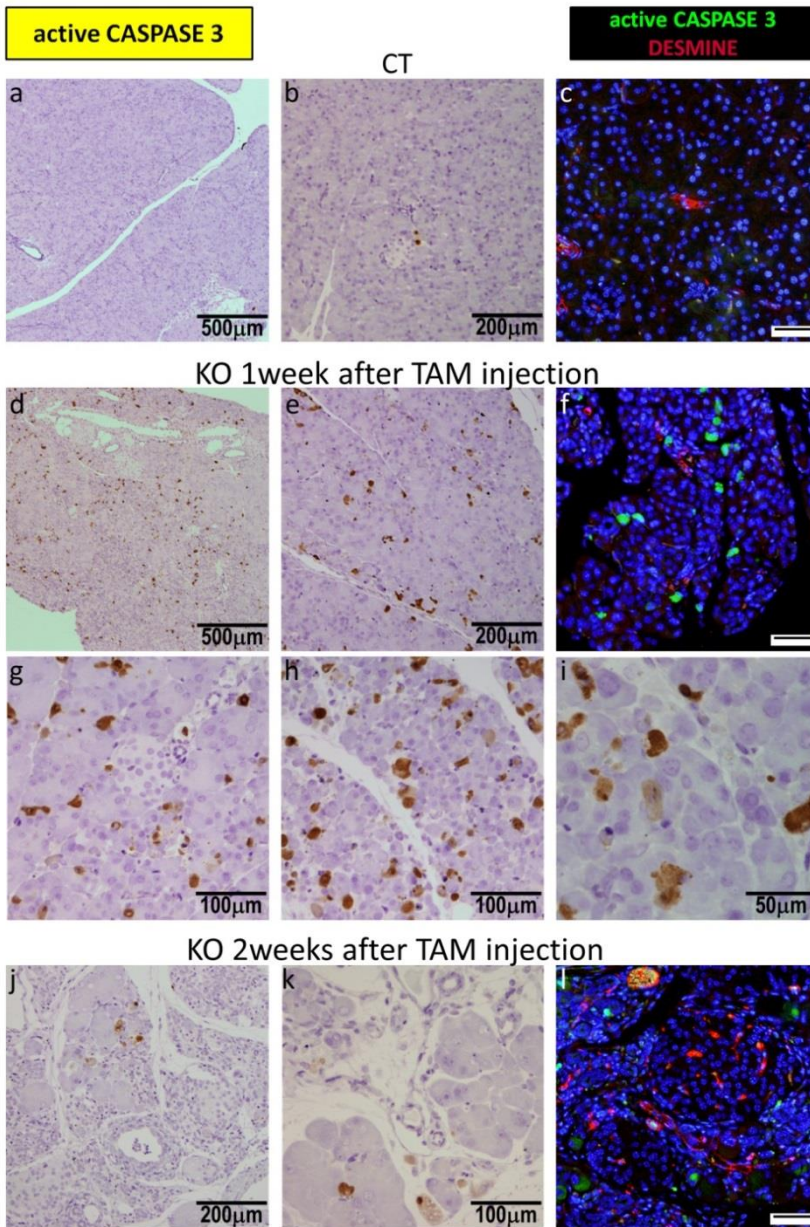


Figura R-8: La deleció del gen de Snail1 induïx apoptosi als pàncrees dels ratolins KO. IHQ contra caspasa 3 activa dels talls histològics dels pàncrees de: (a i b) ratolins CT; (d, e, g-i) ratolins KO 1 setmana i (j i k) 2 setmanes després de l'administració de TAM. Cotinció amb l'anticòs caspasa-3 activa (verd) i desmina (vermell) dels talls histològics dels pàncrees de: c) ratolins CT; f) ratolins KO 1 setmana i l) 2 setmanes després de l'administració de TAM. L'escala gràfica indica 50 µm.

Tanmateix, es pot observar la baixa o insignificant proporció de cèl·lules apoptòtiques presents en els pàncrees CT, tot i l'administració de TAM (Fig. R-8 (a-c)). Amb aquesta tinció es confirma que la desestructuració cel·lular que pateixen els pàncrees dels ratolins KO és a causa, en gran mesura, de l'elevat nombre de cèl·lules apoptòtiques observades una setmana després de la deleció del gen de Snail1. Es descarta que les cèl·lules apoptòtiques siguin cèl·lules mesenquimals del pàncrees, ja que ni a la primera setmana (Fig R-8f) ni a la segona setmana (Fig R-8l) després de l'administració de TAM, s'observa cotinció de caspasa-3 activa i desmina.

Per tal d'identificar quines eren les cèl·lules que patien apoptosi en els pàncrees dels ratolins KO es va realitzar una cotinció amb caspasa-3 activa, amilasa, marcador de cèl·lules acinars i CK19, marcador per excel·lència de les cèl·lules ductals (Fig. R-9, R-10). Els pàncrees dels ratolins KO mostraven, una setmana després de la deleció del gen de Snail1, col·localització de la caspasa-3 activa i de l'amilasa, confirmant que les cèl·lules apoptòtiques que s'observaven eren cèl·lules acinars. Per contra, no es va detectar col·localització del marcador d'apoptosi amb CK19, confirmant la resistència de les cèl·lules ductals a la deleció del gen de Snail1 (Fig. R-9).

Al realitzar la mateixa cotinció en seccions histològiques de pàncrees de ratolins KO sacrificats dues setmanes després de l'administració de TAM, es va observar com les cèl·lules positives per caspasa-3 activa eren també cèl·lules acinars; en aquest cas, i tot i ser clarament identificades com a cèl·lules acinars, no s'observava col·localització, ja que les zones positives per caspasa dins les cèl·lules ja no ho eren per amilasa. Com en la primera setmana després de la deleció del gen de Snail1, al cap de dues setmanes, no es va detectar cap cèl·lula ductal apoptòtica, ja que no es va observar col·localització de caspasa-3 activa amb CK19 (Fig.R10).

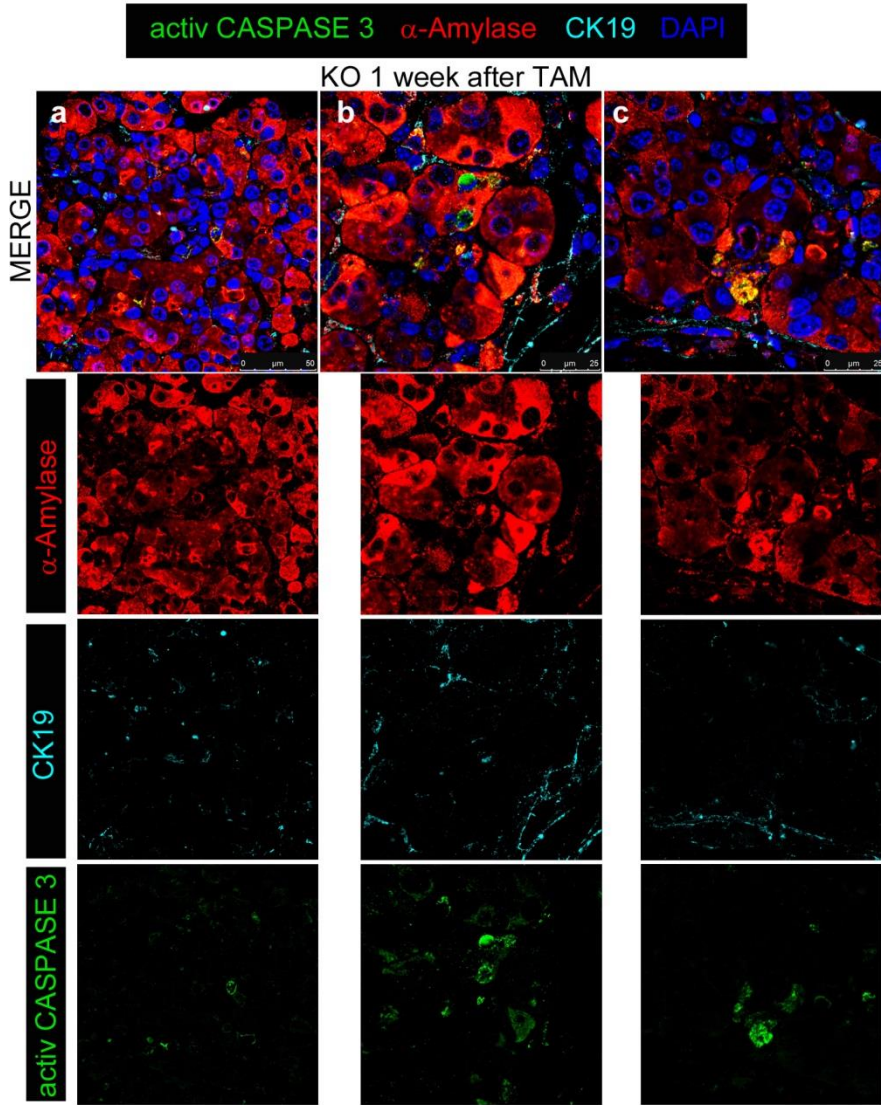


Figura R-9: La deleció del gen de Snail1 induïx apoptosi de les cèl·lules acinars dels ratolins KO. Cotinció contra caspasa 3 activa (verd), a-amilasa (vermell) i CK19 (turquesa) dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins KO una setmana després de l'administració de TAM. (a-c) *merge*; A sota de cada imatge, les imatges desglosades de cada anticòs. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

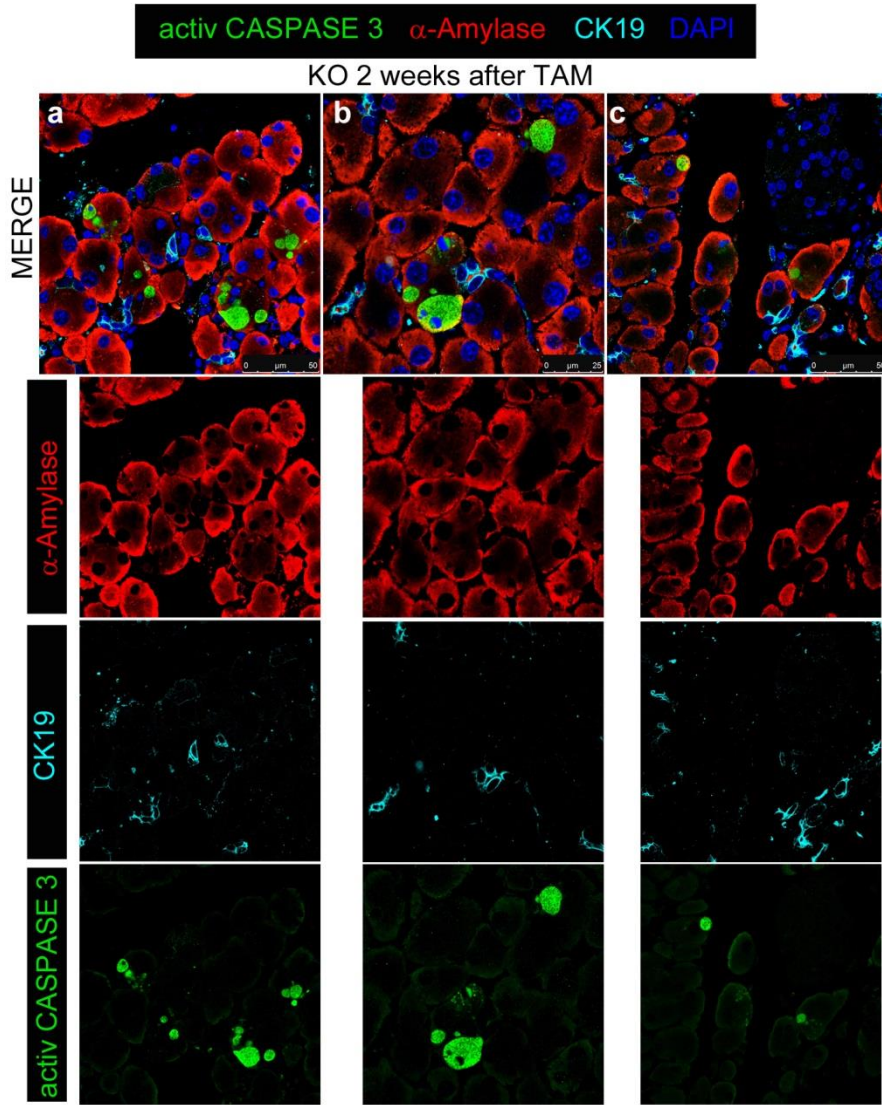


Figura R-10: La deleció del gen de *Snail1* induïx apoptosi de les cèl·lules acinars dels ratolins KO. Cotinció contra caspasa 3 activa (verd), α-amilasa (vermell) i CK19 (turquesa) dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins KO 2 setmanes després de l'administració de TAM. (a-c) *merge*; A sota de cada imatge, les imatges desglosades de cada anticòs. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

D'altra banda, es va realitzar una IHQ contra amilasa per visualitzar específicament les cèl·lules acinars. D'aquesta manera es va poder observar com aquestes cèl·lules, positives per amilasa, disminuïen dràsticament dues setmanes després de la deleció del gen de Snail1 (Fig. R-11A-B). L'anàlisi per western blot dels extractes totals dels pàncrees dels ratolins CT i KO, dues setmanes després de l'administració de TAM,

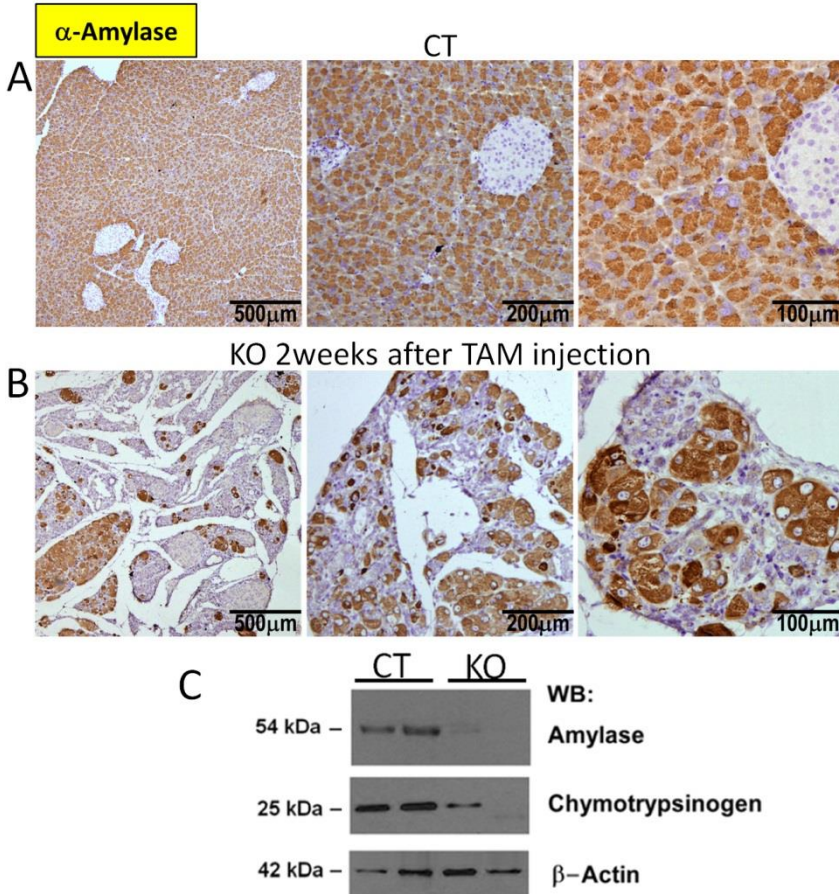


Figura R-11: Els pàncrees dels ratolins KO presenten una ràpida pèrdua de les cèl·lules acinars. Anàlisi de l'expressió d'amilasa dels pàncrees dels ratolins CT i KO 2 setmanes després de l'administració de TAM. **A)** IHQ contra l'anticòs α -amilasa dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins CT. **B)** IHQ contra l'anticòs α -amilasa dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins KO 2 setmanes després de l'administració de TAM. **C)** WB dels extractes totals dels pàncrees CT i KO on s'analiza l'expressió de l'amilasa i el quimotripsinogen, la β -actina és utilitzada com a control de carrega. L'escala gràfica indica la mida indicada.

revela que no únicament disminueix l'expressió de l'amilasa als pàncrees KO, sinó també altres enzims produïts per les cèl·lules acinars com el quimotripsinogen (Fig. R-11C).

Així, es confirmava que la falta de Snail1 al pàncrees alterava la seva morfologia i produïa una pèrdua de les cèl·lules acinars i la conseqüent disminució de la funció exocrina, detectada als ratolins KO.

Per contra, la tinció amb CK19, marcador de les cèl·lules ductals (Fig. R-12A), confirma que la majoria de cèl·lules epitelials presents en el pàncrees dues setmanes després de l'administració de TAM, són cèl·lules ductals (Fig. R-12B).

Així doncs, es pot dir que les cèl·lules ductals són més resistents a la falta d'expressió de Snail1; fins i tot tres setmanes després de l'administració de TAM, quan s'han perdut la gran majoria de cèl·lules acinars i el desestructurat teixit exocrí és poblat per noves cèl·lules lipídiques, encara es pot observar presència de cèl·lules ductals (Fig. R-12C).

Es va analitzar també la recuperació d'aquest òrgan a temps tardans. Es va repetir l'experiment tractant els ratolins amb TAM als dos mesos d'edat i sacrificant-los vuit setmanes més tard per tal d'analitzar la histologia d'aquests pàncrees. En aquest experiment també es va tractar de manera similar els ratolins CT sense detectar anomalies en la histologia de la fracció exocrina en aquests ratolins. Com a control de l'experiment, es va sacrificar un grup d'animals quatre setmanes després de l'administració de TAM, per tal de comprovar que els pàncrees mostraven el mateix fenotip observat anteriorment en aquest mateix punt. Els animals sacrificats al cap de vuit setmanes després de la primera injecció de TAM es van dividir en dos grups: els d'administració simple de TAM, es a dir, una única tanda d'administració de TAM a l'inici de l'experiment, com s'havia realitzat de forma general en tots els animals analitzats, i el segon grup amb doble administració de TAM, aquests ratolins van rebre tres dosis addicionals de record quatre setmanes després de la primera administració per tal de mantenir els nivells de deleció del gen de Snail1 (Fig. R-13A).

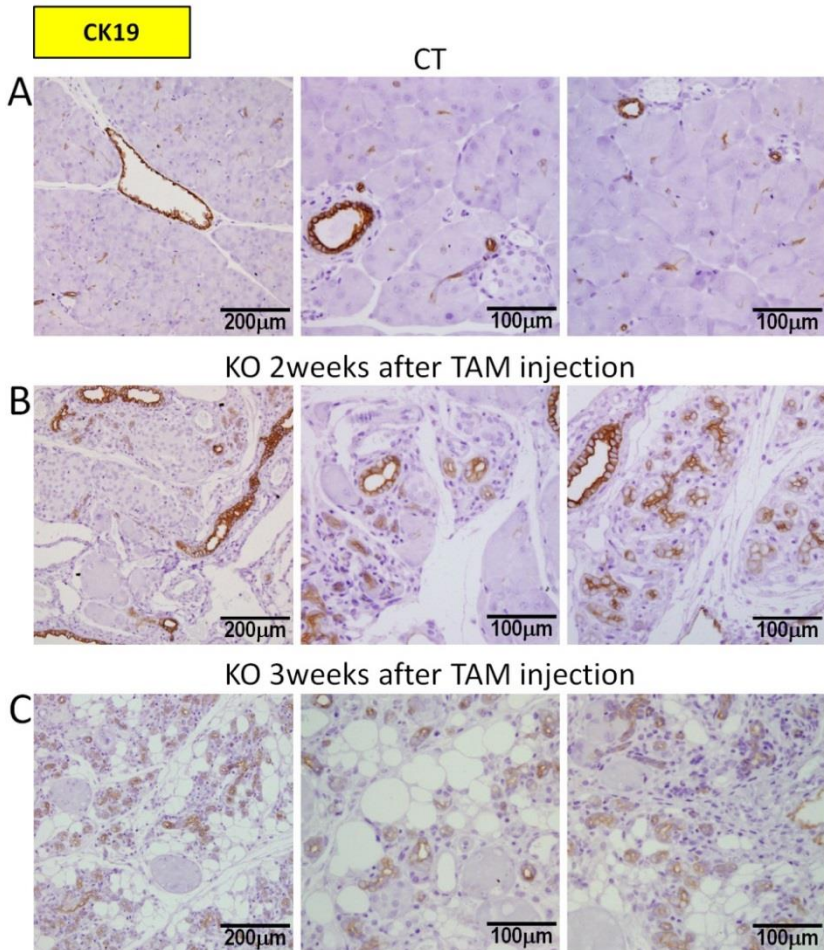


Figura R-12: Les cèl·lules ductals del pàncrees KO són més resistents després de la deleció del gen de Snail. IHQ contra CK19 dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins: **A)** CT; **B)** KO 2 setmanes i **C)** 3 setmanes després de l'administració de TAM.

Igual com veiem a la figura R-6i i 6j, tant als pàncrees dels ratolins KO analitzats quatre setmanes després de la primera administració de TAM com els pàncrees dels ratolins re-induïts quatre setmanes després (doble administració de TAM) i sacrificats a vuit setmanes després de la primera administració (Fig. R-13B (4-6)), s'observa el mateix fenotip: un pàncrees poblat majoritàriament per adipòcits, amb pràcticament absència total de cèl·lules acinars i algunes cèl·lules ductals.

En canvi, els ratolins KO sacrificats vuit setmanes després de l'única tanda d'administracions de TAM havien patit una regeneració parcial del

teixit pancreàtic exocrí (Fig. R-13 (1-3)): els pàncrees d'aquest grup d'animals mostraven moltes cèl·lules acinars que repoblaven novament aquets teixit substituint les cèl·lules adiposes que després de quatre setmanes de la deleció del gen de Snail1 havien cobert pràcticament la totalitat d'aquest òrgan.

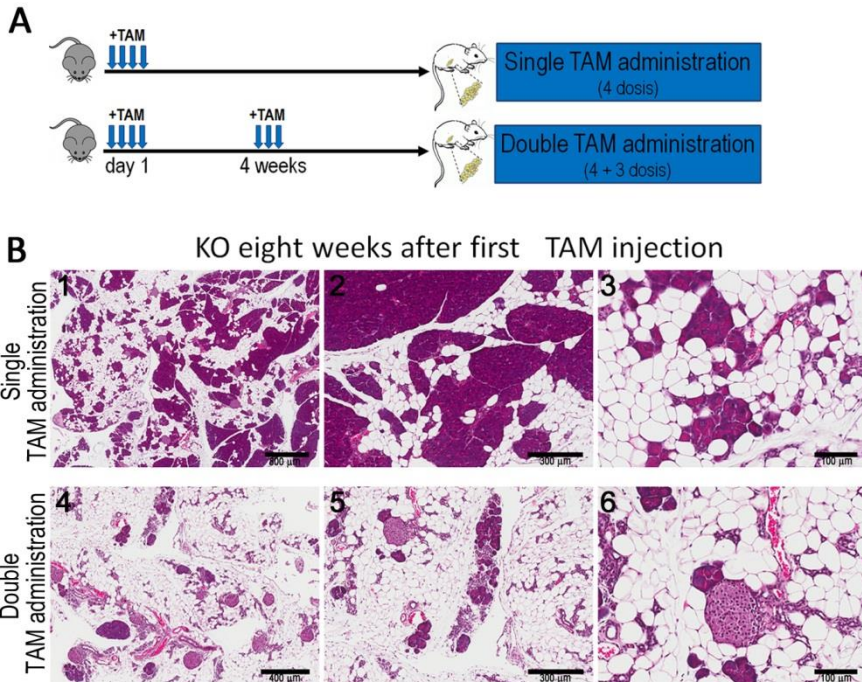
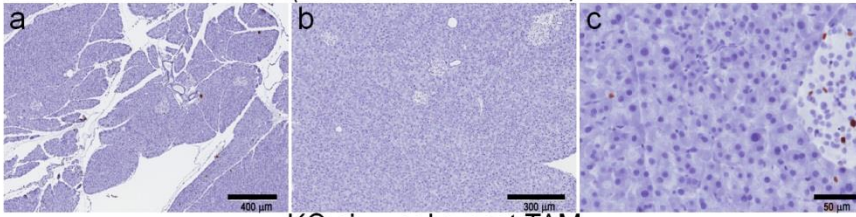


Figura R-13: Recuperació del teixit exocrí pancreàtic 8 setmanes després de la deleció del gen de Snail1. A) Esquema de la pauta d'administració de TAM; els ratolins amb 2 mesos d'edat són induïts amb una única tanda de 4 injeccions intraperitoneals alternades cada 48h (*Single TAM administration*) o re-induïts 4 setmanes mes tard, amb 3 dosis addicionals, també alternades cada 48h (*Doble TAM administration*). **B)** Imatge de la tinció amb He-Eo del pàncrees dels ratolins KO 8 setmanes després de la primera administració de TAM; (1-3) seguint la pauta de "*Single TAM administration*" o (4-6) la de "*Double TAM administration*"

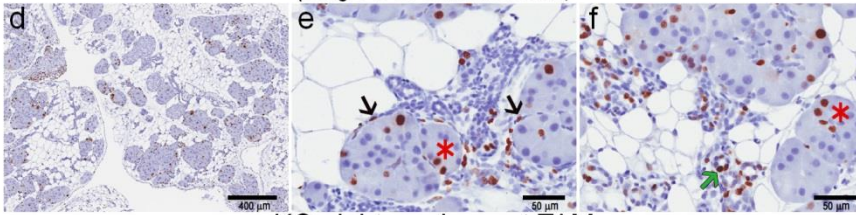
El fet de veure una parcial regeneració dels pàncrees en els ratolins KO va fer que ens preguntéssim quines eren les cèl·lules que proliferaven en aquestes condicions. Per poder observar quin tipus cèl·lular proliferava per repoblar el teixit pancreàtic exocrí es va realitzar una IHQ contra Ki67, un marcador de proliferació cèl·lular (Fig. R-14).

Ki 67

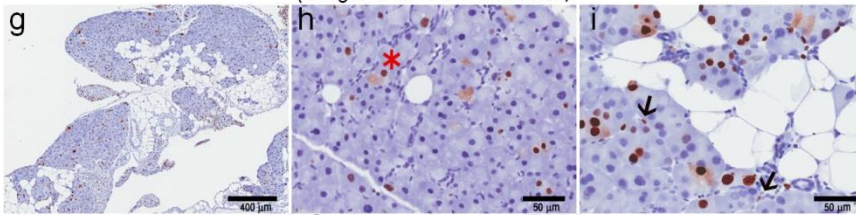
CT eight weeks post TAM
(Double TAM administration)



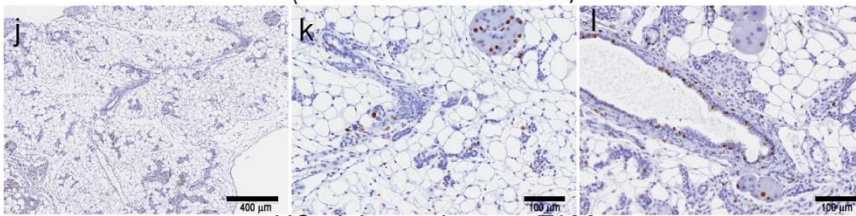
KO six weeks post TAM
(Single TAM administration)



KO eight weeks post TAM
(Single TAM administration)



KO six weeks post TAM
(Double TAM administration)



KO eight weeks post TAM
(Double TAM administration)

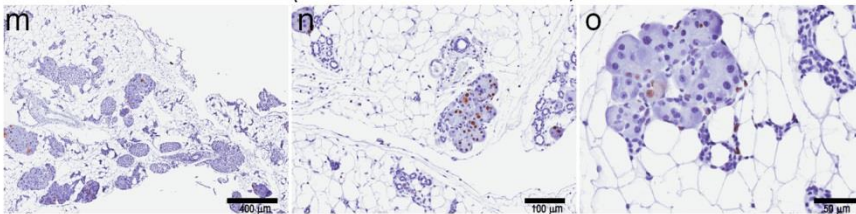


Figura R-14: Els pàncrees regenerats als ratolins KO mostren una alta taxa proliferativa, inexistent en els pàncrees CT. IHQ contra Ki67 de les seccions dels pàncrees de: (a-c) ratolins CT; (d-f) ratolins KO 6 setmanes i (g-i) 8 setmanes després de la primera administració de TAM (“single TAM administration”); i (j-l) ratolins KO 6 setmanes i (m-o) 8 setmanes després de la primera administració de TAM (“double TAM administration”). L’asterisc vermell indica exemples representatius de cèl·lules acinars positives per Ki67, la fletxa negra per les mesenquimals i la fletxa verda per les ductals. L’escala gràfica mostra la mida indicada.

Els pàncrees dels ratolins CT no mostraven pràcticament positivitat per Ki67, revelant la baixa o inexistent taxa proliferativa d’aquest teixit (Fig. R-14 (a-c)). Per contra, en els pàncrees dels ratolins KO, amb una sola tanda d’administracions de TAM (“*Single TAM administration*”), s’observava a les sis (Fig. R-14 (d-f)) i vuit (Fig. R-14 (g-i)) setmanes després de la primera administració de TAM una alta reactivitat per Ki67, evidenciant una alta taxa de creixement en aquests pàncrees. Concretament, sis setmanes després de la primera administració de TAM es podia observar proliferació de cèl·lules acinars, ductals o mesenquimals (Fig. R-14 (e-f)). En canvi vuit setmanes després de la primera administració de TAM, quan els pàncrees havien recuperat pràcticament el seu fenotip inicial, només s’observaven cèl·lules acinars i alguna mesenquimal marcada amb Ki67.

D’altra banda, en els pàncrees dels ratolins KO als que se’ls havia administrat dues tandes d’administracions de TAM (“*Double TAM administration*”), per tal de mantenir el gen de Snail1 delecionat, eren poques les cèl·lules positives per Ki67, tant a les sis (Fig. R-14 (j-l)) com a les vuit (Fig. R-14 (m-o)) setmanes després de la primera administració de TAM.

Aquesta tinció revelava que la regeneració dels pàncrees dels ratolins KO implicava una alta taxa proliferativa dels diferents tipus cèl·lulars (inexistent en els pàncrees dels ratolins CT) que disminueix dràsticament al reforçar la delecio del gen de Snail1 amb dosis addicionals de TAM.

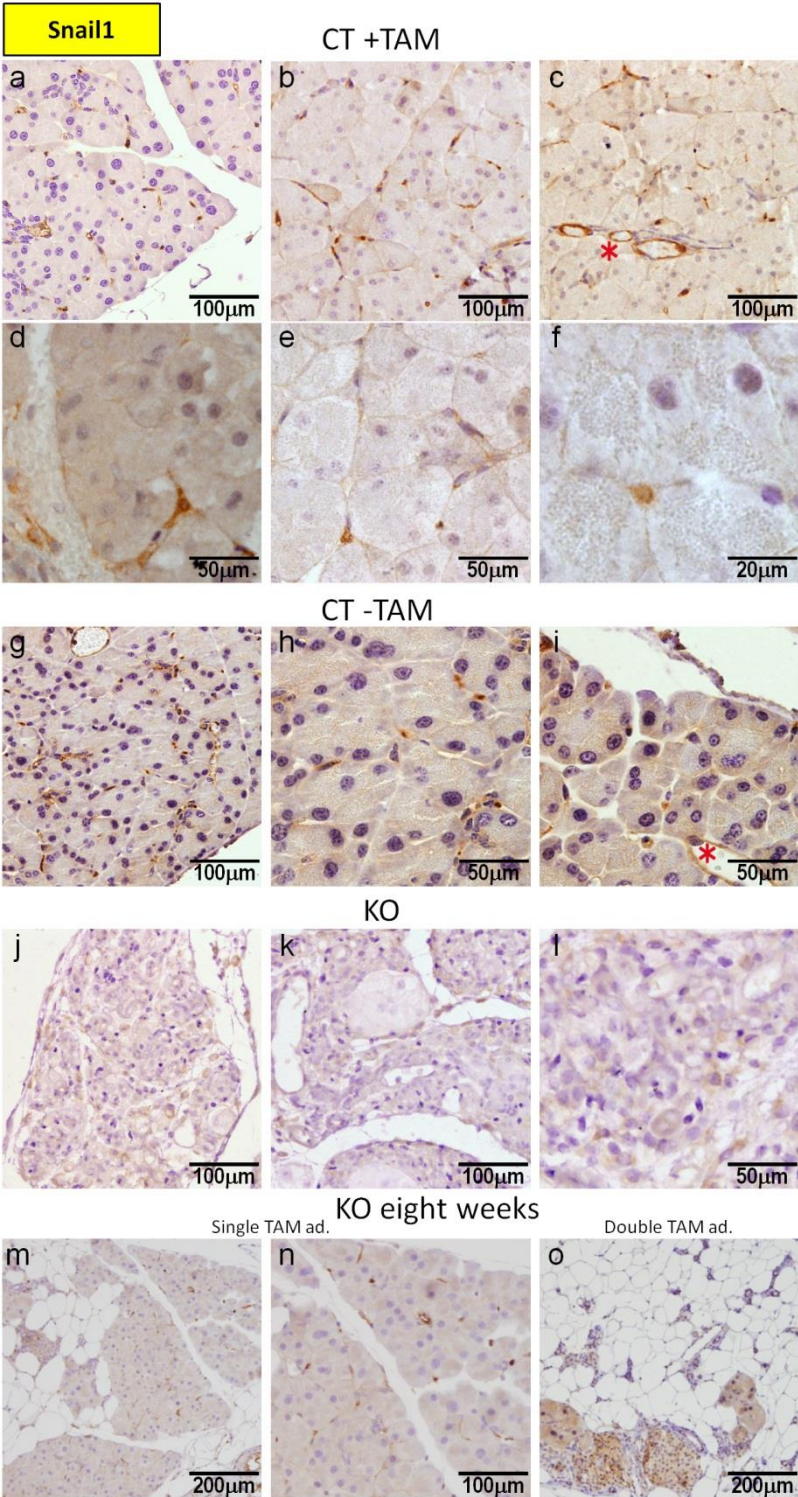
3. SNAIL1 S'EXPRESSA EN ALGUNES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES (PMC)

Per tal d'esbrinar quines són les cèl·lules que expressen Snail1 al pàncrees es va realitzar una immunohistoquímica (IHQ) utilitzant l'anticòs monoclonal contra Snail1 generat i validat per investigadors del nostre grup ⁷⁷. Com es pot observar a la figura R-15 (a-i) Snail1 s'expressa en algunes cèl·lules d'aspecte mesenquimal situades entre les cèl·lules acinars del pàncrees CT, les quals anomenem cèl·lules mesenquimals del pàncrees (PMC), de l'anglès "*Pancreatic Mesenchymal Cells*". Snail1 es detecta al nucli d'aquestes cèl·lules, com és d'esperar, ja que és al nucli on exerceix la seva funció com a factor de transcripció. També s'observa tinció de Snail1 a les cèl·lules endotelials (Fig. R-15c i 15i). Les cèl·lules acinars i ductals no presenten en cap cas expressió de Snail1. En els ratolins KO no s'observa tinció de Snail1 en les cèl·lules dels pàncrees una setmana després de l'administració de TAM (Fig. R-15(j-l)).

Per tal de descartar un possible efecte de la punció intraperitoneal o del TAM en si sobre l'expressió de Snail1 en els pàncrees dels ratolins CT es va analitzar l'expressió tant abans com després de tractar amb TAM. Així doncs, el mateix patró d'expressió es va observar tant en els ratolins homozigots per Snail1, és a dir, abans de l'administració de TAM (Fig. R-15(g-i)) com en els ratolins CT, després de dues setmanes de la primera administració de TAM, Snail1^{+/-del2} (Fig. R-15(a-f)). Aquest resultat indica que els ratolins heterozigots, Snail1^{flox/del2} presenten nivells normals de Snail1.

Tot i no detectar expressió de Snail1 en els animals KO dues setmanes després de l'administració de TAM, el fet de que nostre model sigui un *Knock-Out* condicional, basat en el sistema cre-LoxP induïble amb TAM,

Figura R-15: Snail1 s'expressa en algunes cèl·lules mesenquimals del pàncrees. IHQ contra la proteïna Snail1 dels talls histològics del pàncrees dels ratolins: (a-f) CT dues setmanes després de l'administració de TAM; (g-i) CT sense tractar amb TAM; (j-l) KO dues setmanes després de l'administració de TAM; (m-n) KO vuit setmanes després de l'administració de TAM (*Single TAM administration*) i o) KO vuit setmanes després de la primera administració de TAM i quatre setmanes després de la segona (*Double TAM administration*). Els asteriscs vermells indiquen les cèl·lules endotelials positives per Snail1. L'escala gràfica mostra la mida indicada.



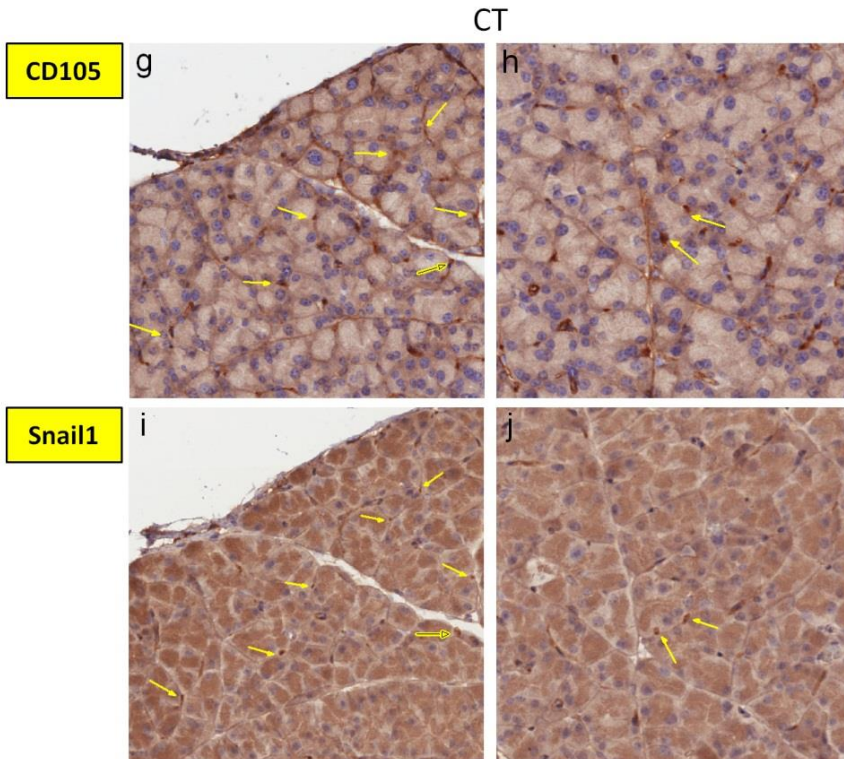
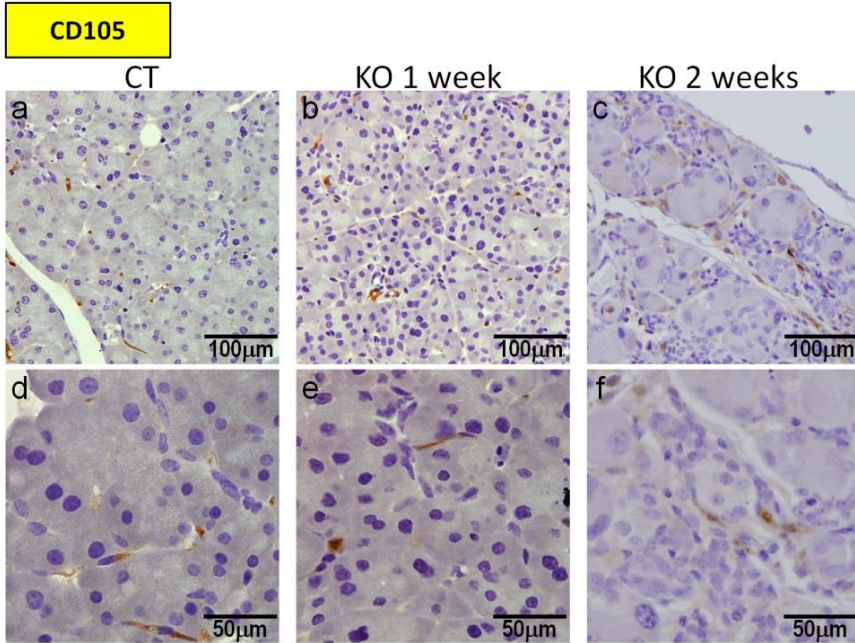
fa esperar que la deleció del gen de Snail1 no es doni en totes i cada una de les cèl·lules del ratolí ¹²¹. Així doncs, es pot observar expressió de Snail1 en els pàncrees dels ratolins KO vuit setmanes després de l'administració de TAM, coincidint amb la regeneració de les cèl·lules acinars (Fig. R-15(m-n)). D'altra banda els ratolins KO re-induïts amb TAM al cap de quatre setmanes de la primera administració i sacrificats un mes tard (vuit setmanes després de la primera administració de TAM)) no presenten expressió de Snail1 i presenten el fenotip típic dels pàncrees dels ratolins KO quatre setmanes després de l'administració de TAM, abans esmentat, on només queden unes poques cèl·lules acinars i la resta del teixit pancreàtic poblat per adipòcits (Fig. R-15o)

Un cop identificades les cèl·lules positives per Snail1 es van realitzar diferents IHQ d'altres marcadors mesenquimals per tal de caracteritzar les PMC que expressen Snail1 i diferenciar-les d'altres subpoblacions de fibroblasts presents en aquest òrgan.

Les cèl·lules positives per **CD105**, marcador de cèl·lules mare mesenquimals ¹²² presenten una distribució similar a les PMC que expressen Snail1 (Fig. R-16 a,d,g-j). Aquestes cèl·lules CD105 positives tenen un fenotip fibroblàstic, i es troben situades al voltant dels acinis.

D'altra banda, aquestes cèl·lules són més nombroses comparant amb el baix nombre de cèl·lules positives per Snail1. S'ha pogut observar en tincions de talls seqüencials que les positives per Snail1 són també positives per CD105 (Fig. R-16 g-j). L'expressió d'aquest marcador es manté en els pàncrees dels ratolins KO. Una setmana després de l'administració de TAM, l'expressió de CD105 no canvia significativament i se segueixen identificant PMC positives (Fig. R-16 b i e), mentre que

Figura R-16: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1 expressen alhora CD105. IHQ contra CD105 als pàncrees dels ratolins: (a i d) CT; (b i e) KO una setmana i (c i f) dues setmanes després de l'administració de TAM. IHQ de CD105 (g i h) i de Snail1 (i i j) cada un en un tall seriat i consecutiu dels pàncrees dels ratolins CT. La fletxa groga assenyala les cèl·lules positives pels dos marcadors alhora. L'escala gràfica mostra la mida indicada



dues setmanes després la distribució de cèl·lules positives per CD105 era diferent, reflectint la desestructuració de l'arquitectura de l'òrgan, fortament compromesa en aquest punt (Fig. R-16 c i f).

La **desmina**, proteïna que forma els filaments intermedis de cèl·lules musculars i d'alguns fibroblasts, ha estat utilitzat en nombrosos estudis com a marcador d'una subpoblació del mesènquima pancreàtic ¹²³. Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees que expressen desmina presenten també una distribució similar a les PMC positives per Snail1 (Fig. R-17a). Les cèl·lules de l'endoteli que formen els vasos, també són positives per desmina (Fig. R-17c). Als pàncrees dels ratolins KO, ens trobem la mateixa situació que amb l'expressió de CD105; l'expressió de desmina

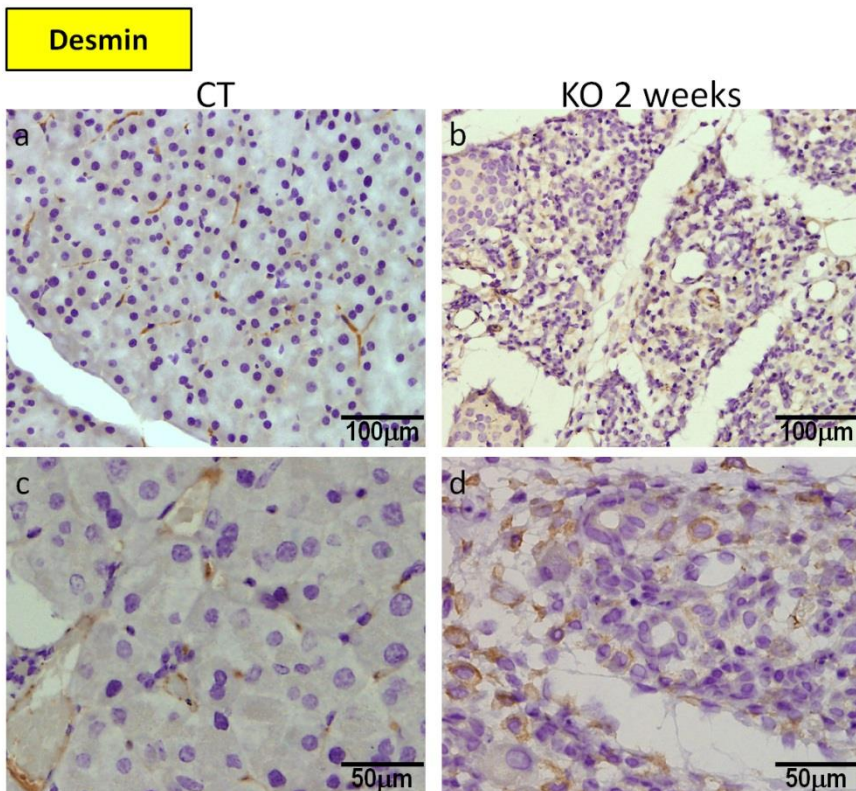


Figura R-17: Les cèl·lules que expressen desmina al pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1. IHQ contra desmina als talls histològics del pàncrees dels ratolins: (a i c) CT i (b i d) KO dues setmanes després de l'administració de TAM. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

es manté sense grans canvis la primera setmana (dada no mostrada), però al cap de dues setmanes de l'administració de TAM, la desorganització de l'estructura de l'òrgan no permet identificar quin tipus de cèl·lules són les reactives per aquets marcador (Fig. R-17 b i d).

La **vimentina**, el constituent principal dels filaments intermedis en les cèl·lules mesenquimals¹²⁴ també va ser analitzat en els talls histològics dels pàncrees CT i KO. De la mateixa manera que el CD105 o la desmina, les cèl·lules que expressen vimentina en els pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals que expressen Snail1 (Fig. R-18(a i c)). L'expressió d'aquest marcador mesenquimal en els pàncrees KO es manté; una setmana després de l'administració de

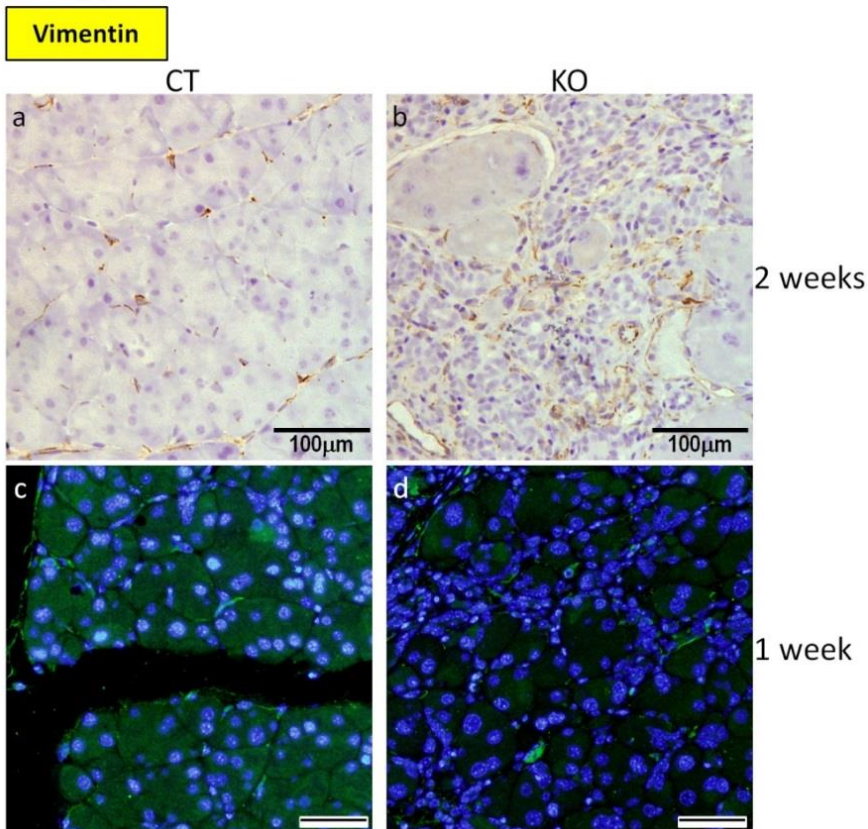


Figura R-18: Les cèl·lules que expressen vimentina al pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1. IHQ i IF contra vimentina als talls histològics del pàncrees dels ratolins: (a i c) CT; (b) KO dues setmanes i (d) una setmana després de l'administració de TAM. L'escala gràfica indica (a i b) 100 μm i (c i d) 50 μm.

TAM encara s'observen cèl·lules mesenquimals positives per vimentina (Fig. R-18d) a l'igual que passa amb l'expressió de CD105 i de desmina. Per contra, després de dues setmanes de l'administració de TAM els pàncrees dels ratolins KO encara presenten expressió d'aquest marcador, però, tot i la desorganització del teixit que no permet identificar amb claredat quin tipus de cèl·lules l'expressa; el nombre d'aquestes cèl·lules positives per vimentina és molt més alt que les positives per CD105 en aquest mateix punt

També es va analitzar l'expressió de α -SMA (alpha Smooth Muscle Actin), un marcador de fibroblast actiu ¹²⁵. Es pot observar a la Figura R-19a com les cèl·lules que expressen aquest marcador també presenten un patró d'expressió similar al de les cèl·lules mesenquimals que expressen Snail1. De la mateixa manera que passa amb Snail1 o desmina, les cèl·lules endotelials que formen els vasos també són positives per aquest marcador (Fig. R-19(a-b)); fins i tot després de la deleció del gen de Snail1, aquestes cèl·lules continuen expressant α -SMA (Fig. R-19c). Per tal de descartar una possible activació de fibroblast en el pàncrees degut a la punció intraperitoneal o al propi TAM, es va analitzar també l'expressió d'aquest marcador en talls histològics de ratolins control els quals no se'ls havia administrat TAM. Es pot observar com el nombre de cèl·lules positives no augmenta en aquestes condicions (Fig. R-19b). A diferència

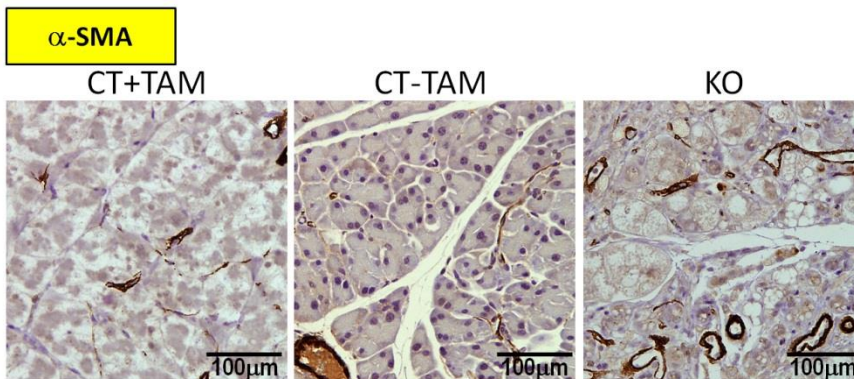


Figura R-19: Les cèl·lules que expressen α -SMA al pàncrees dels ratolins CT presenten un patró similar a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per Snail1. IHQ de l'expressió de α -SMA als talls histològics del pàncrees dels ratolins: **a)** CT; **b)** CT sense administració de TAM i **d)** KO dues setmanes després de l'administració de TAM. L'escala gràfica indica 100 μ m.

dels marcadors mesenquimals esmentats anteriorment, dues setmanes després de l'administració de TAM encara es poden observar cèl·lules amb aparença mesenquimal positives per α -SMA (Fig. R-19c).

Es va analitzar també l'expressió de **GFAP** (Glial Fibrillary Acidic Protein), una altra proteïna del citosquelet, present en algunes cèl·lules mesenquimals del pàncrees, les anomenades cèl·lules estrellades del pàncrees, PaSC (Pancreatic Stellate Cells) ¹²⁶. L'expressió d'aquest marcador en els pàncrees CT, tot i marcar cèl·lules mesenquimals que es troben al voltant dels acinis, aquest presenta un patró diferent del que s'observa en les cèl·lules positives per Snail (Fig R-20a). Quan s'analitzen els pàncrees KO se segueix observant reactivitat per aquest marcador; una setmana després de l'administració de TAM encara es poden apreciar algunes cèl·lules mesenquimals positives per GFAP (Fig. R-20b); dues setmanes després, en canvi, les cèl·lules positives per aquest marcador no són mesenquimals sinó que més aviat és l'epiteli ductal el que és reactiu aquest marcador (Fig. R-20c).

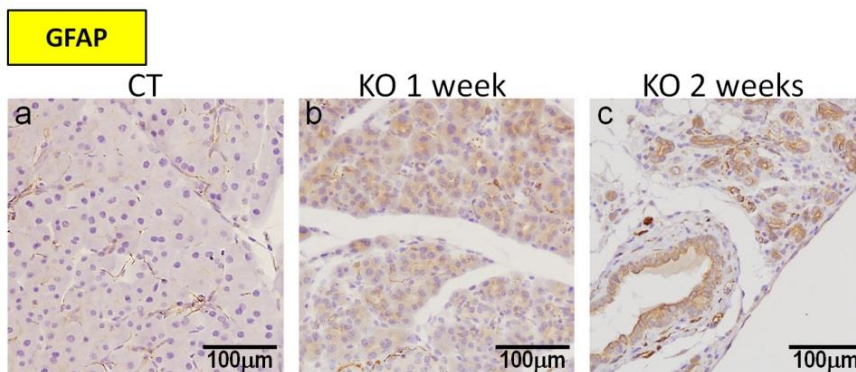


Figura R-20: Les cèl·lules que expressen GFAP presenten un patró diferent de les cèl·lules positives per Snail1. IHQ de l'expressió de GFAP als talls histològics dels pàncrees: **a)** CT; **b)** KO una setmana i **c)** dues setmanes després de l'administració de TAM. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

Per últim, també es va analitzar l'expressió de **S100A4** (S100 Calcium Binding Protein A4) un altre marcador de cèl·lules mesenquimals i de fibroblasts actius que també es troba expressat, entre d'altres, en cèl·lules mesenquimals del pàncrees ¹²⁷. L'expressió d'aquest marcador en el pàncrees CT es pot observar en cèl·lules mesenquimals amb una distribució diferent de les cèl·lules que expressen Snail1 (Fig. R-21(a-b)) i

en cèl·lules mesenquimals envoltant els illots de Langerhans (Fig. R-21c). Quan s'analitza l'expressió d'aquest marcador en els pàncrees dels ratolins KO es pot observar com una setmana després de l'administració de TAM les cèl·lules mesenquimals positives per S100A4 se situen entre els acinis (Fig. R-21d) a diferència del que s'observava en els pàncrees CT. A més, cal destacar que dues setmanes després de l'administració de TAM encara s'observa reactivitat en les cèl·lules mesenquimals que envolten els illots de Langerhans (Fig. R-21(e-f)), de la mateixa manera que s'observa en els pàncrees CT.

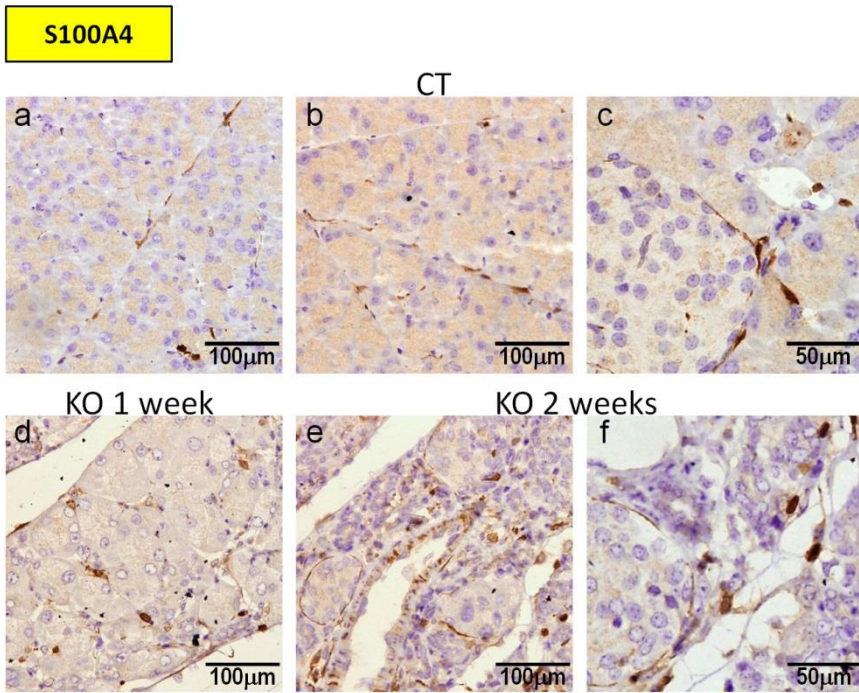


Figura R-21: Les cèl·lules que expressen S100A4 presenten un patró diferent de les cèl·lules positives per Snail1. IHQ de l'expressió de S100A4 als talls histològics dels pàncrees: (a-c) CT; d) KO una setmana i (e-f) dues setmanes després de l'administració de TAM. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

Així doncs, podem concloure que les cèl·lules positives per Snail1 al pàncrees són una sub població de cèl·lules mesenquimals situades al voltant dels acinis. Aquestes cèl·lules són alhora positives per CD105, tot i que les cèl·lules positives per CD105 són més nombroses que les cèl·lules positives per Snail1. L'expressió de desmina, α -SMA i vimentina es restringeix a unes cèl·lules mesenquimals amb una distribució similar a la

de les cèl·lules mesenquimals positives per Snail1. En els pàncrees dels ratolins KO l'expressió d'aquests marcadors mesenquimals es manté una setmana després de la deleció de Snail1; al cap de dues setmanes, no és possible identificar quin tipus cel·lular els expressa degut a la desestructuració del teixit. Per últim, GFAP i S100A4, tot i expressar-se en cèl·lules mesenquimals del pàncrees, presenten un patró de distribució diferent del de les cèl·lules positives per Snail1, suggerint que s'expressen en una subpoblació de cèl·lules mesenquimals diferent de la que expressa Snail1.

4. LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES KO PER SNAIL1 NO PRESENTEN β -CATENINA NUCLEAR

Per tal d'intentar esbrinar la possible via per la qual les PMC positives per Snail1 mantenen l'homeostasi de les seves cèl·lules veïnes i conseqüentment la integritat del teixit exocrí es van analitzar possibles factors de transcripció expressats en aquestes PMC o activats en les cèl·lules epitelials adjacents.

Entre els molts factors implicats en la transducció de senyals entre cèl·lules mesenquimals i epitelials del teixit pancreàtic ¹²⁸ es va analitzar l'activació per fosforilació de **STAT3**, un factor de transcripció implicat en la mediació de senyals de receptors de diverses citoquines ¹²⁹.

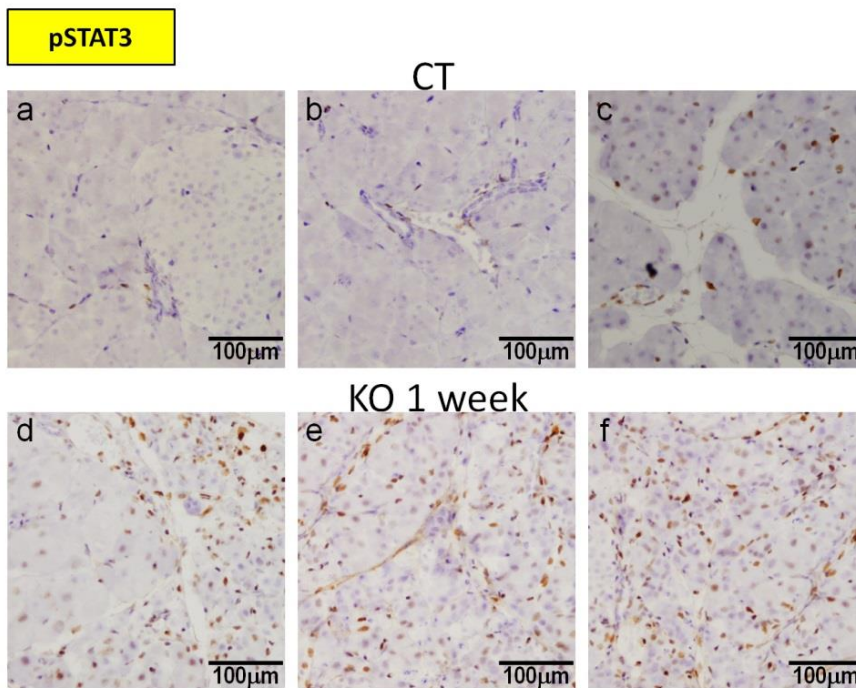


Figura R-22: Augment de cèl·lules mesenquimals positives per p-STAT3 en els pàncrees dels ratolins KO. IHQ contra pSTAT3 dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins (a-c) CT i (d-f) KO una setmana després de l'administració de TAM. L'escala gràfica indicada 100 μ m.

Es pot observar a la figura R-22(a-c) com en els pàncrees dels ratolins CT l'activació d'aquest factor es va observar en poques cèl·lules

mesenquimals; per contra, el nombre de cèl·lules positives, es dispara exponencialment en els pàncrees dels ratolins KO una setmana després de la delecció del gen de Snail1 (Fig. R-22(d-f)).

Com s'ha esmentat a la introducció, l'expressió de Snail1 no es limita a la repressió de gens com l'E-cadherina ³⁴ sinó que també promou l'expressió de gens mesenquimals ¹³⁰⁻¹³¹. Per tant, en la cerca de factors de transcripció, que induïts directament o indirectament per Snail1, fossin capaços de desencadenar l'expressió de determinats gens que permetessin a les PMC mantenir l'homeostasi de les cèl·lules acinars, vàrem analitzar l'expressió de **β-catenina** i la seva localització en les cèl·lules del pàncrees.

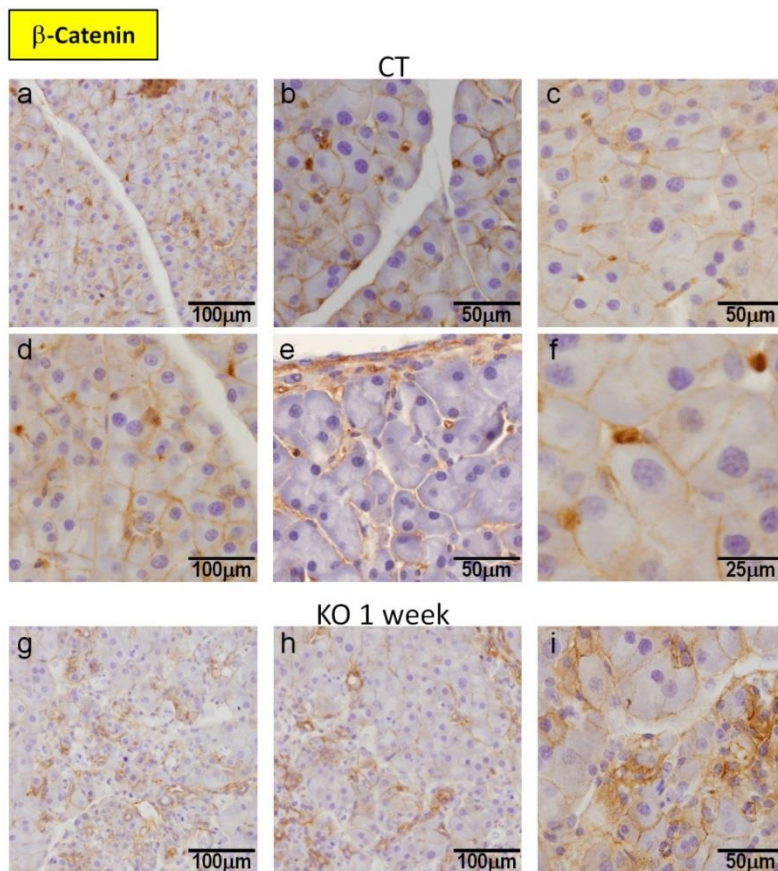


Figura R-23: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO perden l'expressió de β-catenina nuclear. IHQ contra β-catenina dels talls histològics dels pàncrees dels ratolins (a-f) CT i (g-i) KO una setmana després de l'administració de TAM. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

A la figura R-23(a-f) es pot observar com en els pàncrees CT, a part d'una tinció general a les membranes de les cèl·lules epitelials, es detecta una intensa reactivitat de β -catenina en els nuclis d'algunes cèl·lules mesenquimals. En els pàncrees KO, tot i que l'expressió es manté a la perifèria de les cèl·lules epitelials, no es detecta cap nucli positiu a les cèl·lules mesenquimals (Fig. R-23(g-h)).

Aquest resultat suggereix que Snail1 és necessari per a la distribució de l'expressió de la β -catenina nuclear a les PMC.

5. CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES AÏLLADES IN VITRO

5.1 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees cultivades “*in vitro*” expressen Snail1

Com s’ha indicat, la falta de Snail1 a les PMC provoca una ràpida desaparició de les cèl·lules acinars en els pàncrees dels ratolins KO. Per tal d’estudiar l’efecte de Snail1 a les PMC es van aïllar aquestes cèl·lules modificant un protocol descrit per obtenir cèl·lules mesenquimals del fetge de rates¹³²⁻¹³³. Així doncs, es van sacrificar 5 ratolins Snail1^{flox/del2} i se’ls va extreure el pàncrees; després d’una digestió química i mecànica, es van centrifugar a través d’un gradient de densitat generant una banda d’on s’obtenien unes 200.000 cèl·lules (PMC). En sembrar-les es va poder comprovar com aquest cultiu primari estava format per cèl·lules amb morfologia fibroblàstica. Per tal de seguir amb la caracterització, i de cara a establir un bon model “*in vitro*” amb el qual analitzar la funció de les PMC positives per Snail1 identificades en el teixit pancreàtic, el primer que es va realitzar va ser una anàlisi del cultiu primari obtingut, mitjançant el citòmetre de flux determinant el percentatge de cèl·lules positives per CD105, marcador de fibroblasts actius i de cèl·lules mare mesenquimals (Calloni et al. 2013). Els resultats del les anàlisis del FACS mostraven que només un 5’61 % \pm 3 de les PMC eren positives per CD105. El fet que en els pàncrees dels ratolins CT totes les PMC positives per Snail1 eren alhora positives per CD105 ens va dur a purificar les cèl·lules que expressaven aquest marcador mitjançant un “*sorter*”. Així doncs, un cop aïllades les cèl·lules mitjançant centrifugació per gradient de densitat es van incubar amb l’anticòs CD105 i es van purificar al *sorter*. A partir d’aquestes cèl·lules es va obtenir la línia cel·lular estable utilitzada en aquest treball: cèl·lules mesenquimals aïllades de pàncrees murins, positives per CD105, amb un dels al·lels del gen de Snail1 floxejat i l’altre delecionat (Snail1^{flox/del2}); un cultiu estable i homogeni de cèl·lules amb morfologia fibroblàstica que expressava Snail1 i altres marcadors mesenquimals de fibroblasts actius.

5.2 La deleció de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees no efecte l'expressió d'altres marcadors mesenquimals.

Un cop obtinguda la línia estable de cèl·lules mesenquimals de pàncrees ($\text{Snail1}^{\text{flox}/\text{del}2}$) positives per CD105 es va eliminar l'expressió de Snail1 infectant amb la recombinasa CRE. Es va utilitzar el vector retroviral pMX fusionat a la recombinasa CRE per obtenir una línia de cèl·lules mesenquimals del pàncrees $\text{Snail1}^{\text{del}2/\text{del}2}$; és a dir, KO per Snail1 (PMC KO). Com a control d'aquest cultiu es va utilitzar la mateixa línia de cèl·lules mesenquimals positives per CD105 infectada en paral·lel amb un vector retroviral buit; en aquest cas, pBABE- Φ , amb el que es va obtenir la línia CT per Snail1 (PMC CT). Les cèl·lules d'aquesta línia CT mantenien un al·lel del gen de Snail1 floxejat el qual permetia l'expressió de Snail1, com es pot observar en la immunofluorescència de figura R-24A (superior). Un cop infectades i seleccionades amb puromicina es va comprovar l'efecte de la recombinasa CRE en la línia KO analitzant l'expressió de Snail1 tant a nivell de proteïna com de RNA. La immunofluorescència mostrava com les PMC KO no expressaven Snail1 després de la infecció amb la CRE (Fig. R-24A (inferior)). Amb l'anàlisi per RT-qPCR tampoc es va detectar expressió de Snail1 en aquestes cèl·lules; d'altra banda l'expressió dels diferents gens mesenquimals analitzats, com CD105, Desmina, GFAP, Fibronectina i Vimentina no canviaven en ser comparats amb les PMC CT (Fig. R-24B). Després de la infecció amb la CRE tampoc es van detectar canvis morfològics en les cèl·lules PMC KO (R-24C).

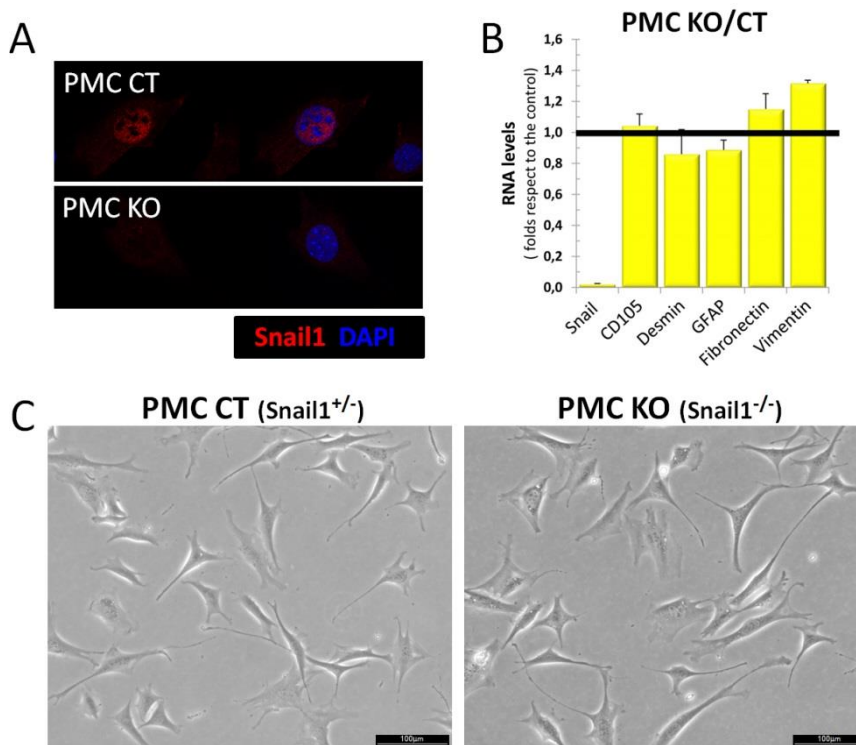


Figura R-24: Les cèl·lules pancreàtiques mesenquimals positives per CD105 no expressen Snail1 després de ser infectades amb la CRE. Infecció amb la recombinasa CRE per tal d'obtenir un cultiu de cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1. **A)** Imatges de la immunofluorescència utilitzant l'anticòs contra Snail1 de les cèl·lules PMC CT (a dalt) i PMC KO (a baix). **B)** qRT-PCR mostra la relació de l'expressió dels gens indicats entre les cèl·lules de la línia PMC KO respecte a la de les cèl·lules PMC CT, la barra d'error indica el promig dels valors d'almenys 3 experiments independents. **C)** Imatges del cultiu de les PMC CT i KO. L'escala gràfica indica 100 µm.

5.3 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 proliferen igual que les cèl·lules CT.

Un cop establerta les línies de PMC CT i KO per Snail1 es va analitzar per citometria de flux el cicle cel·lular en aquestes cèl·lules. Es pot observar a la figura R-25A com un 74,58% de les cèl·lules CT es trobaven a G1 front un 65,83% de les cèl·lules KO; així doncs, no es van observar canvis significatius en el cicle cel·lular del nostre model "in vitro".

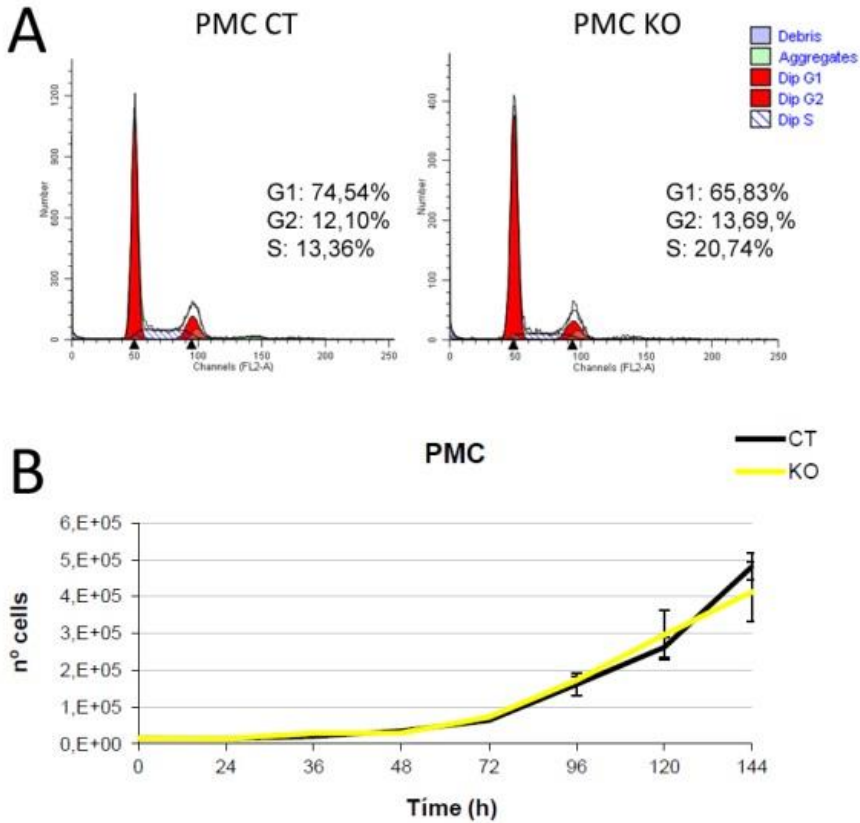


Figura R-25: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees CT i KO per Snail1 no registren canvis ni en el cicle cel·lular ni en la velocitat de creixement. A) Anàlisi del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux de la línia PMC CT i KO per Snail1. Les cèl·lules es van tripsinitzar i rentar dos cops amb PBS, es van resuspendre 1.000.000 cèl·lules en 300 µl de PBS, després es va afegir a poc a poc 700 µl de etanol fred tot vortejant la solució per evitar agregats. Després de fixar les cèl·lules, aquestes es van rentar dos cops amb PBS, i es van incubar durant 30 min a temperatura ambient amb 500 µl de PBS amb Iodur de propidi a 50 µg/ml i RNAses a 5 µg/ml (Sigma). Posteriorment es va analitzar el contingut de DNA mitjançant la fluorescència del Iodur de Propidi amb el FACScan i el programa CellQuest (BD). La distribució del cicle cel·lular es va calcular amb el programa ModFit LT. **B)** Corba de creixement de la línia PMC CT (negre) i KO (groc) Es van sembrar 10.000 cèl·lules en plaques de 60 mm (8x) i es van tripsinitzar i contar les cèl·lules vives a diferents temps.

D'altra banda, en analitzar la proliferació cel·lular tampoc es van registrar grans canvis en la velocitat de creixement en comparar la línia CT amb la KO (R-25B).

6. LA DELECCIÓ DE SNAIL1 EN LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES EN CULTIU DISMINUEIX L'EXPRESSIÓ DE GENS DIANA DE LA β -CATENINA

6.1 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 expressen menys IL-6 que les cèl·lules CT al ser estimulades amb TGF β .

Tot i no observar canvis en la morfologia ni en l'expressió de marcadors mesenquimals ni en la proliferació cel·lular de les PMC un cop deletionat el gen de Snail1, es va continuar amb la caracterització d'aquestes cèl·lules *in vitro*, per tal d'intentar esbrinar el mecanisme que capacita aquestes cèl·lules mesenquimals positives per Snail1 a mantenir l'homeòstasi de les cèl·lules acinars adjacents, així com la integritat del teixit pancreàtic. Donat que aquest efecte de les PMC sobre les cèl·lules acinars observat en el pàncrees hauria de ser mitjançant la secreció d'un senyal paracrí es va continuar amb l'objectiu d'estudiar el paper de Snail1 en aquestes cèl·lules en resposta a diferents estímuls i analitzant-ne alguns dels factors de creixement i citoquines implicats en diferents processos pancreàtics.

Pel seu paper descrit en el manteniment de la diferenciació del fenotip acinar en el pàncrees exocrí "*in vivo*"¹³⁵ el primer que es va analitzar va ser la resposta induïda per l'estímul de TGF- β 1. Com en altres cèl·lules mesenquimals, on l'expressió de Snail1 és necessària per a la seva activació després de l'estimulació amb TGF- β 1¹³⁶, les PMC CT augmentaven l'expressió de Snail1 al ser induïdes per TGF β 1 després de 16 h sense sèrum (0,5 % de FBS). Es pot observar en el WB de la figura R-26A com dues hores de tractament és suficient per a veure l'augment de la proteïna, que es percep encara a les 8 h, i a les 24 h s'observen altre cop els nivells basals expressats de Snail1 en les PMC CT. A les 8 h de tractament amb TGF β 1 es podia observar com els nivells de RNA eren tres vegades superiors (Fig. R-26C) i la localització de la proteïna augmentava clarament en el nucli d'aquestes cèl·lules (Fig. R-26B). D'altra banda i com era d'esperar, no es detecta expressió de Snail1 després de la inducció amb TGF β 1 a les cèl·lules KO (Fig. R-26A i B). A

part de l'expressió de Snail1, després d'estimular 8 h amb TGFβ 1 també es va detectar augment de l'expressió de IL-6 i del propi gen TGFβ 1 en les cèl·lules CT, inducció significativament més petita en les cèl·lules KO (Fig. R-26C).

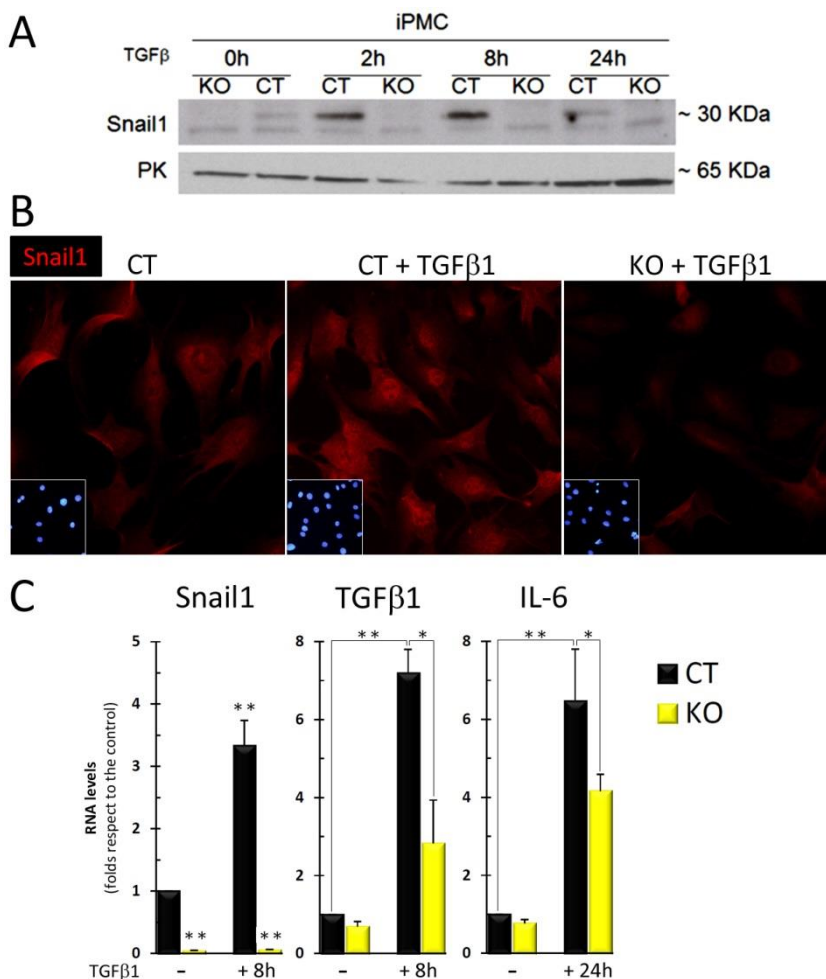


Figura R-26: L'estimulació amb TGFβ a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO no fa augmentar l'expressió de TGFβ1 i IL-6 de la mateixa manera que a les CT. A) WB de la cinètica de l'expressió de Snail1 després de la inducció a les 2, 8 i 24 h amb TGFβ1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees CT i KO per Snail1, mantingudes prèviament 16 h sense sèrum (0,5 % FBS). **B)** Imatge de la immunofluorescència contra Snail1 de les PMC CT i KO per Snail1 després de 8h d'inducció amb TGFβ1. **C)** qRT-PCR de l'expressió de Snail1, TGFβ1 i IL-6 en les PMC CT i KO després de 8 h d'inducció amb TGFβ1. Les barres indiquen la mitjana d'almenys 3 experiments independents. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels diferents valors obtinguts. Un asterisc indica $p < 0,1$; dos asteriscs indiquen $p < 0,05$.

6.2 La falta d'expressió de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees promou l'exclusió de la β -catenina nuclear

Com en altres cèl·lules mesenquimals en cultiu ⁷⁷, Snail1 es va detectar principalment en el nucli, co-localitzant amb la β -catenina (Fig R-27A). La

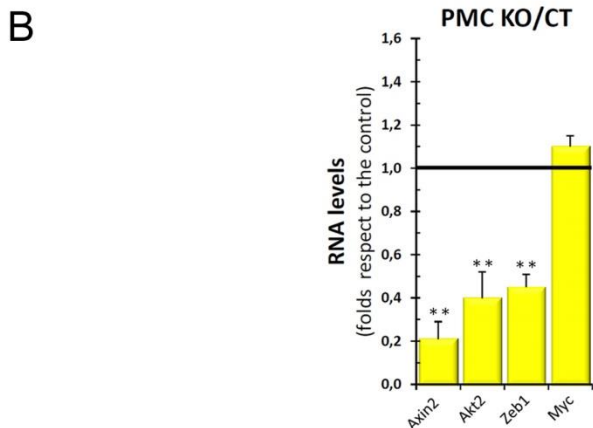
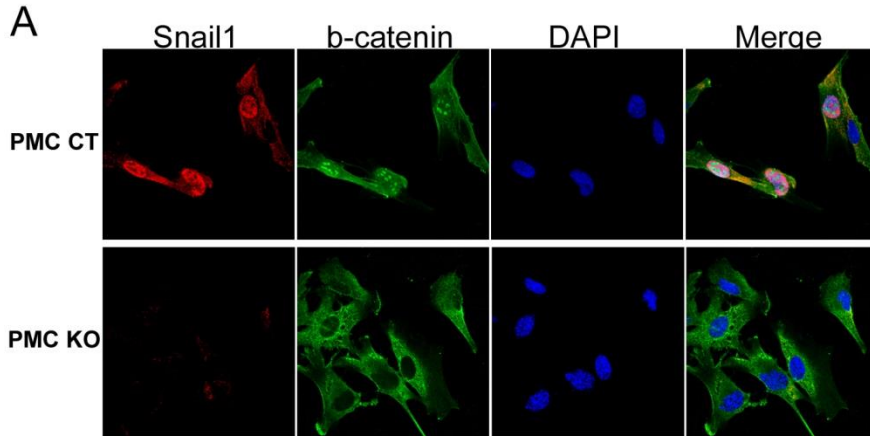


Figura R-27: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees que no expressen Snail1 disminueixen l'expressió de la β -catenina nuclear i la dels seus gens diana. La falta de l'expressió de Snail1 a les PMC promou l'exclusió de la β -catenina nuclear i l'expressió dels seus gens diana són regulats a la baixa. **A) Imatges de les PMC CT i KO per Snail1 tenyides per immunofluorescència contra els anticossos de Snail1 i β -catenina. **B)** qRT-PCR de l'expressió dels gens diana de β -catenina: AXIN2, AKT2, ZEB1 i c-Myc. Les barres indiquen el promig d'almenys 3 experiments independents. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels diferents valors obtinguts. Dos asteriscs indiquen $p < 0,05$.**

deleció de Snail1 va promoure l'exclusió de la β -catenina d'aquest compartiment (Fig 28A), d'acord amb els resultats ja publicats ⁷², que impliquen la β -catenina com un element transcripcional translocat al nucli per Snail1. Es va analitzar per RT-qPCR l'expressió de gens diana resultat de l'activitat transcripcional del complex β -catenina/TCF-4. ¹³⁷⁻¹³⁸. Així doncs es va observar com la deleció de Snail1 a les PMC KO reduïa significativament alhora l'expressió dels gens Axin2, Zeb1 i Akt2 però no la de l'oncogen Myc (Fig. R-27B).

6.3 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 expressen menys PGE2, inclús després de l'estimulació amb IL-1 α

Es va analitzar també l'expressió de COX2, un altre gen diana de l'activitat transcripcional del complex β -catenina/TCF-4 ¹³⁹. Es pot observar a la figura R-28A com l'expressió d'aquest enzim, implicat en la biosíntesi de diferents prostaglandines ¹⁴⁰, també es va veure disminuït en les PMC un cop deletionat el gen de Snail1. L'estimulació de COX2 per la IL1- α ¹⁴¹ també va ser més petita en absència de Snail1 (Fig 29A). D'altra banda, l'estimulació d'un altre gen diana de la IL1- α , la IL6 ¹⁴², es va veure afectada per la deleció de Snail1, el que suggereix que aquestes cèl·lules són almenys parcialment insensibles a aquesta citoquina (Fig 29A).

Està descrit que Snail1 pot reprimir una altre enzim implicat en el metabolisme de les prostaglandines, 5-HPGD ¹⁴³; per tant, també es van comprovar els nivells de RNA que corresponen a aquest gen. Com es mostra a la figura R-28B, l'expressió de 5-HPGD era clarament regulat a l'alça en les PMC KO per Snail1 en comparar-les amb les PMC CT. Probablement com a conseqüència dels efectes combinats de Snail1 sobre COX-2, necessaris per a la síntesi de PGE2, i en 5-HPGD, necessaris per a la degradació d'aquesta prostaglandina, els nivells de PGE2 van ser substancialment menors en les PMC KO i no van ser estimulats per IL1- α en aquestes cèl·lules, com ho eren a les cèl·lules control (PMC CT).

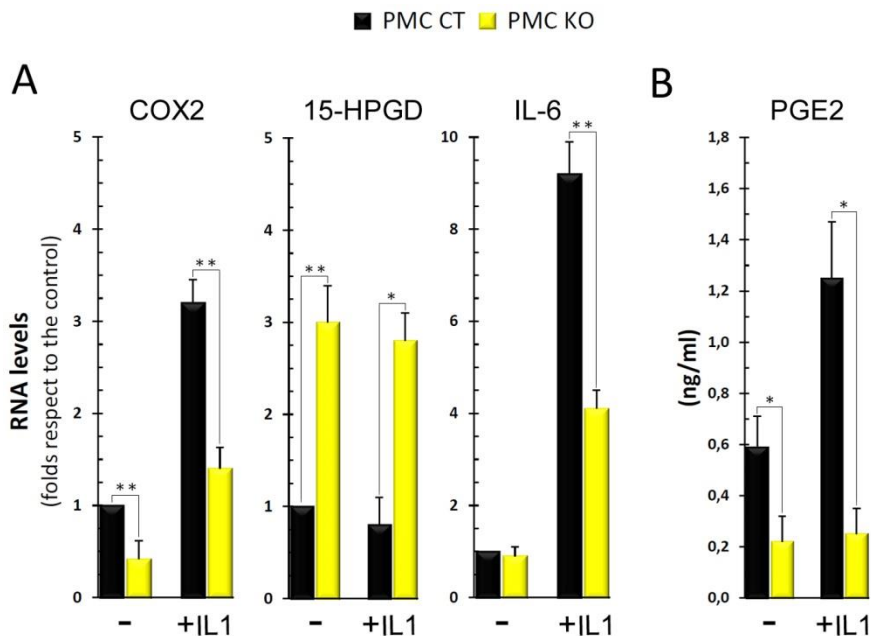


Figura R-28: Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees KO per Snail1 expressen menys PGE2 fins i tot després de l'estimulació amb IL-1. Les PMC KO responen de forma ineficient a l'estímul de IL-1 comparat amb les PMC CT, a més produeixen menys PGE2 inclús en ser estimulades amb IL-1. **A)** qRT-PCR de l'expressió dels gens indicats en condicions basals i després de l'estimulació durant 48 h amb IL-1 α . **B)** anàlisi per ELISA dels nivells de PGE2 presents en el medi de cultiu de les PMC CT i KO per Snail1 en condicions basals i després de l'estimulació durant 48 h amb IL-1 α . Les barres indiquen el promig d'almenys 3 experiments independents. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels diferents valors obtinguts. Un asterisc indica $p < 0,1$; dos asteriscs indiquen $p < 0,05$.

RESULTATS

7. L'EXPRESSIÓ DE SNAIL1 EN LES CÈL·LULES MESENQUIMALS DEL PÀNCREES CONTRIBUEIX AL MANTENIMENT DE LES CARACTERÍSTIQUES ACINARS DEL CULTIU DELS EXPLANTS ACINARS PANCREÀTICS.

Després de veure com l'expressió de Snail1 a les PMC desenvolupava un paper en el manteniment de les cèl·lules acinars del teixit pancreàtic (Fig. R-6), ens vam preguntar si les PMC *"in vitro"* també eren capaces d'exercir aquesta funció protectora sobre el fenotip acinar d'un cultiu d'explants pancreàtics.

7.1 Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees retarden la pèrdua de marcadors acinars dels explants acinars en ser sembrats en cocultiu *"in vitro"*.

Les cèl·lules acinars en cultiu pateixen una ràpida pèrdua dels seus marcadors acinars alhora que adquireixen marcadors ductals¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. El primer que es va voler determinar era si les PMC afectaven aquest procés de transdiferenciació acinar-ductal. Per fer-ho es van aïllar les cèl·lules acinars del pàncrees dels ratolins CT, es van sembrar *"in vitro"*, en absència o presència de les PMC i es van analitzar els nivells d'RNA de l'amilasa i de CK19. Es va comprovar com la relació entre l'expressió de CK19 respecte de l'amilasa augmentava al cap de tres dies de cultiu. Aquest augment de l'expressió de la CK19 respecte de l'amilasa (Fig. R-29) era 8 vegades inferior en el cultiu en què l'explant acinar havia estat sembrat conjuntament amb les PMC, en comparar-lo amb l'explant acinar sembrat sol. Així doncs, es va comprovar com les PMC prevenien l'augment de marcadors ductals de les cèl·lules acinars primàries sembrades *"in vitro"*

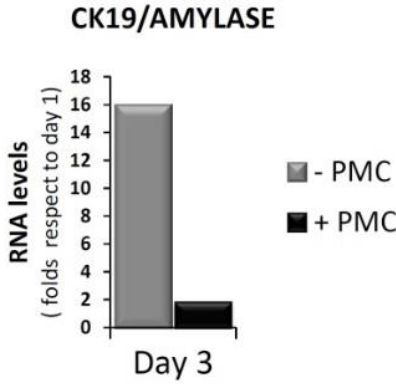


Figura R-29: El cocultiu de les PMC amb l'explant acinar del pàncrees prevé la ràpida disminució dels marcadors acinars. Explant acinar d'un ratolí CT; la meitat va ser cocultivat amb presència de PMC, l'altra meitat va ser cultivat sol. Al dia 1 i 3 de cultiu se'n va extreure l'RNA per analitzar l'expressió de marcadors acinars (amilasa) i ductals (CK19) per RT-qPCR. La gràfica mostra l'augment de l'expressió de CK19 respecte de l'amilasa, al tercer dia de cultiu, de l'explant acinar amb absència o presència de les PMC

7.2 El cocultiu en matrigel de l'explant acinar amb les cèl·lules mesenquimals del pàncrees afavoreix la formació d'estructures esfèriques de cèl·lules epitelials.

Per continuar amb l'estudi del paper de les PMC en les cèl·lules acinars en cultiu, i per tal d'evitar la ràpida transdiferenciació cap a cèl·lules ductals que es dona quan aquestes s'adhereixen a la placa es va optar per cultivar l'explant acinar utilitzant Matrigel com a medi de cultiu; en aquestes condicions de cultiu 3D es van detectar unes estructures esfèriques formades per cèl·lules epitelials (Fig. R-30A (1-7)).

El nombre d'aquestes esferes era significativament superior quan els explants acinars se sembraven en presència de les PMC (Fig. R-30B). D'altra banda, en comparar l'explant acinar en cocultiu amb les PMC CT o amb les KO per Snail1, el nombre total d'aquestes esferes no variava significativament. Cal destacar que, aquestes cèl·lules mesenquimals creixien durant el cultiu però no s'adherien a les estructures esfèriques (Fig. R-30A (8-9)).

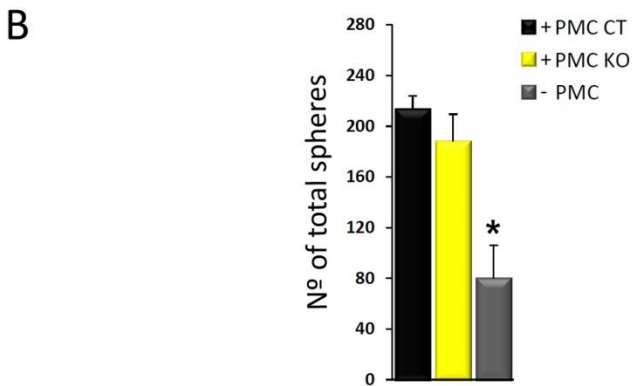
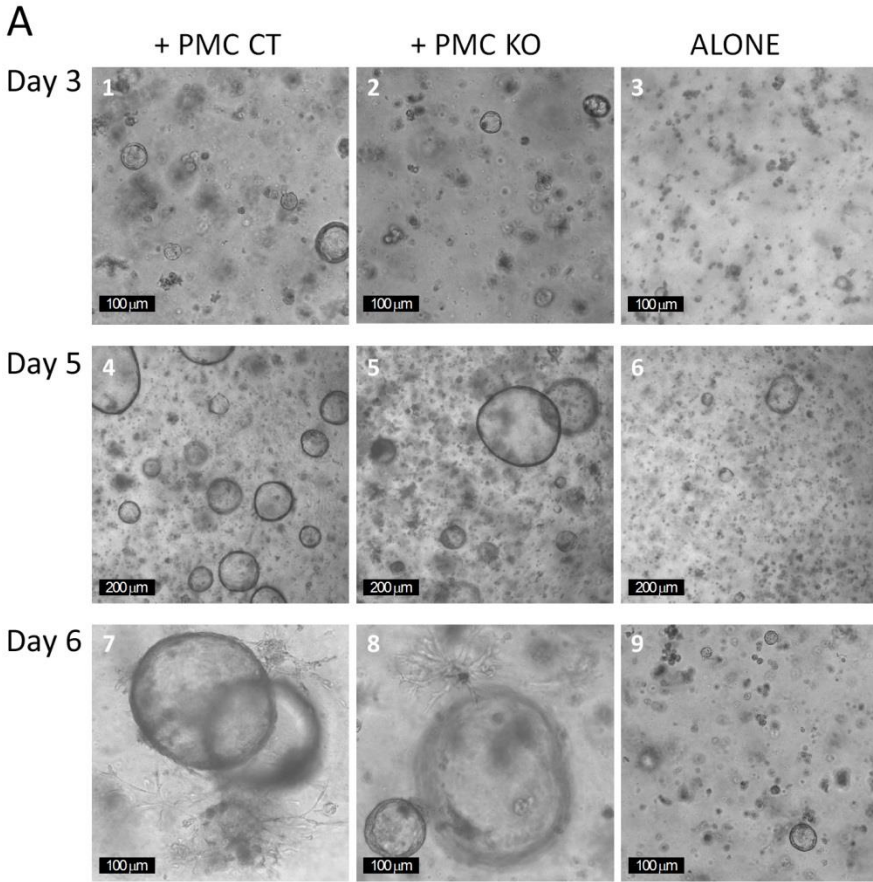


Figura R-30: L'explant acinar en cultiu 3D forma més estructures esfèriques de cèl·lules epitelials quan es cocultiven amb les cèl·lules mesenquimals dels pàncrees. Cultiu 3D en medi matrigel suplementat amb sèrum dels explants acinars de pàncrees de ratolins control que van ser sembrats sols o en cocultiu amb les PMC CT o les PMC KO com es descriu a materials i mètodes. **A)** Imatges del a dia 3 del cocultiu amb les PMC CT (1), amb les PMC KO (2) o únicament

l'explant acinar sembrat sol (3); a dia 5 amb les PMC CT (4), amb les PMC KO (5) o únicament l'explant acinar sembrat sol (6); la imatge a dia 6 del cocultiu on es mostra la distribució de les esferes de cèl·lules epitelials amb les PMC CT (7) o les KO (8); o (9) imatge al mateix temps, del cultiu sembrat amb absència de PMC on es mostra la manca de fibroblasts endògens propis del pàncrees del ratolí. L'escala gràfica mostra l'augment indicat. **B)** Gràfica del nombre total d'esferes quantificades a dia 3 dels cultius dels explants acinars sembrats sols (gris) o en cocultiu amb les PMC CT (negre) o les PMC KO (groc). Les barres mostren la mitjana dels valors obtinguts en dos experiments independents. La barra d'error mostra la desviació estàndard de les dades obtingudes. Un asterisc indica $p < 0,05$.

Seguint amb la caracterització d'aquests cultius, es va realitzar una immunofluorescència contra l'E-cadherina que va permetre classificar les esferes segons la mida en: petites (fins a 40 μm), mitjanes (entre 40 i 80 μm) i grans (més de 80 μm). Es pot observar a la figura R-31 A com en les esferes més grans la E-Cadherina s'observa més definida tot resseguint la perifèria de cada una de les cèl·lules epitelials que la formen. Cal remarcar que les esferes de més de 80 μm no es van detectar en els cultius on l'explant acinar es va sembrar en absència de cèl·lules mesenquimals. A més, el nombre d'esferes grans va ser lleugerament superior quan el cocultiu es va realitzar amb les PMC que expressaven Snail1 (Fig. R-31B).

Aquestes dades suggerien que les PMC són importants per la formació d'aquestes esferes a partir de cèl·lules acinars primàries, aïllades de ratolins CT i sembrades en cultiu 3D; d'altra banda, sembla que l'expressió de Snail1 afavoreix el creixement d'aquestes estructures epitelials.

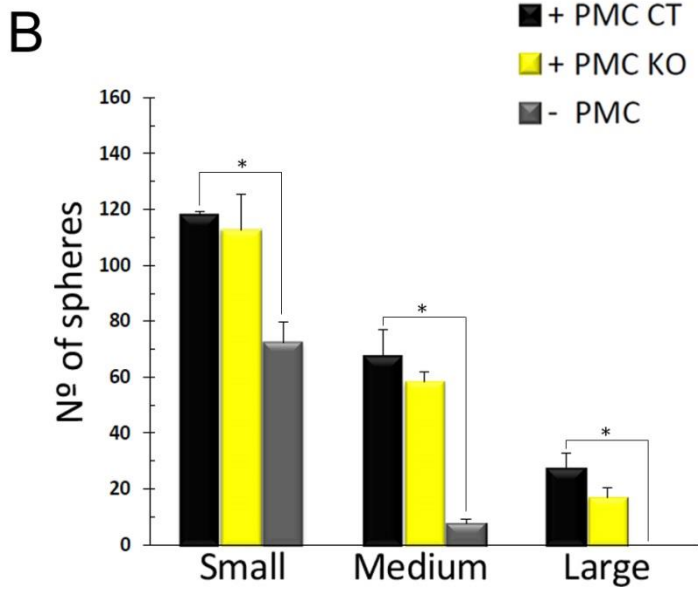
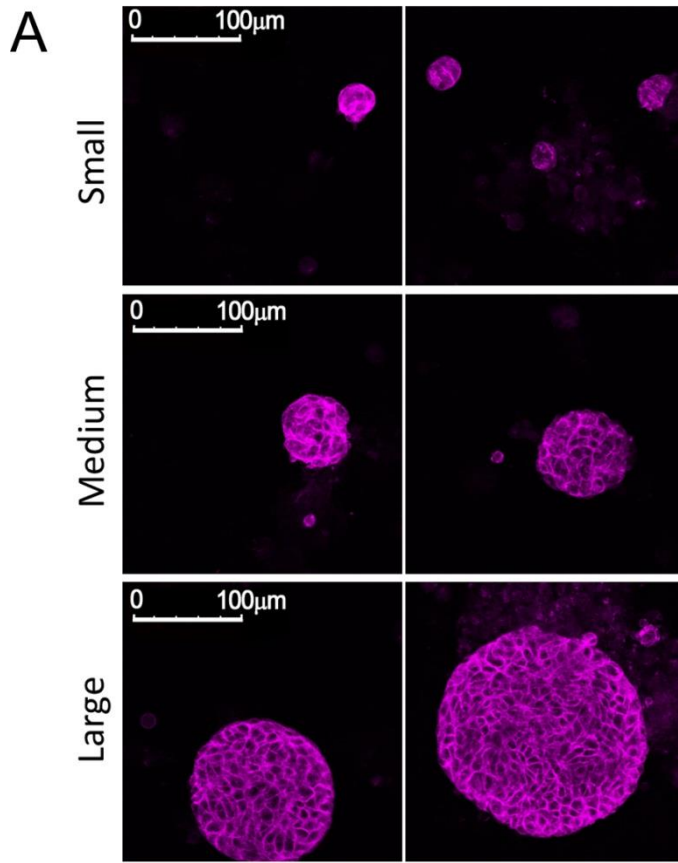


Figura R-31: Les esferes més grans no es detecten en els cultius dels explants acinars sembrats en absència de cèl·lules mesenquimals del pàncrees i són lleugerament més abundants en el cas dels cocultius amb cèl·lules mesenquimals que expressen Snail1: Classificació segons la mida de les esferes observades el tercer dia de cultiu amb presència de PMC CT, KO o en absència de cèl·lules mesenquimals. **A)** Imatge representativa de les diferents mides de les esferes: petites ($> 40 \mu\text{m}$), mitjanes (entre 40 i $80 \mu\text{m}$) i grans ($< 80 \mu\text{m}$) tenyides per immunofluorescència amb l'anticòs contra l'E-cadherina. L'escala gràfica mostra la mida indicada. **B)** Gràfica de la classificació segons la mida dels cultius a dia 3 a les tres condicions analitzades: +PMC CT (negra), +PMC KO (groc) i -PMC (gris). Les barres mostren la mitjana del recompte de tres experiments realitzats de forma independent. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dades obtingudes. Un asterisc indica $p < 0.05$.

7.3 L'expressió de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees millora el manteniment dels marcadors acinars dels explants acinars en cultiu.

Per últim, per tal d'esbrinar si l'expressió de Snail1 en les PMC era capaç de mantenir els marcadors acinars en aquestes estructures esfèriques cultivades "*in vitro*", es va analitzar l'expressió d'amilasa i de CK19 mitjançant immunofluorescència i es van classificar segons la intensitat de tinció com alta, mitjana o baixa (Fig. R-32A). Un cop analitzades i classificades es va poder observar com la presència d'amilasa era superior en les esferes de mida més petita que en les de mida més gran, per contra aquestes últimes eren enriquides en CK19 (Fig. R-32B). Aproximadament el 64% de les estructures petites eren fortament positives per amilasa i només el 19% ho era per CK19; en canvi el 10% de les esferes grans presentaven una alta expressió d'amilasa i el 44% alta expressió de CK19. En comparar les esferes cocultivades amb les PMC CT, un total de 426, o amb les PMC KO, 376, es va poder observar que la falta de Snail1 en aquestes cèl·lules mesenquimals feia augmentar l'expressió de CK19 alhora que disminuïa l'expressió d'amilasa en totes les esferes analitzades; per exemple, el percentatge del nombre d'esferes amb alta expressió d'amilasa disminuïa al ser cocultivades amb presència de les PMC KO en comptes de les CT del 65% al 18%, del 38% al 6% i de l'11% a 0 en petites, mitjanes i grans respectivament. Per contra, el percentatge d'esferes amb alta expressió de CK19 augmentava del 19% al 40%, del 34% al 39% i del 43% al 61% respectivament en petites, mitjanes i grans.

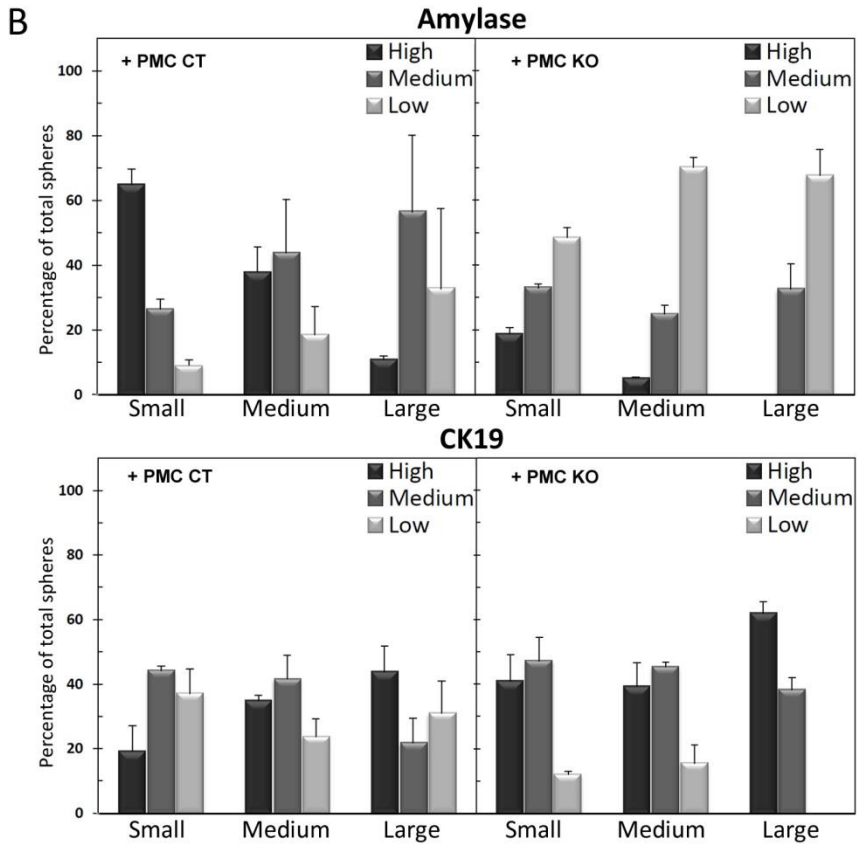
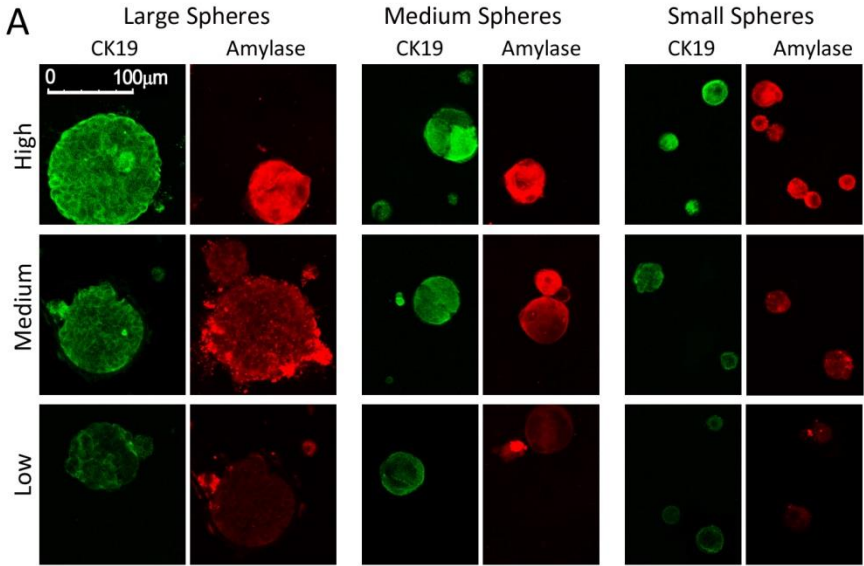


Figura R-32: L'expressió de Snail1 a les PMC en cocultiu amb els explants acinars en retarda la pèrdua de marcadors acinars. Classificació segons la intensitat de tinció d'amilasa o CK19 de les esferes petites, mitjanes i grans observades el tercer dia de cultiu amb presència de PMC CT o KO per Snail1. **A)** Imatge d'un exemple representatiu de les esferes grans, mitjanes o petites tenyides amb els anticossos contra amilasa (vermell) o CK19 (verd). **B)** Gràfiques del percentatge d'esferes cocultivades amb les PMC CT (**esquerra**) o PMC KO (**dreta**) classificades per mida i per intensitat d'expressió d'amilasa (**a dalt**) o CK19 (**a baix**). Les barres mostren el percentatge de la mitjana de 2 experiments realitzats de forma independent. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dades obtingudes.

Així doncs, aquests resultats suggereixen que la presència de Snail1 en les PMC contribueix a un millor manteniment del fenotip acinar en les cèl·lules del pàncrees en cultiu, fent augmentar el nombre global d'esferes amb una alta expressió d'amilasa en ser comparades amb les esferes formades en presència de les PMC KO amb el gen de Snail1 deplecionat.

8. LA DELECIÓ DE SNAIL1 EFECTE EL FENOTIP DELS TUMORS DE PÀNCREES.

Finalment, es va voler determinar si l'expressió de Snail1 afectava el desenvolupament dels tumors de pàncrees.

8.1. Obtenció del model animal: ratolí Ela-Myc KO condicional per Snail1.

Com a model murí de càncer de pàncrees es va utilitzar el ratolí transgènic Ela-Myc generat per Sandgren ¹⁴⁸. Aquesta línia de ratolins expressa l'oncogen c-Myc sota el control del promotor de l'elastasa, proteïna específica de les cèl·lules acinars: desenvolupa de forma espontània, entre els dos i cinc mesos d'edat, tumors de pàncrees en el 100% dels casos ¹⁴⁹. Aquests ratolins manifesten inicialment una hiperplàsia severa a l'edat d'un mes, i presenten tumors acinars als dos mesos d'edat. Una característica especial d'aquesta línia de ratolins és que entre els tres i sis mesos d'edat aquests animals presenten tumors de tipus mixt, és a dir, malgrat l'origen dels tumors és genèticament acinar, en el mateix tumor podem trobar àrees de carcinoma acinar i àrees d'adenocarcinoma ductal (Fig. R-33). La generació de tumors ductals està precedida per una metaplàsia acinar-ductal, un procés de transdiferenciació que també té lloc en adenocarcinomes de pàncrees humans ¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

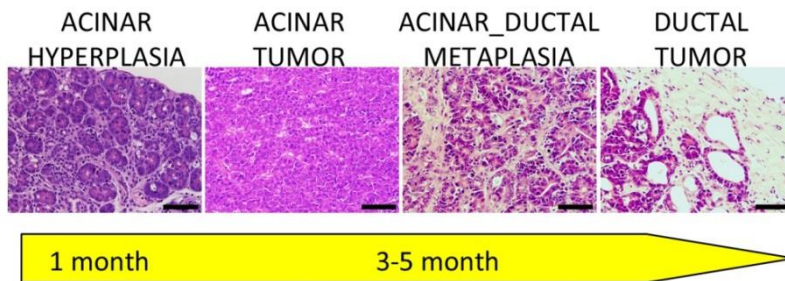


Figura R-33: Procés de tumorogènesi de la línia Ela-Myc KO condicional per Snail1. Imatges de les seccions dels pàncrees tenyits amb hematoxilina-eosina que mostren la histologia de la cronologia típica del procés de tumorogènesi dels tumors pancreàtics desenvolupats en la línia Ela-Myc. Els pàncrees d'aquesta línia de ratolins desenvolupen hiperplàsia acinar a l'edat d'1 mes, entre els 3 i 6 mesos d'edat trobem tumors de tipus mixt on part dels carcinomes acinars desenvolupen una metaplàsia que dona lloc a àrees d'adenocarcinomes ductals. L'escala gràfica indica 100 µm.

Per tal d'estudiar el paper de Snail1 en el procés tumoral del pàncrees es va creuar el ratolí Ela-Myc amb el nostre ratolí KO condicional per Snail1. Amb aquests creuaments (especificats a la figura MM-5, de materials i mètodes) es van obtenir camades de ratolins que expressaven l'oncogen c-Myc i la recombinasa CRE. Aquests ratolins que tenien el gen de Snail1 amb un dels al·lels "wild type" i l'altre floxejat van ser utilitzats com a control, anomenats a partir d'ara (CT), i els que tenien un al·lel del gen de Snail1 floxejat i l'altre deletat van ser utilitzats com a "knock out" per Snail1, anomenats, (KO). Tots els animals (CT i KO) utilitzats en els experiments per estudiar el paper de Snail1 en el procés tumoral del pàncrees van ser tractats prèviament amb TAM.

Per a realitzar el següent experiment es va induir la deleció de Snail1 quan els ratolins tenien dos mesos i mig, moment en què els tumors començaven a ser detectats per palpació. Un mes després de l'administració de TAM, es van sacrificar els animals i es va analitzar tant la mida com la histologia dels tumors.

8.2. Snail1 s'expressa a l'estroma dels tumors pancreàtics dels ratolins control, al voltant de les àrees de fenotip acinars.

El primer que es va realitzar va ser una immunohistoquímica utilitzant l'anticòs de Snail1 per tal de determinar l'expressió de Snail1 en els tumors del nostre model animal. Es pot observar a la figura R-34 com algunes cèl·lules mesenquimals expressen Snail1; aquestes cèl·lules es localitzen a l'estroma situat al voltant d'àrees de tumor de fenotip acinar. D'altra banda, com era d'esperar no es va detectar expressió de Snail1 als tumors dels ratolins KO.

Snail1

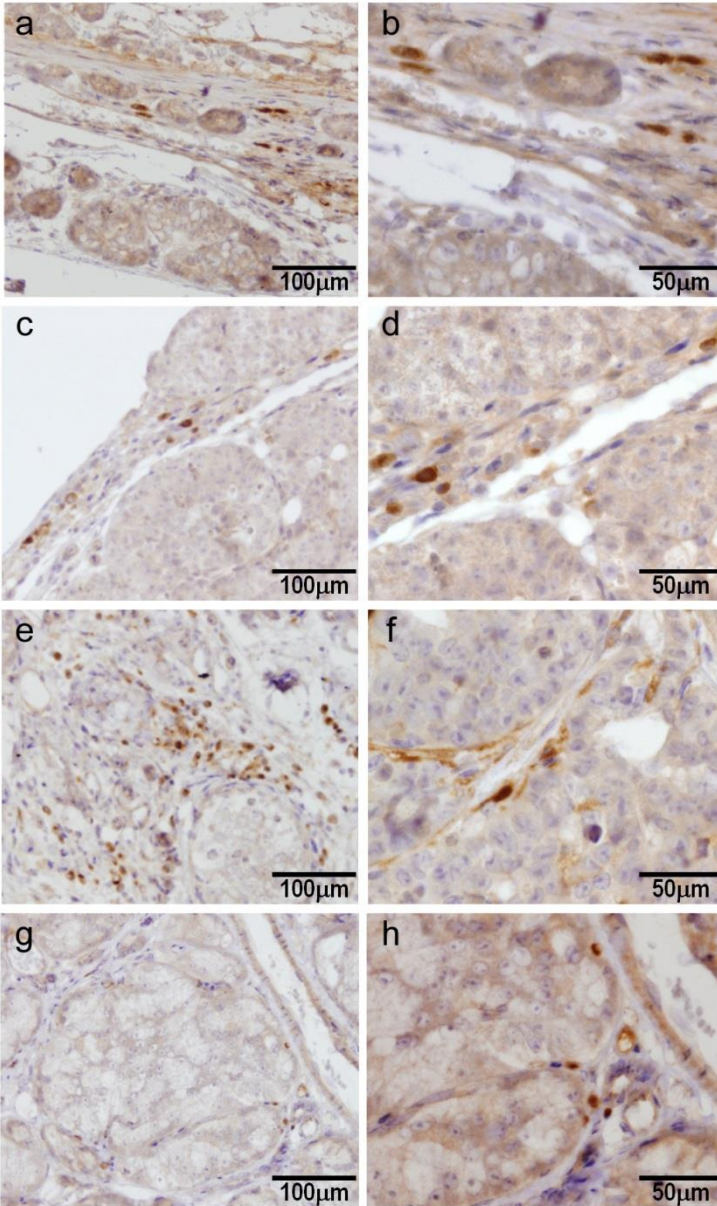


Figura R-34: Snail1 s'expressa a les cèl·lules mesenquimals de l'estroma que rodeja les àrees de tumors acinars en els ratolins CT. Imatges de seccions de diferents tumors dels ratolins CT als tres mesos i mig d'edat tenyides per immunohistoquímica utilitzant l'anticòs de Snail1. A la dreta una magnificació de les imatges de l'esquerra. L'escala gràfica mostra la mida indicada.

8.3. Els tumors dels ratolins KO no presenten diferències significatives ni en el volum ni en el pes respecte dels tumors dels ratolins CT.

Un cop deletat el gen de Snail1 i sacrificats un mes més tard els animals, se'ls va extreure els tumors i se'n va mesurar el pes i el volum. En comparar els tumors dels animals CT amb els dels KO no es van observar diferències en la morfologia a nivell macroscòpic (Fig. R-35A). Tampoc es van detectar diferències significatives ni en el volum ni el pes d'aquests tumors al comparar els que provenien dels animals CT amb els que provenien dels animals KO.

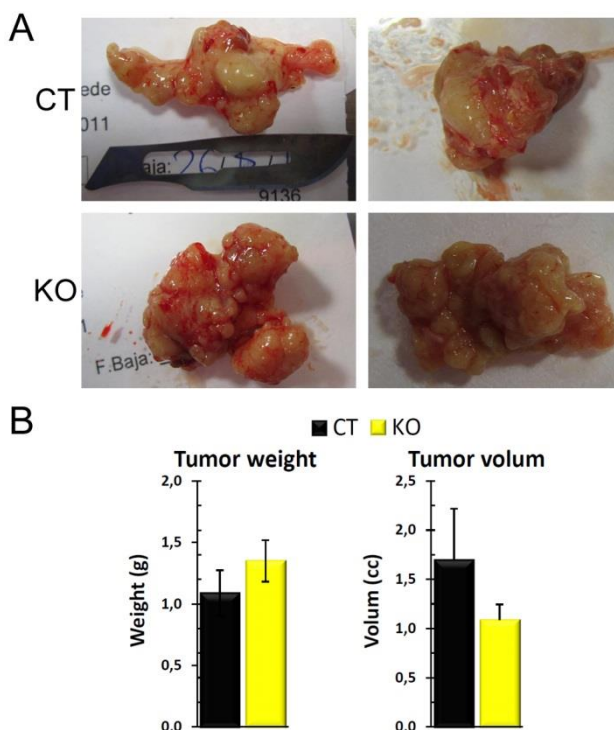


Figura R-35: Els tumors dels ratolins KO no presenten diferències significatives a nivell macroscòpic al ser comparats amb els tumors dels ratolins CT. Caracterització a nivell macroscòpic dels tumors de pàncrees dels ratolins CT i KO per Snail1 als tres mesos i mig d'edat. **A)** Imatge representativa de dos tumors de pàncrees dels ratolins CT i KO. **B)** Gràfiques del volum i del pes dels tumors de pàncrees dels ratolins CT i KO. Les barres mostren la mitjana de les dades obtingudes de 13 tumors CT i 13 KO analitzats. Les barres d'error mostren la desviació estàndard de les dades obtingudes.

8.4. Els tumors dels ratolins CT tenen un major component acinar i els dels ratolins KO tenen un major component ductal.

Per tal de continuar amb la caracterització d'aquests tumors es va quantificar el percentatge d'àrees acinars i ductals en els tumors dels ratolins CT i KO per Snail1. Per visualitzar la histologia característica de cada tipus de tumor es van realitzar tincions amb hematoxilina-eosina (Fig. R-36 (a-b)) de les seccions dels diferents tumors obtinguts, alhora que es van realitzar immunohistoquímiques contra l'amilasa i la CK19 per tal de facilitar la identificació de les zones de carcinoma acinar i d'adenocarcinoma ductal respectivament (Fig. R-36 (c-d)).

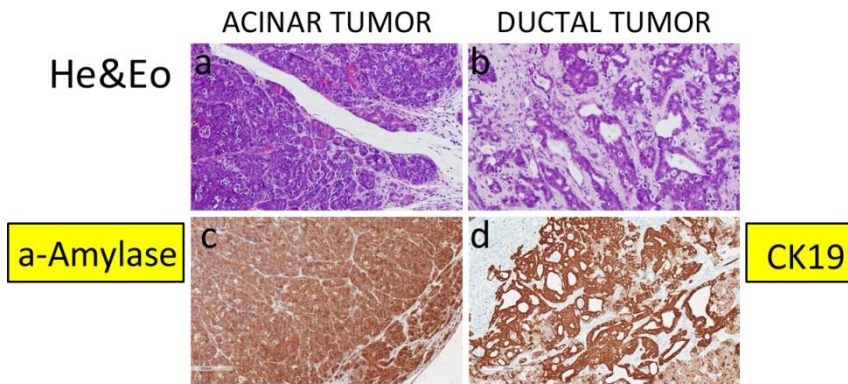


Figura R-36 Histologia característica de les àrees de carcinoma acinar i d'adenocarcinoma ductal dels tumors de pàncrees del model Ela-Myc. Identificació de la histologia de les àrees dels tumors acinars i tumors ductals. **a i b)** Imatges de les tincions amb hematoxilina-eosina de les seccions de tumors amb histologia típicament acinar i ductal respectivament. **c)** Imatge de la tinció amb l'anticòs contra α -amilasa d'una regió d'un tumor acinar **d)** Imatge de la tinció amb l'anticòs contra CK19 d'una regió d'un tumor ductal.

En quantificar les diferents seccions dels tumors, les àrees identificades amb hiperplàsia acinar es van incloure dins del "fenotip acinar" mentre que el "fenotip ductal", en aquest estadi de desenvolupament, van ser principalment format per zones de metaplàsia acinar-ductal i ocasionalment zones d'adenocarcinoma ductal diferenciat.

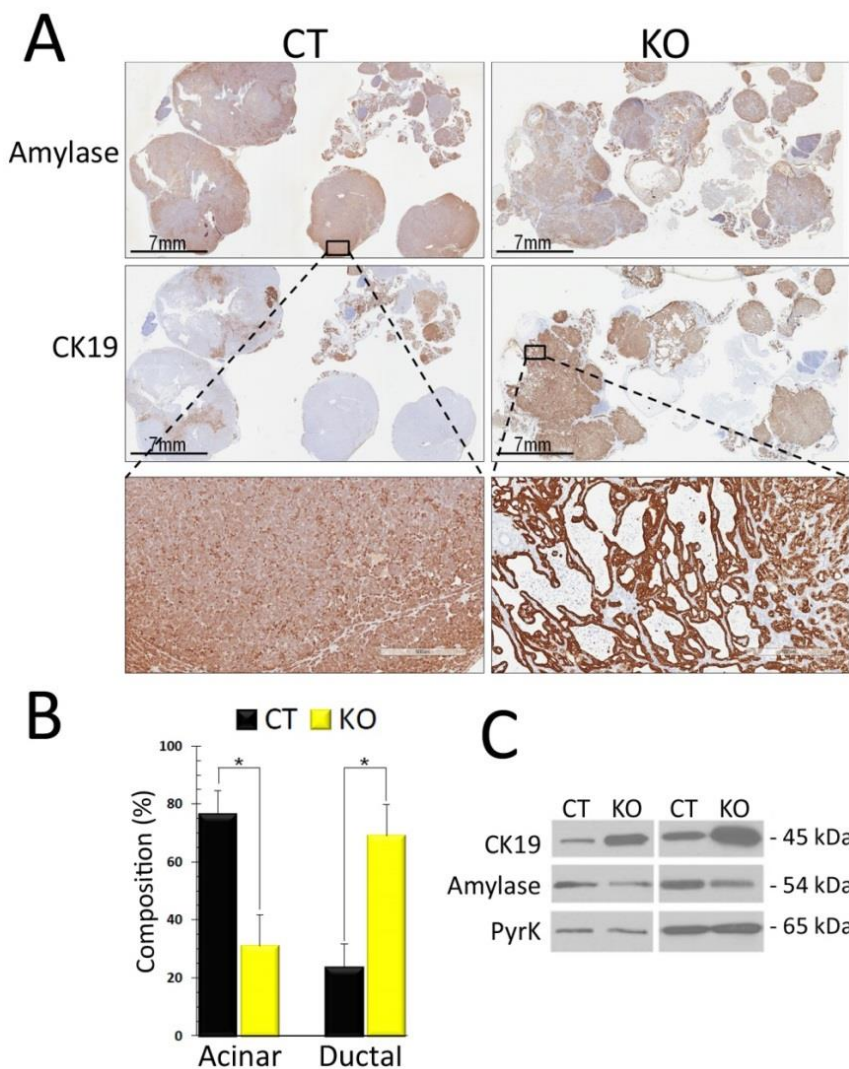


Figura R-37: L'expressió de Snail1 contribueix al manteniment del fenotip acinar en els tumors dels ratolins CT. Identificació i quantificació de les àrees dels tumors de fenotip acinar, on s'inclouen les zones amb hiperplàsia acinar i les zones de carcinoma acinar o de fenotip ductal, on s'inclouen les zones de metaplàsia acinar-ductal i les zones d'adenocarcinoma ductal. **A)** Imatges de les seccions d'un tumor d'un ratolí CT i un de KO tenyides mitjançant immunohistoquímica contra amilasa o CK19, imatges magnificades de les àrees corresponents a zones acinars o ductals. L'escala gràfica mostra la mida indicada. **B)** Gràfica del percentatge de la composició dels tumors dels ratolins CT o KO per Snail1. Les barres mostren la mitjana dels percentatges obtinguts de 13 tumors analitzats. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard de les dades obtingudes. Un asterisc indica $p < 0,05$. **C)** Anàlisi per WB dels extractes proteics totals de tumors dels ratolins CT i KO, utilitzant els anticossos contra amilasa, CK19 i PyrK com a control de carrega.

Tot i no observar diferències a nivell macroscòpic, després de quantificar totes i cada una de les àrees dels tumors analitzats, sí es van trobar diferències a nivell cel·lular. Es pot observar a la figura R-37A i B, com el percentatge de tumors amb característiques acinars era molt més elevat en els tumors dels ratolins CT comparat amb els tumors dels ratolins KO; contràriament, els ratolins amb el gen de Snail1 deletat (KO) el fenotip predominant era el ductal (metaplàsia acinar-ductal o adenocarcinoma ductal).

Per tal de completar la quantificació obtinguda, es van analitzar per WB els extractes totals de proteïnes obtinguts dels diferents tumors CT i KO. Es pot observar a la figura R-37C com l'amilasa està enriquida en els tumors derivats dels ratolins CT comparat amb els dels ratolins KO, mentre que els tumors obtinguts d'aquests ratolins presentaven nivells més elevats de CK19.

Per tant, i d'acord amb el d'escrit anteriorment, Snail1 és requerit pel manteniment dels acinis i la deleció de Snail1 afavoreix la progressió del carcinoma acinar cap adenocarcinoma ductal mitjançant l'increment de la metaplàsia acinar-ductal

DISCUSSIÓ



El repressor transcripcional Snail1 ha estat descrit principalment com el responsable de la inducció de la transició epiteli-mesènquima. La funció de Snail1 s'ha associat principalment al desenvolupament embrionari primerenc, concretament en la gastrulació i la delaminació de la cresta neural²⁶⁻¹¹²⁻¹¹³. L'expressió de la proteïna Snail1 s'ha detectat en algunes cèl·lules del mesoderma, de l'endoderma parietal, dels arcs branquials, al cartílag, al mesènquima pulmonar o en cèl·lules mesenquimals de la pell embrionària i a la dermis, prop dels bulbs del pèl⁷⁷, on s'ha demostrat que té un paper en la morfogènesi del fol·licle pilós cutani⁴². També es troben cèl·lules positives per Snail1 en el teixit extraembrionari tant en les primeres etapes del desenvolupament com en la placenta. D'altra banda, l'expressió de Snail1 en teixit adult es veu limitada a un conjunt de cèl·lules mesenquimals sense saber-se molt bé quina és la seva funció¹³⁶. Es troben cèl·lules positives per Snail1 en condrocits, en cèl·lules satèl·lit localitzades entre les fibres musculars, en cèl·lules del mesènquima pulmonar, en fibroblasts de la pell o en les cèl·lules mare del moll de l'os⁷⁷⁻¹³⁶. Estudis realitzats en el nostre laboratori indiquen que Snail1 es requereix pel manteniment del fenotip més indiferenciat de les cèl·lules mare del mesènquima. Snail1 bloqueja la diferenciació de les cèl·lules mare del moll de l'os cap a adipòcits, osteoblast o miotubs, però en canvi, la seva expressió és necessària per a la diferenciació d'aquestes mateixes cèl·lules a condrocits¹³⁶. L'expressió de Snail1 també proporciona a les cèl·lules altres propietats, ja que millora la seva resistència a la mort cel·lular⁶⁷⁻¹⁵², genera propietats "stem" en les cèl·lules del càncer de mama¹⁵³⁻¹⁵⁴, i fins i tot en cèl·lules de melanoma Snail1 és capaç d'induir mecanismes que permeten escapar del control del sistema immunitari¹⁵⁵. D'altra banda, l'ús de ratolins en un assaig "in vivo" de la cicatrització d'una ferida a la pell va demostrar presència de Snail1 en els fibroblasts que migren activament⁷⁷.

En aquest treball s'evidencia una nova funció de Snail1 en el teixit adult, concretament i per primera vegada, es descriu un paper rellevant en el pàncrees, ja que l'absència de la seva expressió provoca dràstics canvis en la morfologia d'aquest òrgan. Per tal d'estudiar el paper de Snail1 en el teixit adult s'ha generat un KO condicional per Snail1 com a model animal. Aquest ratolí transgènic expressa la recombinasa CRE sota el

promotor d'expressió ubiqua que permet la deleció de Snail1 mitjançant l'administració de tamoxifè (TAM).

Estudis no inclosos en aquesta memòria, realitzats amb aquest model mostren com la deleció de Snail1 als 20 dies d'edat afecta greument el creixement dels animals. Aquests ratolins tenen un dèficit en el nombre de cèl·lules mare mesenquimals del moll de l'os i són més petits, amb un menor pes que els germans de camada control. En examinar els ossos, la longitud de la diàfisi del fèmur en els ratolins KO va ser també menor en comparar-los amb els germans de camada control (dades de la Dra. R. Batlle). Aquestes observacions, juntament amb els elevats valors de fosfatasa alcalina obtinguts en les analítiques de sèrum suggereixen una possible alteració del metabolisme ossi, i una deficiència en la generació d'os o múscul.

Com es demostra en aquesta tesi, l'expressió de Snail1 en les cèl·lules mesenquimals del pàncrees és necessària per al manteniment de l'estructura normal del pàncrees. La deleció de Snail1 provoca la ràpida pèrdua de les cèl·lules acinars i la seva substitució per adipòcits. Un reemplaçament similar de cèl·lules acinars per adipòcits s'ha observat en altres models de ratolins transgènics, tot i que aquesta substitució no és tan ràpida, sinó que requereix un període de temps més prolongat. Per exemple, la inhibició de la senyalització de TGF- β a les cèl·lules acinars per l'expressió constitutiva d'un mutant dominant negatiu del receptor de TGF- β indueix la pèrdua dels acinis, l'aparició d'estructures ductals i la substitució progressiva per adipòcits que apareix als cinc mesos d'edat ¹³⁵. La pèrdua de cèl·lules acinars i l'acumulació d'adipòcits en animals d'avançada edat (10 mesos) també s'ha observat en ratolins amb una inactivació de c-Myc a les cèl·lules progenitores del pàncrees positives per PDX-1 ¹⁵⁶. En analitzar l'expressió de c-Myc en el nostre model s'observa com les cèl·lules acinars de pàncrees CT expressen aquest factor mentre que la seva expressió es perd en els pàncrees KO una setmana després de l'administració de tamoxifè. Només les cèl·lules acinars que encara estan intactes expressen aquest marcador (dades no mostrades). Els experiments realitzats amb rastreig del llinatge genètic cel·lular per Herrera et al en el model de deleció de c-Myc indiquen que les cèl·lules adiposes s'obtenen directament de la transdiferenciació de

les cèl·lules acinars ¹⁵⁶. Aquesta transició epiteli-mesènquima també s'observa en ratolins d'avançada edat i en processos de pancreatitis ¹⁵⁷⁻¹⁵⁸.

Recentment s'ha descrit un canvi dràstic en la mida del pàncrees i en l'aparença de les cèl·lules de greix amb la inactivació de la via de Hippo mitjançant la deleció de *Mist1/2* a l'inici del desenvolupament del pàncrees. Aquesta via està formada per una cascada de quinases, entre elles *Mist1/2*, *Latz 1* i *2*, que finalitza amb la fosforilació de *Yap*, que queda retintut al citoplasma on és degradat pel proteosoma. En absència de fosforilació, *Yap* s'acumula en el nucli de gairebé totes les cèl·lules exocrines i estimula l'expressió de gens necessaris per a la proliferació cel·lular. Els resultats del mutant van sorprendre al trobar que la massa total de pàncrees era menor que l'observada en els controls. Aquests resultats apunten a un fenotip autodigestiu a causa de l'absència d'un sistema ductal continu (és a dir, la manca de conductes intercalats que alimenten la xarxa de conductes més grans) que condueix a la autoactivació dels enzims digestius pancreàtics i la necrosi dels teixits. ¹⁵⁹. Una pèrdua de les cèl·lules acinars també s'ha observat recentment en ratolins amb una deleció de *IKK α* en les cèl·lules epitelials del pàncrees ¹⁵⁷. Aquesta pèrdua s'acompanya amb trets característics de la pancreatitis, com la inflamació i l'alliberament circulatori dels enzims pancreàtics.

Pel que fa a aquestes línies transgèniques, el nostre model mostra diferències significatives. En primer lloc, es basen principalment en la inactivació constitutiva del gen *diana* usant una recombinasa *Cre* sota el control del promotor del gen *PDX-1*, actiu en les cèl·lules progenitores del pàncrees durant el desenvolupament. En els nostres experiments la deleció de *Snail1* es realitza en animals adults i l'aparició del fenotip s'accelera notablement respecte a altres models, ja que es detecten cèl·lules adiposes dues setmanes després de la deleció de *Snail1*, sent aquestes cèl·lules predominants al cap d'un mes. Les cèl·lules acinars es perden ràpidament mentre es conserven els ductes; en realitat, a temps més llargs (quatre setmanes) molt poques cèl·lules acinars es mantenen i la majoria de les cèl·lules epitelials que resten són cèl·lules ductals positives per *CK19*. D'altra banda encara que s'observa una pèrdua acinar

i una acumulació de fibroblasts no es detecten altres característiques clàssiques de la pancreatitis com l'augment sistèmic d'enzims digestius. També d'acord amb altres models animals, els illots no es troben compromesos per la deleció de Snail1 i no es mostra cap alteració en la seva estructura o funció.

Malgrat la baixa taxa de renovació de les cèl·lules pancreàtiques en el pàncrees adult, aquest teixit té la capacitat de regenerar-se després d'una lesió, ja sigui després d'una pancreatitis ¹⁶⁰⁻¹⁶², d'una extirpació quirúrgica ¹⁶³⁻¹⁶⁴, o com succeeix en el nostre model, després d'una ràpida desestructuració del teixit exocrí com a conseqüència de la deleció de Snail1. Tot i que es coneix molt sobre els mecanismes que governen la diferenciació cel·lular durant el desenvolupament, se sap poc sobre els processos que regulen la renovació cel·lular i l'homeòstasi en l'individu l'adult. Recentment s'ha demostrat que els gens necessaris per a la regulació de la diferenciació durant el desenvolupament fetal no s'utilitzen en la regeneració quan l'òrgan és adult ¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. La recerca de cèl·lules mare adultes en el pàncrees ha estat el principal focus d'interès de molts laboratoris. Alguns autors han proposat l'existència de cèl·lules mare adultes que resideixen a l'epiteli ductal, a l'acinar i als illots. ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

En el nostre model no es coneix de quin tipus cel·lular provenen les cèl·lules acinars que regeneren el pàncrees, si de la duplicació d'alguna de les poques cèl·lules acinars resistents que resten al cap d'un mes de la deleció del gen de Snail1, o si diferencien d'un altre tipus de llinatge cel·lular amb propietats de cèl·lula mare. El que sí que podem confirmar és que després de l'alta taxa d'apoptosi de les cèl·lules acinars (una setmana post TAM), l'expressió residual de Snail1 en algunes PMC és suficient per a augmentar considerablement la proliferació de tots els llinatges cel·lulars, ja siguin cèl·lules acinars, ductals o mesenquimals.

Tot i que no podem concloure res sobre quines són les cèl·lules responsables de la recuperació del teixit exocrí en el nostre model, una possible hipòtesi és que es tracti d'una transdiferenciació de cèl·lules ductals a cèl·lules acinars. Les cèl·lules ductals són més resistents a la falta de Snail1, i si posteriorment rebessin l'estímul necessari provinent de les PMC que expressen Snail1, serien capaces de reparar el teixit

acinar. Una altra opció seria la proposada per Li et al ¹⁵⁷ en la qual el pàncrees es recupera després de la deleció de IKKa mitjançant la proliferació de les cèl·lules acinars. Aquests resultats estan d'acord amb els nostres resultats, en què es pot observar un clar augment de Ki67 en aquestes cèl·lules.

Aquest procés de recuperació s'ha estudiat en altres models animals, per exemple, al delecionar de forma condicional el gen Xbp1 a les cèl·lules acinars del pàncrees adult. Al cap de quatre setmanes, aquests ratolins presenten el pàncrees severament compromès. De la mateixa manera que en el nostre model la gran majoria de cèl·lules acinars pateixen apoptosi, i es produeix una disminució dels nivells d'amilasa i lipasa en sèrum, apareixen adipòcits i els illots es mantenen macroscòpicament normals. Dotze setmanes després, aquests pàncrees es troben totalment recuperats; la resposta regenerativa involucra tant cèl·lules acinars com centroacinars ¹⁷⁰. Altres autors asseguren que la CCK té un paper important en la regeneració del pàncrees exocrí després d'una lesió pancreàtica ¹⁷¹.

En el model que presentem Snail1 es detecta en les cèl·lules mesenquimals i mai en les cèl·lules epitelials. No obstant això, el fet que el gen de Snail1 també s'elimini en aquestes cèl·lules impedeix descartar la possibilitat que el fenotip observat pogués ser parcialment degut a un defecte en les cèl·lules acinars. Tanmateix, observacions no publicades indiquen que el pàncrees de ratolins amb deleció de Snail1 específicament en l'epiteli pancreàtic no mostra cap fenotip; aquests ratolins han estat obtinguts per l'eliminació de Snail1 mitjançant una CRE expressada sota el promotor de p48 (FX Real, comunicació personal), un factor de transcripció específic del compartiment exocrí ¹⁷².

Per tal de descartar definitivament que el fenotip observat en el nostre model no es a causa de la deleció de Snail1 a les cèl·lules acinars i per reafirmar que es deu a la deleció a les PMC, en el nostre laboratori s'estan desenvolupant dues noves línies de ratolins transgènics. En primer lloc, un ratolí KO condicional de Snail1 que expressa la recombinasa CreERTM sota el promotor de Ptf1a, igual que el comentat anteriorment (p48-CRE), però en aquest cas la deleció es realitzarà

mitjançant TAM al cap de vuit setmanes d'edat per tal de poder comparar els resultats obtinguts amb el nostre model. En segon lloc, una línia de ratolins KO condicional de Snail1 que expressa la recombinasa CreERTM sota el promotor d'un gen d'expressió específicament mesenquimal, ColA1a. En aquest cas la deleció també es realitzarà mitjançant administracions intraperitoneals de TAM, esperant observar el mateix fenotip que l'obtingut en el nostre model.

Un altre model que recorda al nostre és el ratolí del qual s'elimina l'expressió de Wt1 (Wilms' tumor 1) mitjançant la CRE induïble per TAM sota el control de la β -actina. De la mateixa manera que Snail1, Wt1 també és important durant el desenvolupament embrionari, es requereix en processos de EMT i en l'adult s'expressa en molt pocs teixits en un petit percentatge de cèl·lules mesenquimals, com les cèl·lules estrellades hepàtiques i pancreàtiques i les cèl·lules progenitores de la medul·la òssia¹⁷³. Wt1 juga un paper intrínsec en la diferenciació dels osteoblasts. La supressió del Wt1 condueix ràpidament a l'atròfia del pàncrees exocrí amb un augment del nombre de cèl·lules apoptòtiques mentre que el pàncrees endocrí roman en gran part no afectat. Els animals mutants també presenten una pèrdua de greix i d'os¹⁷³. Els autors d'aquest model proposen que l'atròfia pancreàtica sorgeix a través de l'activació de la subpoblació de cèl·lules mesenquimals, les cèl·lules estrellades que expressen Wt1. Les cèl·lules estrellades activades produeixen citoquines¹⁷⁴ i aquestes poden ser responsables de la destrucció de les cèl·lules acinars, a l'invers de la nostra hipòtesi proposada. Tot i això, la similitud entre aquest model i el nostre pot ser deguda a la relació que existeix entre Snail1 i Wt1; aquests dos gens experimenten una dualitat funcional: s'ha demostrat que Wt1 pot unir-se directament a un motiu altament conservat dins del promotor de Snai1 per activar-ne l'expressió gènica, però alhora Wt1 també pot competir amb Snail1 bloquejant el seu paper repressor, activant l'expressió de l'E-cadherina¹⁷⁵.

Les cèl·lules mesenquimals positives per Snail1 són localitzades principalment abraçant els acinis en els pàncrees dels ratolins control. Entre els marcadors mesenquimals analitzats, l'expressió de Snail1 presenta una distribució similar a la de CD105, la desmina, la vimentina o α SMA. El fet que les tincions de talls seqüencials mostrin com les

cèl·lules positives per Snail1 ho són alhora per CD105 i la facilitat per seleccionar amb el “*sorter*” les cèl·lules que expressen aquest marcador ubicat a la membrana cel·lular, ha fet que hàgim utilitzat CD105 per aïllar les cèl·lules mesenquimals positives per Snail1 (PMC). La deleció de Snail1 no causa canvis significatius en el fenotip ni en la proliferació d'aquestes cèl·lules però afecta selectivament l'expressió de gens específics, com ara COX2, sigui en condicions basals o després de la seva activació per IL-1 α . A part de COX2, l'expressió d'altres gens diana de β -catenina, com AXIN2 o ZEB1 també està disminuïda per la deleció de Snail1. Això és probablement la conseqüència de l'alteració de la distribució de la β -catenina a les PMC, absent als nuclis de les cèl·lules que no expressen Snail1. Diversos estudis descriuen que l'activitat transcripcional de la β -catenina és estimulada per Snail1, almenys en part, a través d'un mecanisme que implica la interacció directa¹⁷⁶ i que Snail1 promou la translocació de la β -catenina al nucli i la conseqüent activació dels gens diana de β -catenina/TCF4⁷²⁻¹⁷⁶.

Les cèl·lules mesenquimals més ben caracteritzades del pàncrees són les cèl·lules estrellades del pàncrees (PaSC, de l'anglès *Pancreatic Stellate Cells*)¹⁷⁴. En el pàncrees normal es considera que aquestes cèl·lules estan en repòs i expressen molt pocs marcadors específics; quan el pàncrees està danyat aquestes s'activen i expressen proteïnes com α SMA. No ha estat possible determinar si les cèl·lules mesenquimals que expressen Snail1 corresponen a les PaSC, ja que no col·localitzen amb la majoria dels putatius marcadors de les PaSC com S100A4, o GFAP. No obstant això, és possible que les cèl·lules que expressen Snail1 corresponguin a un subconjunt de PSC, considerant especialment, la recent publicació en què es descriu un paper d'aquestes cèl·lules en el manteniment de l'arquitectura del pàncrees exocrí¹⁷⁷. Aquests autors demostren que la deleció de la β 1 integrina específicament a les PaSC disminueix l'expressió de la matriu extracel·lular i afecta la interacció de les cèl·lules acinars amb la membrana basal; aquestes alteracions coincideixen amb una menor producció de zimògens, apoptosi i una parcial disminució de la mida de pàncrees¹⁷⁷. Aquests efectes són més lleus que els produïts per la deleció de Snail1, que probablement no es limita a modificar les proteïnes de la matriu extracel·lular; a més, la deleció de la β 1 integrina

no origina l'aparició d'adipòcits en el pàncrees. En qualsevol cas, tots dos estudis indiquen un paper fonamental de les PMC en l'homeòstasi pàncrees.

El pàncrees exocrí pateix un canvi metaplàstic en l'entorn de la pancreatitis crònica i el càncer de pàncrees. En aquestes condicions patològiques el pàncrees canvia d'un teixit on predominen les cèl·lules acinars a un teixit compost predominantment d'epiteli ductal. S'han postulat que aquests conductes metaplàstics poden sorgir com a conseqüència de l'activació de l'epiteli ductal normal per part de les cèl·lules mare pancreàtiques o bé per la transdiferenciació de cèl·lules madures¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. La metaplàsia de les cèl·lules acinars a ductals pot ser recapitulada pel cultiu de l'epiteli del pàncrees "*in vitro*". Quan els explants epitelials exocrins es cultiven dins una matriu apropiada perden els marcadors acinars alhora que incrementen l'expressió de proteïnes ductals¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁻¹⁷⁸. Tot i que s'han utilitzat un ampli ventall de condicions de cultiu que han demostrat la conversió acinar-ductal, no es coneixen els mecanismes moleculars i cel·lulars subjacents.

Quan hem estudiat el paper d'aquestes cèl·lules en cultiu hem pogut observar com les PMC KO per Snail1 són menys capaces de mantenir el fenotip de les cèl·lules acinars quan es cultiven "*ex vivo*". Les cèl·lules primàries del pàncrees són capaces de formar grans esferes quan es cultiven en Matrigel. El nombre i especialment la mida d'aquestes esferes són dependents en gran mesura de la suplementació del cultiu amb PMC. L'expressió de Snail1 en aquestes cèl·lules no afecta el nombre i només lleugerament la mida, però modifica la composició d'aquestes estructures. Sense Snail1 a les PMC, la pèrdua de marcadors acinars es dona abans i especialment les esferes més grans estan totalment desproveïdes de marcadors acinars, com l'amilasa. Aquest resultat suggereix de nou que la deleció de Snail1 impedeix la secreció per part de les PMCs dels factors extracel·lulars necessaris per a la supervivència de les cèl·lules acinars.

Els resultats obtinguts en el model animal tumoral també reforcen la importància de Snail1 en el manteniment acinar. La sobreexpressió de c-Myc a les cèl·lules acinars del pàncrees genera carcinomes que expressen

Snail1 en l'estroma; aquestes lesions mostren cèl·lules neoplàsiques tant acinars com ductals. La proporció d'aquests dos tipus de cèl·lules són dependents de l'edat dels animals. Els tumors inicials presenten una major proporció d'àrees acinars mentre que a temps posteriors s'enriqueixen en estructures de forma ductal com a conseqüència d'un procés de metaplàsia acinar-ductal ¹⁷⁹. Els nostres resultats indiquen que aquest procés de metaplàsia està regulada negativament per Snail1, ja que s'accelera en ratolins deficients per a l'expressió d'aquest gen, sense una alteració significativa en la mida ni en el pes del tumor. Per tant, l'expressió de Snail1 a les PMC és rellevant per mantenir el fenotip acinar no només en animals sans, sinó també en les neoplàsies. És probable que, com es descriu en altres models pel càncer pancreàtic, la deleció de Snail1 a les PMC provoqui una reprogramació de les cèl·lules acinars cap a un fenotip més indiferenciat capaç de transdiferenciar-se a adipòcits ¹⁵⁶ o a cèl·lules ductals ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰⁻¹⁸¹. En qualsevol cas, el mecanisme precís del control de les PMC en el manteniment de les cèl·lules acinars, és a dir, el còctel de citoquines i proteïnes secretades per aquestes cèl·lules mesenquimals necessàries per a aquest control segueix sent una incògnita.

Seria interessant utilitzar el nostre model per estudiar el paper de Snail1 en la fibrosi d'aquest òrgan; com s'ha comentat a la introducció Snail1 induïx EMT tant en condicions fisiològiques com patològiques. En ratolins transgènics adults s'ha vist que Snail 1 promou l'EMT en les cèl·lules dels conductes tubulars i col·lectors dels ronyons induïnt la fibrosi d'aquest òrgan. També s'ha observat expressió de Snail1 en pacients amb fibrosi renal ⁸². Al fetge, l'expressió ectòpica de Snail1 als hepatòcits promou la progressió de la fibrosi ¹⁸². D'altra banda, fora de l'etapa del desenvolupament, Snail1 també està implicat en alguns processos de fibrogènesi no patològics; en el procés del tancament de l'envà auricular, just després del naixement, s'observa expressió de Snail1 nuclear, suggerint que aquest pot seguir exercint un paper en la fibrosi del septe auricular mitjançant la promoció de la producció ECM ¹⁸³. A la pell, durant la cicatrització d'una ferida, l'expressió de Snail1 s'associa a l'activació de fibroblasts, aquests fibroblasts reclutats al lloc lesionat o els propis del teixit connectiu danyat secreten gran quantitat de col·lagen, fibronectina, i altres proteïnes de la matriu extracel·lular per

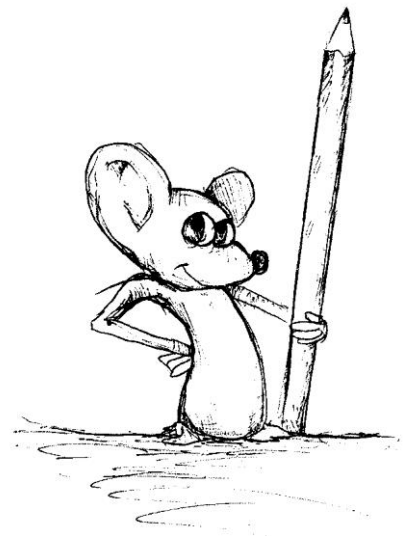
tal de reparar el teixit lesionat ⁷⁷. En comparar els tumors desenvolupats pel ratolí transgènic que sobreexpressa Kras, amb el mateix model que ahora sobreexpressa Snail1 s'observa un augment de la fibrosi en els tumors dels ratolins que sobreexpressaven Snail1 ¹⁸⁴.

En el nostre model de càncer de pàncrees no hem observat tinció de Snail1 a les cèl·lules tumorals, sinó que l'expressió detectada es limita a les cèl·lules de l'estroma. Contràriament, Yang et al en analitzar les mostres de pacients amb càncer de pàncrees observaven una tinció positiva de Snail1 principalment en el nucli i el citoplasma d'una proporció de cèl·lules tumorals i aquesta expressió es correlacionava amb invasió ganglionar i metàstasi ¹⁸⁵. A partir d'aquests resultats varen proposar que Snail1 podria conferir resistència a la quimioteràpia de les cèl·lules del càncer de pàncrees. A més a més, en xenotransplants en ratolins "nude" les cèl·lules transfectades amb Snail1 produïen més metàstasi que les cèl·lules parentals no transfectades, suggerint que Snail1 pot estar implicat en la progressió del càncer de pàncrees i que podria servir com un marcador per predir la malignitat d'aquests tumors després de l'operació ¹⁸⁵.

Altres estudis realitzats en carcinomes de pàncrees humans han mostrat una reducció significativa en els nivells d'E-cadherina i una expressió relativament alta de Snail1 ¹⁸⁶. Hotz i col·laboradors van detectar que el 78% dels teixits d'adenocarcinoma ductal expressaven Snail1, i en analitzar línies de càncer de pàncrees humans van observar com l'expressió de Snail1 era més gran en les línies cel·lulars indiferenciades (MiaPaCa-2 i Panc-1) que en les línies cel·lulars més diferenciades (Capen-1, HPAF-2, ASPC-1) ¹⁸⁷. En aquest mateix estudi van demostrar que Snail1 pot regular l'expressió de marcadors de cèl·lules mare i factors de transcripció per mantenir la pluripotència, la capacitat d'autorenovació i la clonogenicitat, i vam proposar Snail1 com un nou blanc per millorar els efectes biològics dels agents antitumorals i quimiopreventius ¹⁸⁸. Tot i això, aquests estudis han de ser validats, ja que han estat realitzats analitzant l'mRNA de Snail1, el qual no sempre coincideix amb els nivells de proteïna. En qualsevol cas, aquestes evidències suggereixen que Snail1 podria ser una diana útil pel disseny de drogues antitumorals.

Existeixen pocs inhibidors químics directes de Snail1. No obstant això, la inhibició de la inducció de l'EMT per Snail1 ha estat aconseguida amb èxit, amb inhibidors de la LSD (metilasa específica de la lisina) i de la HDAC (histona desacetilasa), així com amb drogues dirigides a bloquejar la interacció de Snail1 amb p53 o amb el promotor d'E-cadherina¹⁸⁹⁻¹⁹⁰. També Lee et al han desenvolupat dos inhibidors químics, GN25 i GN29, que impedeixen la inducció de Snail1 mitjançant K-Ras. En qualsevol cas, els resultats del nostre estudi, que manifesten la importància de Snail1 en l'homeòstasi del pàncrees, suggereixen que alteracions en aquest òrgan podrien ser un efecte secundari comú dels tractaments dissenyats per bloquejar l'acció de Snail1.

CONCLUSIONS



1. L'eliminació del gen Snail1 en el ratolí adult provoca una pèrdua de pes acompanyada de l'absència de greix intraperitoneal i subcutani.
2. Snail és necessari per al manteniment de l'estructura del pàncrees exocrí; la seva manca d'expressió desencadena l'apoptosi de les cèl·lules acinars i la seva substitució per adipòcits.
3. Snail1 s'expressa en cèl·lules mesenquimals del pàncrees situades al voltant de les cèl·lules acinars.
4. La falta d'expressió de Snail1 a les cèl·lules mesenquimals del pàncrees promou l'exclusió de la β -catenina del nucli i la disminució de la transcripció dels seus gens diana tant "in vivo" com en cèl·lules aïllades "in vitro".
5. L'expressió de Snail1 en les cèl·lules mesenquimals del pàncrees contribueix al manteniment de les característiques acinars d'explants pancreàtics en cultiu.
6. En tumors de pàncrees generats als ratolins transgènics Ela-Myc l'expressió de Snail1 a l'estroma afavoreix el manteniment del fenotip acinar.

MATERIALS I MÈTODES



1. MÈTODES RELACIONATS AMB LA MANIPULACIÓ D'ANIMALS

Tots els procediments animals van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) del PRBB (Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona). N^o CEEA: **JMC-07-1001P3-AGH** i N^o CEEA: **AGH-15-1700**

1.1. Manteniment de les línies de ratolins.

Els animals es van mantenir a l'estabulari del PRBB, instal·lacions que garanteixen la salut dels animals en un ambient lliure de patògens (SFP). Els ratolins van ser allotjats en gàbies de plàstic col·locades en racks ventilats, en un ambient amb les condicions de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), d'humitat ($\approx 60\%$) i de llum (cicles de 12 hores) controlats, amb aliment i aigua "*ad libitum*". Després del deslletament (3 setmanes d'edat), se separen les cries en grups de 4 mascles o 5 femelles, i es talla un trosset de cua per extreure'n l'DNA i genotipar per anàlisi de PCR la nova progènie (veure en detall més endavant).

1.1.1 Línia de ratolins KO Condicional per Snail1: Snail flox/del2-B6.Cg-Tg (CAG-Cre/Esr1)5

Per generar la línia de ratolins KO condicional per Snail1 de fons genètic mixt: C57/129, es van realitzar els creuament especificats a la figura R-1, a partir de ratolins fundadors; per una banda els generats i cedits amablement per Gridley, que contenen un al·lel del gen de Snail1 flanquejat per dues seqüències LoxP i l'altre al·lel delecionat¹¹²⁻¹¹⁸, i per altra banda, cedit amablement per E. Batlle, un ratolí de fons genètic C57BL/6, que expressa sotal el promotor ubic de la β -actina, la recombinasa CRE fusionada a un receptor d'estrogen que respon a TAM,¹¹⁹

Les seqüències LoxP estan situades la primera a 1 Kb "*upstream*" de l'inici de transcripció i la segona dins del segon intró, de manera que la delecio per la recombinasa CRE elimina part del promotor, l'inici de transcripció, el domini de repressió SNAG i el primer dels 3 dits de zinc de la proteïna Snail1. Quan aquesta delecio es dona l'al·lel resultant és anomenat Snail1^{del2} (Fig. MM-1).

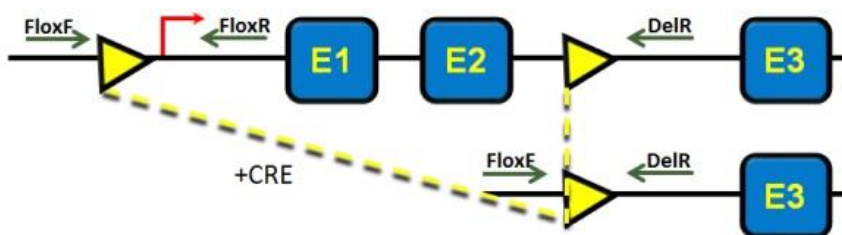


Figura MM-1: Constructe del gen de Snail1 de la línia de ratolins KO condicional per Snail1. Esquema gràfic d'un al·lel del gen de Snail1 floxejat per les seqüències LoxP, o de l'al·lel deletat (del2) producte de la recombinació homòloga de la CRE. Els quadres blaus simbolitzen els tres exons del gen; els triangles grocs, les seqüències LoxP; la fletxa vermella mostra l'inici de transcripció i les fletxes verdes mostren la posició i direcció dels encebadors utilitzats per a genotipar el gen de Snail1.

D'altra banda, per tal de mantenir la qualitat gènica de la colònia, es van realitzar periòdicament "outbreedings" amb mascles "wild type" de fons genètic C57BL/6.

En absència de TAM, la CRE es localitza al citoplasma, el receptor d'estrogen es desestabilitza i la proteïna és degradada pel proteosoma. Un cop administrat el TAM (8-10 setmanes d'edat), aquest és processat pel fetge com a 4H-TAM; d'aquesta manera pot entrar dins les cèl·lules, unir-se al receptor d'estrogen modificat, el que permet que la proteïna es transloqui al nucli i finalment, la CRE delecioni específicament el fragment del gen de Snail1 flanquejat per les seqüències LoxP.

Tots els animals utilitzats per a realitzar els experiments (CT i KO) han estat tractats prèviament amb TAM si no s'especifica el contrari. L'administració de TAM es va realitzar mitjançant 4 dosis intraperitoneals de 0,2 mg de TAM/g de ratolí, alternades cada 48 h. En els experiments indicats, després de quatre setmanes de la primera administració, es van administrar 3 dosis addicionals alternades cada 48 h.

1.1.2 Línia de ratolins Ela-Myc KO Condicional per Snail1: Snail1 flox/del2-B6.Cg-Tg (CAG-Cre/Esr1)5-GT(ROSA)26-Ela-Myc

Per obtenir la línia de ratolins KO Condicional per Snail1 i que alhora desenvolupés espontàniament tumors de pàncrees, es van crear femelles amb els dos al·lels del gen de Snail1 floxejat i que expressaven la recombinasa CRE, amb el ratolí transgènic Ela-Myc. Aquest ratolí, de fons

genètic C57BL/6, expressa sota el promotor de l'elastasa 1 l'oncogen c-Myc¹⁴⁸. Aquest ratolí fundador (**F0**) va ser cedit amablement per P. Navarro. Els mascles de la **F1**, portadors de l'oncogen c-Myc i de la CRE es van tornar a creuar amb femelles amb els dos al·lels de Snail1 floxejats, i que expressaven la CRE. Finalment, els mascles de la **F2** portadors de l'oncogen c-Myc, la CRE i que tenien els dos al·lels del gen de Snail1 floxejats, van ser creuats amb femelles amb un dels al·lels del gen de Snail1 delecionat i que expressaven la CRE. D'aquest últim creuament els mascles i les femelles que expressaven l'oncogen c-Myc i la recombinasa CRE van ser utilitzats per analitzar el paper de Snail1 en els tumors de pàncrees. Després de ser induïts amb TAM, els ratolins amb un dels al·lels wild-type i l'altre floxejat es van utilitzar com a control (CT); i els que tenien un dels al·lels del gen de Snail1 delecionat i l'altre floxejat es van utilitzar com a KO (Fig. MM-2).

Tots els animals van ser induïts amb TAM al cap de deu setmanes d'edat. Catorze setmanes després van ser sacrificats per dislocació cervical per tal d'extreure els tumors i analitzar el pes, el volum, i la composició de la part acinar o ductal, sigui histològicament o a nivell de proteïna.

1.2. Genotipatge dels animals

Durant el deslletament es va tallar un fragment de cua (3-5 mm), se li va afegir 0,5 ml del tampó d'extracció (Tris HCl 20 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0, SDS 0,5%, NaCl 200 mM, proteïnasa K (100 µg / ml, Dako)), i es van incubar a 55°C durant 12 h amb agitació suau. Per extreure el DNA, les mostres es van centrifugar i el sobrenedant es va barrejar amb 0,5 ml de isopropanol per tal de precipitar el DNA. Després de centrifugar es va rentar amb etanol al 70%, el sediment es va deixar assecat i per últim es va resuspendre en 200 µl de tampó TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0). Les reaccions de PCR es van realitzar amb 0,5 U de la polimerasa EcoTaq (ECOGEN). Els encebadors utilitzats per genotipar s'especifiquen a la taula MM-1 i les condicions de la PCR a la taula MM-2. Els productes de la PCR van ser observats en un gel d'agarosa del 1% (Fig. MM-3).

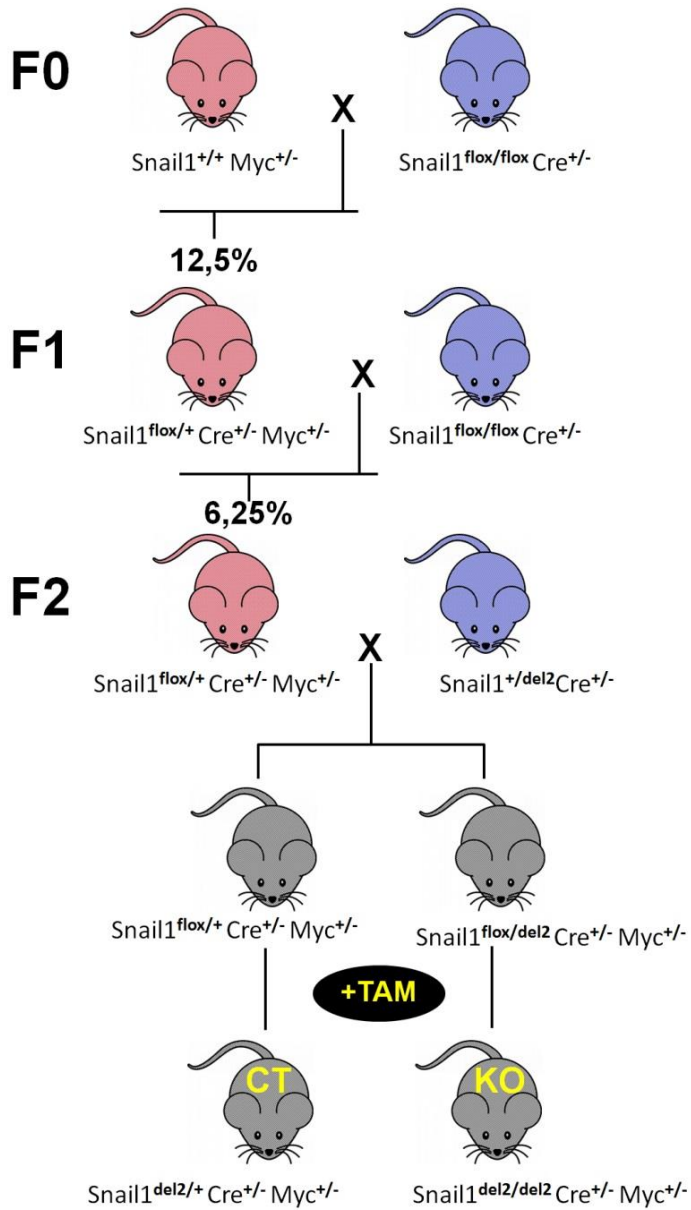


Figura MM-2: Esquema dels creuaments realitzats per obtenir la línia Ela-Myc KO condicional per Snail1. Els ratolins de color vermell representen els mascles, els de color blau les femelles i els de color gris representa un ratolí de qualsevol sexe. Els ratolins indicats com a CT (control) i KO (Knock Out de Snail1) són els utilitzats per l'estudi d'aquesta tesi i tots ells han estat tractats prèviament amb TAM (TAM).

Snail1	FloxF	CGGGCTTAGGTGTTTTCAGA
	FloxR	CTTGCTTGGTACCTGCCTTC
	DelR	CTCTGTGTCCAGTAAGTGCTT
CRE	CAGGS	CTCTAGAGCCTCTGCTAACC
	CRE	CCTGGCGATCCCTGAACATGTCC
Myc	Fw	CACCGCCTACATCCTGTCCATTCAAGC
	Rv	TTAGGACAAGGCTGGTGGGCACTG

Taula MM-1: Encebadors utilitzats en la PCR per genotipar.

Desnaturalització inicial	94°	5 min	x 40 cicles
Desnaturalització	94°	20 seg	
Hibridació	52° a 63°	45 seg	
Extensió	72°	45 seg	
Elongació	72°	5 min	
	4°	pausa	

Taula MM-2: Condicions de la PCR utilitzades per genotipar. Programa utilitzat per a amplificar els diferents al·lels i identificar el genotip dels animals. La temperatura d'hibridació varia segons els encebadors utilitzats: 52°C per amplificar la CRE, 54°C per la banda delecionada del gen de Snail1 (del2), 60°C per amplificar el gen de Snail1 i 63°C per amplificar l'oncogen c-Myc.

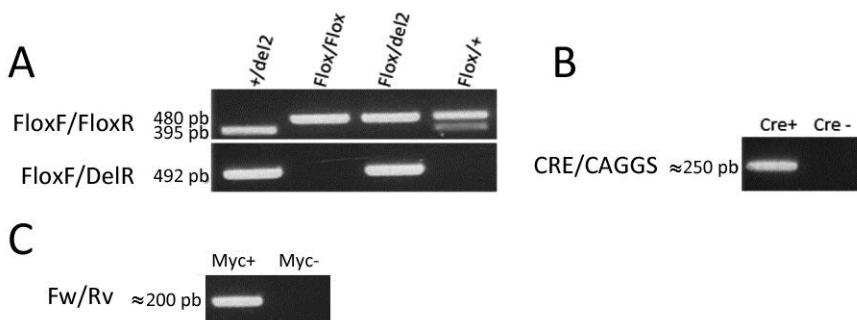


Figura MM-3: Exemple de les bandes obtingudes per PCR dels diferents genotips. Exemple de les bandes obtingudes al genotipar: **A**) el gen de Snail1; la banda de 480 pb s'obté al amplificar l'al·lel de Snail1 floxejat, la banda de 395 pb correspon a l'al·lel "wild type" i la de 492 pb només s'amplifica quan es tracta de l'al·lel delecionat (del2), **B**) la recombinasa CRE, i **C**) el transgen que conté l'oncogen c-Myc.

1.3. Preparació del tamoxifè

El TAM es va dissoldre amb etanol 100% en un volum del 10% (V/V) del volum final, a 37°C en agitació constant. Després es va diluir la solució

obtinguda en oli de blat de moro, prèviament filtrat i escalfat a 37°C, a una concentració final de 20 mg/ml.

1.4 Necròpsies i presa de mostres.

Després de sacrificar els animals per dislocació cervical, es van recollir els diferents òrgans o tumors, els quals van ser pesats i en alguns casos fotografiats. Depenent del posterior anàlisi, els teixits van ser congelats amb nitrogen líquid i guardats a -80°C (per extracció de proteïna) o fixats amb formaldehid 4% i inclosos en parafina (per anàlisi histològic).

1.4.1 Extracció de proteïnes dels pàncrees o tumors pancreàtics i anàlisi per Western Blot:

El teixit ràpidament extret i guardat a -80°C es va descongelar afegint 1 ml de tampó de lisi (Tris HCl 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%) al qual se li va afegir inhibidors de proteases (Complete mini cocktail, ROCHE), i inhibidors de fosfatases (β -glicerol fosfat 1 mM, NaF 10 mM i ortovanadat sòdic 1 mM). La lisi tant del pàncrees normal com dels tumors es va realitzar mitjançant Lysing Matrix D (MP #6913-050) amb pols intercalats de 10 segons a màxima agitació i 30 segons en gel fins a obtenir lisats homogenis. Després es van bullir 5 min a 99°C, es van xeringar 3 cops amb agulles de 18G, 21G, 23G, 25G seqüencialment i finalment es van sonicar durant 10 min alternant 15 segons a màxima intensitat amb 15 segons de refredament.

Els diferents extractes de proteïnes van ser quantificats amb Lowry i analitzats per WB d'acord amb el procediment estàndard. Breument, la proteïna juntament amb el tampó de càrrega (5x: Tris-HCl 250 mM, pH 6.8), SDS 10%, β -mercaptoetanol 20%, bromophenol blue 0.02% i glicerol 50%) es va carregar en gels d'electroforesis de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE) en diferents percentatges i es van córrer en tampó TGS (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3), glycine 192 mM i SDS 5%). Les proteïnes es van transferir durant 1h a 400 mA a una membrana de nitrocel·lulosa amb tampó de transferència (Tris-HCl 50 mM, glycine 386 mM, SDS 0.1% i 20% metanol) i es van bloquejar en tampó TBS-T (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 137 mM, Tween-20 0,1%) amb un 5% de llet (semidesnatada en pols, Central Lechera Asturiana) durant 1 h. L'anticòs

primari es va dissoldre en TBS-T amb un 2% de llet i es va incubar a 4°C durant la nit. Després de tres rentats de 10' amb TBS-T, les membranes es van incubar amb l'anticòs secundari combinat amb peroxidasa (HRP) durant 1 h a temperatura ambient. Després d'una nova ronda de rentats, les membranes es van incubar amb el substrat de l'HRP (ECL) (Enhanced ChemiLuminiscence) i es van exposar amb pel·lícules d'autoradiografia (Agfa-Curix).

Els anticossos utilitzats així com les dilucions utilitzades es mostren a la taula MM-3.

1.4.2 Anàlisi histològic per immunohistoquímica o per tinció amb hematoxilina-eosina dels diferents teixits:

El teixit fixat en formaldehid 4% i inclòs en blocs de parafina es va tallar en seccions de 5 µm per analitzar-ne la histologia mitjançant una tinció amb hematoxilina-eosina i una immunohistoquímica (IHQ). Les seccions col·locades en portaobjectes es van deixar durant la nit en una estufa a 65°C, després es van desparafinar i rehidratar mitjançant una bateria amb les següents solucions: 10 min en xilè 100% (2 vegades) + 5 min en etanol absolut (2 vegades) + 5 min en etanol 96° + 5 min en etanol 70° + 5 min en etanol 50°. La recuperació antigènica es va dur a terme bullint les mostres amb tampó citrat 0,01 M pH 6,0 durant 15 min (per a tots els anticossos) o amb tampó Tris-EDTA pH 9 durant 20 min (per a l'anticòs de Snail1). La inactivació de l'activitat endògena de la peroxidasa es va realitzar incubant amb H₂O₂ al 3% durant 10 min. El bloqueig es va aconseguir amb la incubació a temperatura ambient durant 1 h amb FBS 5%, BSA 1% en TBS-T (per a tots els anticossos) o 2 h amb NGSB 10% (Normal Goat Serum Blocking) (sèrum de cabra 10%, BSA 1%, gelatina 0,1%, Tritó X-100 0,1%, Tween 20 0,05%, azida sòdica 0,05% en PBS, pH 7,2) més 1h amb Fab (Jackson Lab's) 10% en PBS (per a l'anticòs de Snail1). La incubació de l'anticòs primari es va realitzar a 4 °C durant tota la nit. Els anticossos utilitzats i les seves concentracions s'especifiquen a la taula MM-3. Després de 3 rentats de 10 min amb TBS-T, es va incubar amb el reactiu d'Envision anti-Ms (ratolí) o anti-Rb (conill) (Envision System Peroxidase; Dako) o anti-Gt (cabra) HRP (1:200, Dako) durant 1h a T^a ambient. La reacció per a la detecció de l'anticòs primari es va

desenvolupar utilitzant DAB (3,3'-diaminobenzidina) com a substrat cromogènic. La contratació de les seccions es va realitzar amb hematoxilina, després es van deshidratar i muntar amb PDX. La visualització es va realitzar amb el microscopi Olympus BX61 capturant les imatges amb el programa cell^B. La visualització i quantificació de les zones de tumor acinar o ductal es van realitzar escanejant els portaobjectes amb Aperio CS2 (ScanScope®) i utilitzant el programa Image Scope (Leica Biosystems). Els anticossos primaris i les dilucions utilitzades es mostren a la taula MM-3.

		WB	IHQ	IF teixit	IF cèl·lules	IF esferes
Snail1	??	1:5	1:100		tal qual	
active Caspase-3	Cell Signaling (9661S)		1:200	1:100		
α -Amylase	Santa Cruz (SC-49957)			1:100		
α -Amylase	Sigma (A8273)	1:8000	1:500			1:350
β -Actin	ABCAM (ab52614)Lara	1:1000				
β -Catenin	Sigma (C2206)				1:50	
CD105	ABGENT (AP2880c)		1:50			
CK19	Santa Cruz (SC-33111)			1:50		1:100
CK19	ABCAM (ab133496)	1:2000	1:200			
Desmin	DAKO (M0760)		1:35	1:500		
E-Cadherine	Trans. Labs (610182)					1:2000
Glucagon	SIGMA (G2654)			1:1000		
GFAP	DAKO (Z0334)		1:500			
Insulin	Santa Cruz (SC9168)			1:50		
Ki 67	ABCAM (ab21700)		1/3			
Pyruvate Kinase	Chemicon ab1235	1:4000				
p-STAT3	Cell Signaling (#9145)		1/400			
Chymotrypsinogen	Biogenesis	1:3000				
S100A4	Milipore(1072274)		1:500			
SMA	SIGMA (A2547)		1:400			
Vimentin	Santa Cruz (7557)		1:50			

Taula MM-3: Anticossos i dilucions utilitzades per a western blot (WB), immunohistoquímica (IHQ) i immunofluorescència (IF) de teixit, de cèl·lules i d'esferes.

1.4.3 Anàlisi per immunofluorescències del pàncrees:

L'anàlisi per immunofluorescència del teixit del pàncrees es va realitzar de la mateixa manera que la IHQ amb les següents variants: en comptes de la inactivació de les peroxidases endògenes es va eliminar la autofluorescència del teixit deguda a la fixació amb formaldehid mitjançant la incubació amb NH_4Cl 50 mM durant 15 min a Tª ambient. La detecció de l'anticòs es va realitzar mitjançant la unió de l'anticòs

secundari fluorescent Alexa: anti-Rb, anti-Ms o anti-Gt (488, 555 o 647) diluït a 1:500 (Invitrogen). La contrastació dels nuclis es va realitzar amb DAPI i es van muntar els portaobjectes amb Flouromont.

1.5 Analítiques de sèrum

Es van anestesiari els animals amb isoflurà al 3,5%, un cop anestesiats es van mantenir amb isoflurà al 2,5% i se'ls va extreure sang mitjançant una punció intracardíaca, ràpidament es va passar la sang a un tub amb EDTA i es va centrifugar a 2000 g durant 20 min. La fracció sèrica es va congelar fins a la recollida de totes les mostres.

Les analítiques dels diferents paràmetres analitzats de la funció pancreàtica, renal i hepàtica i la dels diferents electròlits van ser realitzades per la unitat de veterinària del Laboratori Echevarne.

1.6 Anàlisi de la glucèmia

L'anàlisi de la glucèmia es va fer en condicions normals (t=0h) i després de 4h de dejú. Es va realitzar un tall a l'extrem final de la cua per tal d'obtenir una gota de sang que es va dipositar sobre la pestanya del glucòmetre (AccuCheck, ROCHE).

2. LÍNIA CEL·LULAR: PMC (Pancreatic Mesenchymal Cells)

2.1 Aïllament de les PMC

Les cèl·lules mesenquimals del pàncrees (PMC) es van aïllar mitjançant una modificació del mètode descrit per Schafer et al. per aïllar cèl·lules estrellades del fetge. (Schafer S, Zerbe O 1987). Breument, es va extreure el pàncrees de 5 ratolins i després de trossejar-los amb l'ajuda d'un bisturí es van digerir amb pronasa al 0,02%, col·lagenasa P al 0,05% i DNasa al 0,1% en GBSS (Gey's Balanced Salt Solution) (CaCl₂ 2 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, MgSO₄ 0,3 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0,2mM, NaHCO₃ 27 mM, NaCl 119,8 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, D-Glucose 5,6 mM, pH 7'5) durant 15 min a 37°C. El teixit digerit es va pipetejar i es va filtrar a través d'una malla de niló de 150 µm. Les cèl·lules es van rentar i es van resuspendre en 1,9 ml de GBSS amb BSA al 0,3%. La suspensió cel·lular es va barrejar amb 1,6 ml de Nycodenz al 28,7% (pes/vol) en GBS sense sal

(Gey's Balanced Solution) (la mateixa composició que GBSS però sense NaCl). El gradient de Nycodenz es va preparar per capes en un tub de centrífuga de 10 ml; primer es va dipositar la suspensió cel·lular en Nycodenz, a continuació es va afegir, molt a poc a poc i per la paret del tub, 1,2 ml de GBS amb BSA. Després de centrifugar durant 20 min a 1400 g, una banda difusa situada a la interfície entre el coixinet de Nycodenz i el GBSS amb BSA, allotjava les cèl·lules d'interès. Aquesta banda es va collir amb cura, i es van rentar les cèl·lules, llavors es van resuspendre amb medi de cultiu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) amb FBS al 10% (Fetal Bovine Serum), L-glutamina a 2 mM, penicil·lina a 100 mg/ml i estreptovidina a 100 mg/ml. Les cèl·lules aïllades es van sembrar amb el mateix medi de cultiu en plaques de 6 pous a una concentració de 50.000 cèl·lules per pou.

El medi **Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)** es va formular per al creixement de limfòcits i d'hibridomes. En comparació amb el medi de cultiu DMEM, té aminoàcids addicionals, vitamines i sals inorgàniques. El nitrat de potassi va ser substituït per nitrat fèrric. També conté Hepes i Seleni.

2.2 Purificació per *sorter* de les PMC CD105 positives

Les PMCs CD105 positives van ser purificades mitjançant un *sorter*. Tot el procés es va realitzar en gel on després de rentar les cèl·lules en PBS es van bloquejar durant 10 min en PBS amb FBS al 10%. Després de centrifugar durant 5 min a 400 g es va descartar el sobrenedant i es van incubar les cèl·lules durant 20 min amb l'anticòs primari CD105 (Endoglin, de ABGENT) diluït a 1/30 en PBS. Després de 2 rentats amb PBS es van incubar durant 20 min amb l'anticòs secundari Alexa anti-Rb diluït 1/200 en PBS. Finalment, després de 2 rentats amb PBS es van resuspendre les cèl·lules amb 500 µl de PBS i es van passar pel *sorter* obtenint una població de cèl·lules mesenquimals del pàncrees positives per CD105 (PMC_CD105+, anomenades al llarg del text com a PMC).

2.3 Infecció retroviral i transfecció

2.3.1 Infecció amb pMXCre i pBABE:

Per tal d'aconseguir la línia de PMC KO per Snail1 es van infectar les PMC positives per CD105 amb el vector pMXCre per deletar el gen de Snail1; com a línia control, es van utilitzar les PMC infectades de la mateixa manera amb el vector pBABE.

Es van transfectar les cèl·lules PlatE, amb els vectors indicats, utilitzant Lipo 2000 (Invitrogen) tot seguint les instruccions del fabricant. El medi de transfecció va ser canviat per medi fresc després de 24 h. A les 48 h el medi condicionat va ser filtrat i després d'afegir-hi polybrene a 8 mg/ml va ser utilitzat per infectar les PMC. Després de 48 h des de la infecció, les dues línies van ser seleccionades amb puromicina (1 µg/ml) obtenint la línia PMC CT, en el cas de la infecció amb pBABE, i les PMC KO en el cas de pMXCre

2.3.2 Transfecció amb pIRES:

Per tal de poder eliminar les cèl·lules mesenquimals endògens amb G418 (0,25 µg/ml) del cultiu de l'explant acinar, es van transfectar amb el vector pIRES les PMC CT i KO per tal de conferir resistència a G418, utilitzant Lipo2000 (Invitrogen) tot seguint les instruccions del fabricant,

2.4 Determinacions de RNA i proteïnes

2.4.1 Extracció i anàlisi de RNA:

Es van sembrar 350.000 cèl·lules en plaques de 100 mm pre-tractades amb gelatina a l'1%, en IMDM amb FBS al 10%, L-glutamina a 2 mM, penicil·lina a 100 mg/ml i estreptovidina a 100 mg/ml. Les cèl·lules es van mantenir a 37°C en atmosfera humida a 5% de CO₂. Un cop enganxades a la placa, es va canviar el medi amb 0,5% de FBS; a les 16 h es van tractar durant 48 h amb 1 ng/ml de IL-1α o durant 8 h i 24 h amb 5 ng/ml de TGFβ. Les plaques es van rentar 2 cops amb PBS, es van lisar les cèl·lules amb 1 ml de TRIZOL®, s'hi va afegir 200 µl de cloroform i es van agitar durant 2 min temperatura ambient. Es van centrifugar a 4°C durant 15 min a 13600 g. El sobrenedant es va passar a un "ependorf"

nou, s'hi va afegir igual volum d'isopropanol i es van deixar 10 min a temperatura ambient. Es van centrifugar a 4°C durant 10 min a 13600 g. Després es va eliminar el sobrenedant i es va rentar el pellet amb 1 ml d'etanol al 70%, es va centrifugar, es va treure l'etanol i es va assecar el pèllet durant 5-10 min a 59°C. Per últim es va resuspendre l'RNA amb 60 µl d'H₂O DEPC.

5 µg de RNA es va retrotranscriure utilitzant els encebadors oligo-dT i el Kit Transcription First Strand cDNA Synthesis (Roche). Els nivells d'RNA es van determinar quantitativament per triplicat per real-time PCR quantitativa (Roche LightCycler®), utilitzant el kit LightCycler 480 SYBR Green (Roche). Totes les quantificacions es van normalitzar per HPRT (Hipopantina guanina fosforibosil transferasa). Els resultats es van donar com a quantificació relativa de cada gen diana en comparació amb l'HPRT, per a aquest objectiu s'expressa com 2^{- (Ct-Cc)} (Ct i Cc són les diferències del cicle llindar mitjà després de la normalització per HPRT). Les reaccions es van realitzar d'acord amb les instruccions del fabricant, utilitzant els encebadors indicats a la taula MM-4.

	Forward	Reverse
Snail1	CTTGTGCTGCACGACCTGT	CTTCTCACCAGTGTGGGTGC
CD105	GCTACTCATGTCCCTGATCCA	TGGAGTCCCAGAAAGTCAGG
Desmin	TGGAGCGTGACAACCTGATA	AAGGCAGCCAAGTTGTTCTC
GFAP	TAAGCTAGCCCTGGACATCG	GGATCTGGAGGTTGGAGAAA
FN1	AGCAAGCCTGAGCCTGAAGAG	GCGATTGCAATGGTACAGCT
Vimentin	GGCTGCGAGAGAAATTGC	TCTCTCATCGTGCAGTTTCTTC
Axin2	CCAAGTGCTCTACCTCATTTTCCG	GGTTTGTGGGTCTCTCATAGC
Akt2	CAAGCGTGGTGAATACATCAAGAC	CTGCTACGGAGAAGTTGTTTAAGGG
Zeb1	TCAGCTGCTCCCTGTGCAGT	AAGGCCTCCCGCATTAGT
c-Myc	GCTGGAGATGATACCGAGT	AACCGCTCCACATACAGTCC
COX2	GGCCATGGAGTGGACTTAA	CTCCACCAATGACCTGATATTTTC
15-HPGD	GTTTTACACCATCAACCATTGC	GGAGGTTAATGGAGCTTTTACGAGT
IL-6	CTGATGCTGGTGACAACCAC	CAGAATTGCCATTGCACAAC

Taula MM-4: Encebadors utilitzats per a realitzar la quantificació de l'expressió de l'RNA.

2.4.2 Extracció i anàlisi de proteïna:

Se sembren 350.000 cèl·lules en plaques de 100 mm en IMDM FBS 10%, L-glutamina 2 mM, penicil·lina 100 mg/ml i estreptovidina 100 µg/ml. Les cèl·lules es mantenen a 37°C en atmosfera humida a 5% CO₂. Un cop enganxades a la placa, es va canviar el medi amb 0,5% de FBS, a les 16 h

es van tractar durant 2 h, 8 h i 24 h amb 5 ng/ml de TGF β . Les plaques es van rentar 2 cops amb PBS i es van lisar les cèl·lules amb 150 μ l de tampó de lisi (Tris HCl 50 mM, SDS 2% i glicerol 10%). Els diferents extractes es van quantificar amb Lowry i es van analitzar per WB com s'ha indicat anteriorment.

2.4.3 Immunofluorescència:

Se sembren 3000 cèl·lules en pous de 15,6 mm (plaques de 24 pous) sobre cobreobjectes, prèviament esterilitzats amb etanol 70^o i tractats amb gelatina 1%, en IMDM FBS 10%, L-glutamina 2 mM, penicil·lina 100 mg/ml i estreptovidina 100 mg/ml. Les cèl·lules es mantenen a 37^oC en atmosfera humida a 5% CO₂. Després es van fixar amb PFA (4%) durant 15 minuts. Es van permeabilitzar i bloquejat amb Tween-20 1% de durant 10 min i bloquejar amb BSA 3% durant 1 h. Després es van incubar durant 1 h amb l'anticòs primari conill anti- β -catenina (1:50) (Sigma, C2206) i monoclonal anti Snail1 (hibridoma no diluït) ⁷⁷. Després de 3 rentats amb PBS es van incubar 1h amb l'anticòs secundari Alexa anti-Rb 555 (1:1000) i Alexa anti-Ms 647 (1:1000) (Invitrogen). Tot el procés es va realitzar a temperatura ambient. La contratinció dels nuclis es va realitzar amb DAPI. Els cobreobjectes van ser muntats amb Fluoromount. Les cèl·lules es van visualitzar en un microscopi confocal Leyca SPE.

2.4.4 Quantificació de PGE2:

Es van sembrar 30.000 cèl·lules en pous de 6, pre-tractats amb gelatina 1%, en IMDM 10% FBS, L-glutamina 2 mM, penicil·lina 100 mg/ml i estreptovidina 100 mg/ml. Les cèl·lules es van mantenir a 37^oC en atmosfera humida a 5% CO₂. Un cop enganxades a la placa, es va canviar el medi a 0,5% FBS; a les 16 h es van tractar amb 1 ng/ml de IL-1 α durant 48 h. Es va recollir el medi es van analitzar els nivells de PGE2 per ELISA amb el Kit Amersham Prostaglandin E₂ Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant.

3. EXPLANT ACINAR

3.1 Aïllament dels explants acinars

Els animals es van sacrificar per dislocació cervical. Es va extreure ràpidament el pàncrees i es va injectar 2,5 ml de col·lagenasa P a 1,33 mg/ml en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, 14175095 Gibco). Es va trossejar amb l'ajuda d'un bisturí i es va digerir amb 5 ml de col·lagenasa P 1,33 mg/ml en HBSS a 37°C durant 20 min amb agitació suau i constant. Es va aturar la reacció posant el tub en gel i afegint 10 ml de HBSS amb FBS al 5% fred. Es va centrifugar durant 3 min a 200 g i es va retirar el sobrenedant. Es va resuspendre amb 10 ml HBSS amb FBS al 5% i es va centrifugar durant 3 min a 200 g; aquest pas es va repetir dues vegades. Després es va resuspendre amb 5 ml HBSS amb FBS al 5% i es va filtrar a través d'una malla de polipropilè de 500 µM (Spectra polypropylene filter, Spectrum Labs, 146418), es van afegir 5 ml de HBSS amb FBS al 5% per netejar la malla. A continuació es van filtrar els 10 ml a través d'una malla de niló de 100 µM (Spectra nylon filter, Spectrum Labs, 146488). La suspensió obtinguda (10 ml) es va afegir a sobre de 20 ml de HBSS amb FBS al 30% i es va centrifugar durant 3 min a 200 g. Es va descartar el sobrenedant i el pellet de cèl·lules es va resuspendre en 20 ml de medi RPMI amb FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicil·lina 100 mg/ml, estreptovidina 100 mg/ml i G418 a 25 µg/ml per tal d'eliminar els fibroblasts endògens).¹⁴⁴⁻¹⁷⁸⁻¹⁹¹.

El medi **RPMI**: (*Roswell Park Memorial Institute*), és un medi de cultiu cel·lular tradicionalment utilitzat per al cultiu fibroblasts en suspensió. Es diferencia d'altres medis de cultiu perquè conté l'agent reductor glutatió i altes concentracions de vitamines. També conté biotina, vitamina B12, i PABA, inositol i colina. També conté una alta concentració de fosfats i està dissenyat per ser utilitzats en atmosferes de 5% de CO₂.

a) Cultiu 2D de l'explant acinar:

Es van dividir els 20 ml de RPMI amb les cèl·lules obtingudes de l'explant acinar en dues parts iguals. Una es va barrejar amb les PMC CT i l'altre no. A continuació es van sembrar en plaques de 100 mm pretractades amb gelatina 1% (Fig. MM-4). Al tercer dia de cultiu es van recollir les cèl·lules i per extreure'n l'RNA i analitzar per RT-qPCR els nivells d'expressió d'amilasa i CK19.

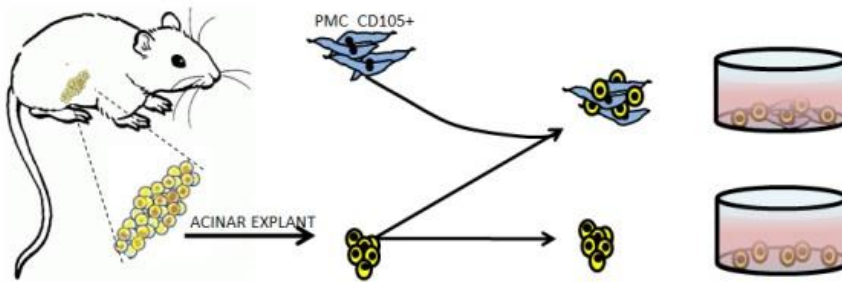


Figura MM-4: Esquema de l'explant acinar sembrat amb presència o absència de PMC.

b) Cultiu 3D de l'explant acinar:

Es van dividir els 20 ml de RPMI amb l'explant acinar obtingut en dues parts iguals. Una es van barrejar amb 700.000 PMC CT i l'altra amb 700.000 PMC KO. Abans de sembrar-les es van incubar durant 1 h a 37°C amb agitació suau. Després cada una es van dividir en 6 eppendorf (1'5 ml), es van centrifugar a 400 g durant 4 min i es va retirar el sobrenedant. El pellet de cèl·lules es va resuspendre, amb cura de no fer bombolles, en 220 µl de Matrigel (4°C) (Biosciences BD). Amb una pipeta de 200 µl i les puntes fredes, es diposita una gota de matrigel de 50 µl al mig d'un pou d'una placa de 24, prèviament escalfada a 37°C. Després de 10 min a

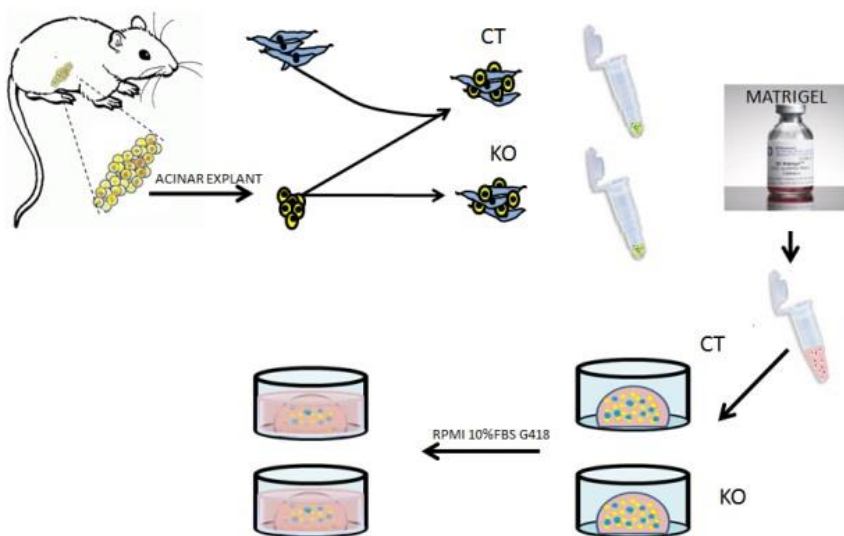


Figura MM-5: Esquema de l'explant acinar sembrat amb medi 3D

temperatura ambient i 15 min a 37°C es van afegir 450 µl de RPMI amb FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicil·lina 100 mg/ml, estreptavidina 100 mg/ml i G418 a 25 µg/ml (Fig. MM-5). El medi es va canviar a les 24 h i 72 h. Les mostres es van analitzar el tercer dia per determinar el nombre i la mida de les esferes. Es van classificar en grans (més de 80 µm de diàmetre), mitjanes (entre 40 i 80 µm de diàmetre) i petites (menys de 40 µm de diàmetre). També es van analitzar l'expressió de l'amilasa, la CK19 i la E-cadherina d'aquestes estructures per immunofluorescència, classificant els nivells de tinció en alta, mitja i baixa.

3.3. Immunofluorescència de les esferes

Primer es va treure el medi i es va afegir 1 ml de Cell Recovery Solution (354253). Amb l'ajuda d'un "scraper", es va desenganxar la gota de Matrigel de la placa i amb una punta blava, amb la punta tallada es va passar la gota de Matrigel a un eppendorf. Es va incubar a 4°C durant 1 h a la sínia per tal de destruir el Matrigel i alliberar les esferes. Després de centrifugar durant 4 min a 50 g es va descartar el sobrenedant i es van fixar les esferes amb 200 µl de PFA 4% durant 25 min. Es va centrifugar durant 4 min a 50 g i després de descartar el sobrenedant es van afegir 150 µl de HBSS. Es va realitzar un citospín (30 segons, 200 rpm) i es va tornar a fixar sobre el portaobjectes durant 5 min amb PFA 4%. Després de rentar amb PBS es bloquegen i permeabilitzen les esferes durant 1 h amb Tritó 0,3%, BSA 5%. Es va realitzar un rentat amb PBS i es va incubar els anticossos primaris durant 1 h a temperatura ambient en 1% FBS, 1% BSA. Després de 3 rentats amb PBS es va incubar amb l'anticòs secundari durant 1 h a temperatura ambient (Alexa 1:1000; 488Ms, 555Rb, 647Gt) (Invitrogen). Després de tres rentats amb PBS es va realitzar la contratinció dels nuclis amb DAPI 5 min. Finalment, després d'un últim rentat amb PBS es van muntar les mostres amb Fluoromont.

4. Estadística

L'anàlisi estadístic en el recompte de les esferes es va realitzar amb el programa SPSS 18.0 (IBM Corp.).

BIBLIOGRAFIA



1. Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006) **Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis.** *Cancer Res* 66:8319–26.
2. Hay ED (1995) **An overview of epithelio-mesenchymal transformation.** *Acta Anat (Basel)* 154:8–20.
3. Thiery JP (2002) **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2:442–54.
4. Thiery JP, Sleeman JP (2006) **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131–42.
5. Li S, Guan J-L, Chien S (2005) **Biochemistry and biomechanics of cell motility.** *Annu Rev Biomed Eng* 7:105–50.
6. LaGamba D, Nawshad A, Hay ED (2005) **Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation.** *Dev Dyn* 234:132–42.
7. Egeblad M, Werb Z (2002) **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** *Nat Rev Cancer* 2:161–74.
8. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW (2006) **The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *J Cell Biol* 172:973–81.
9. Thiery JP (2003) **Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies.** *Curr Opin Cell Biol* 15:740–746.
10. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, et al. (2003) **Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of**

beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 163:847–57.

11. Takahashi K, Yamanaka S (2006) **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** *Cell* 126:663–676.
12. Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA (1993) **The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak.** *Development* 118:829–844.
13. Nieto M a (2001) **The early steps of neural crest development.** *Mech Dev* 105:27–35.
14. Vićovac L, Aplin JD (1996) **Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation.** *Acta Anat (Basel)* 156:202–16.
15. Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, et al. (1999) **E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6249–54.
16. Savagner P, Kusewitt DF, Carver E a, Magnino F, Choi C, et al. (2005) **Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes.** *J Cell Physiol* 202:858–66.
17. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, et al. (2002) **Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis.** *J Clin Invest* 110:341–50.
18. Thompson EW, Haviv I (2011) **The social aspects of EMT-MET plasticity.** *Nat Med* 17:1048–1049.
19. Alberga A, Boulay J, Kempe E, Dennefeld C, Marc H (1991) **The snail gene required for mesoderm formation in**

Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111:983–992.

20. Paznekas WA, Okajima K, Schertzer M, Wood S, Jabs EW (1999) **Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P).** *Genomics* 62:42–9.
21. Leptin M (1991) **twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development.** *Genes Dev* 5:1568–1576.
22. Nieto M a, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J (1994) **Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene.** *Science* 264:835–9.
23. Grau Y, Carteret C, Simpson P (1984) **Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in Drosophila melanogaster.** *Genetics* 108:347–360.
24. J. L. Boulay, C. Dennefeld AA (1987) **The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers.** *Nat Lett* 330.
25. Hemavathy K, Ashraf S, Ip Y (2000) **Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer.** *Gene* 257:1–12.
26. Nieto MA (2002) **The snail superfamily of zinc-finger transcription factors.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:155–166.
27. Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, Guaita S, Grueso J, et al. (2003) **Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor.** *Mol Cell Biol* 23:5078–89.

28. Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) **Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?**. *Nat Rev Cancer* 7:415–28.
29. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A (2004) **Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex.** *Mol Cell Biol* 24:306–19.
30. Herranz N, Pasini D, Díaz VM, Francí C, Gutierrez A, et al. (2008) **Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor.** *Mol Cell Biol* 28:4772–81.
31. Langer EM, Feng Y, Zhaoyuan H, Rauscher FJ, Kroll KL, et al. (2008) **Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in Xenopus.** *Dev Cell* 14:424–436.
32. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, et al. (2004) **Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition.** *Nat Cell Biol* 6:931–40.
33. Viñas-Castells R, Frías Á, Robles-Lanuza E, Zhang K, Longmore GD, et al. (2014) **Nuclear ubiquitination by FBXL5 modulates Snail1 DNA binding and stability.** *Nucleic Acids Res* 42:1079–94.
34. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, et al. (2000) **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nat Cell Biol* 2:84–89.
35. Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, et al. (2005) **Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions.** *Cancer Res* 65:3179–84.

36. Barberà MJ, Puig I, Domínguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, et al. (2004) **Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells.** *Oncogene* 23:7345–54.
37. Peinado H, Quintanilla M, Cano A (2003) **Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions.** *J Biol Chem* 278:21113–21123.
38. Valdés F, Alvarez AM, Locascio A, Vega S, Herrera B, et al. (2002) **The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes.** *Mol Cancer Res* 1:68–78.
39. Martínez-Álvarez C, Blanco MJ, Pérez R, Rabadán MA, Aparicio M, et al. (2004) **Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates.** *Dev Biol* 265:207–218.
40. Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, et al. (2005) **Transient overexpression of TGF-beta1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum.** *J Am Soc Nephrol* 16:425–436.
41. Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, et al. (2003) **Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells.** *N Engl J Med* 348:403–413.
42. Jamora C, Lee P, Kocieniewski P, Azhar M, Hosokawa R, et al. (2005) **A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis.** *PLoS Biol* 3:e11.
43. Gotzmann J, Huber H, Thallinger C, Wolschek M, Jansen B, et al. (2002) **Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness.** *J Cell Sci* 115:1189–202.

44. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, Van Roy F, et al. (2003) **The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines.** *Cancer Res* 63:2172–2178.
45. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA (2005) **The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer.** *Development* 132:3151–61.
46. Janda E, Nevolo M, Lehmann K, Downward J, Beug H, et al. (2006) **Raf plus TGF-beta dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin.** *Oncogene* 25:7117–7130.
47. Grego-Bessa J, Díez J, Timmerman L, De La Pompa JL (2004) **Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: Another turn of the screw.** *Cell Cycle* 3:718–721.
48. Timmerman L a., Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, et al. (2004) **Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation.** *Genes Dev* 18:99–115.
49. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttlinger EP (2004) **Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition.** *EMBO J* 23:1155–1165.
50. Piedra ME, Ros M a (2002) **BMP signaling positively regulates Nodal expression during left right specification in the chick embryo.** *Development* 129:3431–40.
51. Smith a P, Verrecchia A, Fagà G, Doni M, Perna D, et al. (2009) **A positive role for Myc in TGFbeta-induced Snail transcription and epithelial-to-mesenchymal transition.** *Oncogene* 28:422–430.

52. Zavadil J, Böttinger EP (2005) **TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions.** *Oncogene* 24:5764–74.
53. Peiró S, Escrivà M, Puig I, Barberà MJ, Dave N, et al. (2006) **Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression.** *Nucleic Acids Res* 34:2077–84.
54. Fearon ER (2003) **Connecting estrogen receptor function, transcriptional repression, and E-cadherin expression in breast cancer.** *Cancer Cell* 3:307–310.
55. Perl a K, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998) **A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.** *Nature* 392:190–193.
56. Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F (1991) **Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.** *Cell* 66:107–119.
57. Kang Y, Massagué J (2004) **Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis.** *Cell* 118:277–279.
58. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, et al. (2000) **The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.** *Nat Cell Biol* 2:76–83.
59. De Craene B (2005) **The Transcription Factor Snail Induces Tumor Cell Invasion through Modulation of the Epithelial Cell Differentiation Program.** *Cancer Res* 65:6237–6244.
60. Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, et al. (2006) **Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for snail, Slug, and E47 Factors in epithelial- mesenchymal transition.** *Cancer Res* 66:9543–9556.

61. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S (2003) **Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail.** *J Cell Sci* 116:1959–1967.
62. Ohkubo T, Ozawa M (2004) **The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation.** *J Cell Sci* 117:1675–1685.
63. Guaita S, Puig I, Francí C, Garrido M, Domínguez D, et al. (2002) **Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression.** *J Biol Chem* 277:39209–39216.
64. Pálmer HG, Larriba MJ, García JM, Ordóñez-Morán P, Peña C, et al. (2004) **The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer.** *Nat Med* 10:917–919.
65. Espineda CE, Chang JH, Twiss J, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK (2004) **Repression of Na,K-ATPase beta1-subunit by the transcription factor snail in carcinoma.** *Mol Biol Cell* 15:1364–1373.
66. Kajita M, McClinic KN, Wade PA (2004) **Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress.** *Mol Cell Biol* 24:7559–7566.
67. Escrivà M, Peiró S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, et al. (2008) **Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 28:1528–40.
68. Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A (2010) **Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell**

pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* 9:2363–74.

69. Vega S, Morales A V., Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, et al. (2004) **Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.** *Genes Dev* 18:1131–1143.
70. Del Barrio MG, Nieto MA (2002) **Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation.** *Development* 129:1583–1593.
71. Miyoshi a, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, et al. (2005) **Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** *Br J Cancer* 92:252–258.
72. Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agustí C, Casagolda D, Sánchez-Aguilera F, et al. (2008) **E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression.** *J Cell Sci* 121:2224–2234.
73. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, et al. (2007) **Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel.** *Cancer Res* 67:1979–87.
74. Mancilla A, Mayor R (1996) **Neural Crest Formation in *Xenopus laevis*: Mechanisms of Xslug Induction.** *Dev Biol* 177:580–589.
75. Carl TF, Dufton C, Hanken J, Klymkowsky MW (1999) **Inhibition of neural crest migration in *Xenopus* using antisense slug RNA.** *Dev Biol* 213:101–15.
76. Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, et al. (2011) **Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition.** *J Biol Chem* 286:12024–32.

77. Francí C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gómez S, et al. (2006) **Expression of Snail protein in tumor-stroma interface.** *Oncogene* 25:5134–44.
78. Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K (2007) **Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta.** *Mol Biol Cell* 18:3533–44.
79. Savagner P (2001) **Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition.** *Bioessays* 23:912–23.
80. Kalluri R, Neilson EG (2003) **Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.** *J Clin Invest* 112:1776–84.
81. Liu Y (2004) **Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention.** *J Am Soc Nephrol* 15:1–12.
82. Boutet A, De Frutos C a, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, et al. (2006) **Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney.** *EMBO J* 25:5603–13.
83. Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, et al. (2003) **Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells.** *N Engl J Med* 348:403–413.
84. Martin P (1997) **Wound healing-aiming for perfect skin regeneration.** *Science* 276:75–81.
85. Zeisberg M, Strutz F, Müller G a (2000) **Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis.** *J Nephrol* 13 Suppl 3:S111–20.

86. Kalluri R, Zeisberg M (2006) **Fibroblasts in cancer.** *Nat Rev Cancer* 6:392–401.
87. Clayton a, Evans R a, Pettit E, Hallett M, Williams JD, et al. (1998) **Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1.** *J Cell Sci* 111 (Pt 4:443–53.
88. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, et al. (2002) **Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.** *Oncogene* 21:3241–3246.
89. Moody SE, Perez D, Pan T, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, et al. (2005) **The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence.** *Cancer Cell* 8:197–209.
90. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, et al. (2005) **Snail, slug, and smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma.** *Cancer* 103:1631–1643.
91. Peña C, Garcíá JM, Silva J, Garcíá V, Rodríguez R, et al. (2005) **E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: Clinicopathological correlations.** *Hum Mol Genet* 14:3361–3370.
92. Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara M, et al. (2003) **Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis.** *Life Sci* 73:3313–3321.
93. Takeno S, Noguchi T, Fumoto S, Kimura Y, Shibata T, et al. (2004) **E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications.** *Am J Clin Pathol* 122:78–84.

94. Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, et al. (2003) **Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res* 9:2657–2664.
95. Jayachandran a, Königshoff M, Yu H, Rupniewska E, Hecker M, et al. (2009) **SNAI transcription factors mediate epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis.** *Thorax* 64:1053–1061.
96. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubert B, et al. (2002) **Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer.** *Am J Pathol* 161:1881–1891.
97. Peña C, García JM, Larriba MJ, Barderas R, Gómez I, et al. (2009) **SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue.** *Oncogene* 28:4375–4385.
98. Yang M-H, Chang S-Y, Chiou S-H, Liu C-J, Chi C-W, et al. (2007) **Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer.** *Oncogene* 26:1459–1467.
99. Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Pérez-Gómez E, Santos V, et al. (2008) **Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas.** *Cancer Res* 68:4541–4550.
100. Zidar N, Gale N, Kojc N, Volavsek M, Cardesa A, et al. (2008) **Cadherin-catenin complex and transcription factor Snail-1 in spindle cell carcinoma of the head and neck.** *Virchows Arch* 453:267–274.
101. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, Victor TA, Wali RK (2005) **The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer.** *Dig Dis Sci* 50:42–46.

102. Francí C, Gallén M, Alameda F, Baró T, Iglesias M, et al. (2009) **Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours.** *PLoS One* 4:e5595.
103. Fendrich V, Waldmann J, Esni F, Ramaswamy A, Mullendore M, et al. (2007) **Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum.** *Endocr Relat Cancer* 14:865–874.
104. Blechschmidt K, Kremmer E, Hollweck R, Mylonas I, Höfler H, et al. (2007) **The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas.** *Diagn Mol Pathol* 16:222–228.
105. Blechschmidt K, Sassen S, Schmalfeldt B, Schuster T, Höfler H, et al. (2008) **The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients.** *Br J Cancer* 98:489–495.
106. Tuhkanen H, Soini Y, Kosma V-M, Anttila M, Sironen R, et al. (2009) **Nuclear expression of Snail1 in borderline and malignant epithelial ovarian tumours is associated with tumour progression.** *BMC Cancer* 9:289.
107. Heeboll S, Borre M, Ottosen PD, Dyrskjot L, Orntoft TF, et al. (2009) **Snail1 is over-expressed in prostate cancer.** *APMIS* 117:196–204.
108. Bruyere F, Namdarian B, Corcoran NM, Pedersen J, Ockrim J, et al. (2010) **Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers.** *Urol Oncol Semin Orig Investig* 28:591–596.
109. Waldmann J, Feldmann G, Slater EP, Langer P, Buchholz M, et al. (2008) **Expression of the zinc-finger transcription factor Snail in adrenocortical carcinoma is associated with decreased survival.** *Br J Cancer* 99:1900–1907.

110. Hardy RG, Vicente-Dueñas C, González-Herrero I, Anderson C, Flores T, et al. (2007) **Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis.** *Am J Pathol* 171:1037–1046.
111. Fendrich V, Waldmann J, Feldmann G, Schlosser K, König A, et al. (2009) **Unique expression pattern of the EMT markers Snail, Twist and E-cadherin in benign and malignant parathyroid neoplasia.** *Eur J Endocrinol* 160:695–703.
112. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T (2001) **The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition.** *Mol Cell Biol* 21:8184–8188.
113. Oda H, Tsukita S, Takeichi M (1998) **Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation.** *Dev Biol* 203:435–450.
114. Seki K, Fujimori T, Savagner P, Hata A, Aikawa T, et al. (2003) **Mouse Snail Family Transcription Repressors Regulate Chondrocyte, Extracellular Matrix, Type II Collagen, and Aggrecan.** *J Biol Chem* 278:41862–41870.
115. Ashraf SI, Ip YT (2001) **The Snail protein family regulates neuroblast expression of inscuteable and string, genes involved in asymmetry and cell division in Drosophila.** *Development* 128:4757–4767.
116. Murray S a, Gridley T (2006) **Snail family genes are required for left-right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10300–4.
117. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA (2006) **Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Genes Dev* 20:1218–1249.
118. Murray S a, Carver E a, Gridley T (2006) **Generation of a Snail1 (Snai1) conditional null allele.** *Genesis* 44:7–11.

119. Hayashi S, McMahon AP (2002) **Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse.** *Dev Biol* 244:305–18.
120. Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW (2012) **Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death.** *Neurosci Bull* 28:14–24.
121. Schmidt-Supprian M, Rajewsky K (2007) **Vagaries of conditional gene targeting.** *Nat Immunol* 8:665–8.
122. Calloni R, Cordero EAA, Henriques JAP, Bonatto D (2013) **Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells.** *Stem Cells Dev* 22:1455–76.
123. Apte M V, Pirola RC, Wilson JS (2012) **Pancreatic stellate cells: A starring role in normal and diseased pancreas.** *Front Physiol* 3:1–14.
124. Satelli A, Li S (2011) **Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy.** *Cell Mol Life Sci* 68:3033–3046.
125. Cherng S, Young J, Ma H (2008) **Alpha-Smooth Muscle Actin (a-SMA).** *J Am Sci* 4:7–9.
126. Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, et al. (1998) **Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans.** *Gastroenterology* 115:421–32.
127. Boomersshine CS, Chamberlain A, Kendall P, Afshar-Sharif A-R, Huang H, et al. (2009) **Autoimmune pancreatitis results from loss of TGFbeta signalling in S100A4-positive dendritic cells.** *Gut* 58:1267–74.
128. Masamune A, Shimosegawa T (2009) **Signal transduction in pancreatic stellate cells.** *J Gastroenterol* 44:249–60.

129. Fitzner B, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R (2004) **Involvement of AP-1 proteins in pancreatic stellate cell activation in vitro.** *Int J Colorectal Dis* 19:414–20.
130. Stanisavljevic J, Porta-de-la-Riva M, Batlle R, de Herreros AG, Baulida J (2011) **The p65 subunit of NF- κ B and PARP1 assist Snail1 in activating fibronectin transcription.** *J Cell Sci* 124:4161–71.
131. García de Herreros A, Baulida J (2012) **Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition.** *Biochim Biophys Acta* 1825:223–8.
132. Apte M V, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, et al. (1998) **Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture.** *Gut* 43:128–33.
133. Schafer S, Zerbe O GA (1987) **the synthesis of proteoglycans in fat storing cells of rat liver.** *Hepatology* 7:680–7.
134. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 8:315–317.
135. Böttinger EP, Jakubczak JL, Roberts IS, Mumy M, Hemmati P, et al. (1997) **Expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-beta in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas.** *EMBO J* 16:2621–2633.
136. Batlle R, Alba-Castellón L, Loubat-Casanovas J, Armenteros E, Francí C, et al. (2013) **Snail1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells.** *Oncogene* 32:3381–9.

137. Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Kuick R, et al. (2002) **Activation of AXIN2 expression by β -catenin-T cell factor: A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling.** *J Biol Chem* 277:21657–21665.
138. Bottomly D, Kyler SL, McWeeney SK, Yochum GS (2010) **Identification of β -catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq.** *Nucleic Acids Res* 38:5735–5745.
139. Nuñez F, Bravo S, Cruzat F, Montecino M, de Ferrari G V. (2011) **Wnt/ β -Catenin Signaling Enhances Cyclooxygenase-2 (COX2) Transcriptional Activity in Gastric Cancer Cells.** *PLoS One* 6.
140. Funk CD (2001) **Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.** *Science* 294:1871–1875.
141. O'Banion MK, Winn VD, Young D a (1992) **cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4888–4892.
142. Orjalo A V, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J (2009) **Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17031–17036.
143. Mann JR, Backlund MG, Buchanan FG, Daikoku T, Holla VR, et al. (2006) **Repression of prostaglandin dehydrogenase by epidermal growth factor and snail increases prostaglandin E2 and promotes cancer progression.** *Cancer Res* 66:6649–6656.
144. Githens S, Schexnayder J a., Moses RL, Denning GM, Smith JJ, et al. (1994) **Mouse pancreatic acinar/ductlar tissue gives rise to epithelial cultures that are morphologically, biochemically, and functionally indistinguishable from interlobular duct cell cultures.** *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 30:622–635.

145. Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, Bouwens L (2000) **Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro.** *Diabetologia* 43:907–914.
146. Sphyris N, Logsdon CD, Harrison DJ (2005) **Improved retention of zymogen granules in cultured murine pancreatic acinar cells and induction of acinar-ductal transdifferentiation in vitro.** *Pancreas* 30:148–157.
147. Arias a E, Bendayan M (1993) **Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro.** *Lab Invest* 69:518–530.
148. Sandgren EP, Quaife CJ, Paulovich AG, Palmiter RD, Brinster RL (1991) **Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:93–97.
149. Schaeffer BK, Terhune PG, Longnecker DS (1994) **Pancreatic carcinomas of acinar and mixed acinar/ductal phenotypes in *Ela-1-myc* transgenic mice do not contain c-K-ras mutations.** *Am J Pathol* 145:696–701.
150. Parsa I, Longnecker D, Scarpelli D (1985) **Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma.** *Cancer Res* 45:1285–1290.
151. Reichert M, Rustgi A (2011) **Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia.** *J Clin Invest* 121:4572–8.
152. Kajita M, McClinic KN, Wade PA (2004) **Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress.** *Mol Cell Biol* 24:7559–7566.
153. Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, et al. (2008) **Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition.** *PLoS One* 3:e2888.

154. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. (2008) **The Epithelial-Mesenchymal Transition generates cells with properties of stem cells.** *Cell* 133:704–715.
155. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y (2009) **Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells.** *Cancer Cell* 15:195–206.
156. Bonal C, Thorel F, Ait-Lounis A, Reith W, Trumpp A, et al. (2009) **Pancreatic inactivation of c-Myc decreases acinar mass and transdifferentiates acinar cells into adipocytes in mice.** *Gastroenterology* 136:309–319.e9.
157. Li N, Wu X, Holzer RG, Lee JH, Todoric J, et al. (2013) **Loss of acinar cell IKK α triggers spontaneous pancreatitis in mice.** *J Clin Invest* 123:2231–2243.
158. Negro P, Ciani R, Riseti A, De Bernardinis G, Tuscano D, et al. (1978) **Administration of caerulein during experimental acute pancreatitis in mice.** *Boll Soc Ital Biol Sper* 54:759–764.
159. George NM, Day CE, Boerner BP, Johnson RL, Sarvetnick NE (2012) **Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap.** *Mol Cell Biol* 32:5116–5128.
160. Hernan L, Fitzgerald PJ (1962) **Restitution of pancreatic acinar cells following ethionine.** *J Cell Biol* 12:297–312.
161. Elsässer HP, Adler G, Kern HF (1986) **Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat.** *Pancreas* 1:421–429.
162. Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y (1984) **Effects of injecting excess arginine on rat pancreas.** *J Nutr* 114:467–471.

163. Lehv M, Fitzgerald PJ (1968) **Pancreatic acinar cell regeneration IV. Regeneration after Surgical Resection.** *Am J Pathol* 53:513–35.
164. Watanabe H, Saito H, Rychahou PG, Uchida T, Evers BM (2005) **Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation.** *Gastroenterology* 128:1391–1404.
165. Lepper C, Conway SJ, Fan C (2009) **Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements.** *Nature* 460:627–631.
166. Kim I, Saunders TL, Morrison SJ (2007) **Sox17 Dependence Distinguishes the Transcriptional Regulation of Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells.** *Cell* 130:470–483.
167. Lipsett MA, Castellarin ML, Rosenberg L (2007) **Acinar plasticity: development of a novel in vitro model to study human acinar-to-duct-to-islet differentiation.** *Pancreas* 34:452–457.
168. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, et al. (2001) **Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes.** *Diabetes* 50:521–533.
169. Chase HP, MacKenzie TA, Burdick J, Fiallo-Scharer R, Walravens P, et al. (2004) **Redefining the clinical remission period in children with type 1 diabetes.** *Pediatr Diabetes* 5:16–19.
170. Hess DA, Humphrey SE, Ishibashi J, Damsz B, Lee A, et al. (2011) **Extensive pancreas regeneration following acinar-specific disruption of Xbp1 in mice.** *Gastroenterology* 141:1463–1472.

171. Guo L, Sans MD, Hou Y, Ernst SA, Williams JA (2012) **c-Jun/AP-1 is required for CCK-induced pancreatic acinar cell dedifferentiation and DNA synthesis in vitro.** *AJP Gastrointest Liver Physiol* 302:G1381–G1396.
172. Krapp a, Knöfler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbüchle O, et al. (1996) **The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein.** *EMBO J* 15:4317–4329.
173. Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, Lee WC, Buza-Vidas N, et al. (2011) **Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1.** *PLoS Genet* 7.
174. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ (2007) **The pancreatic stellate cell: A star on the rise in pancreatic diseases.** *J Clin Invest* 117:50–59.
175. Sampson VB, David JM, Puig I, Patil PU, De Herreros AG, et al. (2014) **Wilms' tumor protein induces an epithelial-mesenchymal hybrid differentiation state in clear cell renal cell carcinoma.** *PLoS One* 9.
176. Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J (2008) **Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin.** *Oncogene* 27:5075–80.
177. Riopel MM, Li J, Liu S, Leask A, Wang R (2012) **β 1 integrin–extracellular matrix interactions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function.** *Lab Invest* 93:31–40.
178. Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, et al. (2005) **Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates.** *Development* 132:3767–76.

179. Grippo PJ, Sandgren EP (2012) **Acinar-to-ductal metaplasia accompanies c-myc-induced exocrine pancreatic cancer progression in transgenic rodents.** *Int J Cancer* 131:1243–8.
180. Strobel O, Dor Y, Alsina J, Stirman A, Lauwers G, et al. (2007) **In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia.** *Gastroenterology* 133:1999–2009.
181. Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, et al. (2007) **Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice.** *Cancer Cell* 11:291–302.
182. Rowe RG, Lin Y, Shimizu-Hirota R, Hanada S, Neilson EG, et al. (2011) **Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression.** *Mol Cell Biol* 31:2392–2403.
183. Elliott GC, Gurtu R, McCollum C, Newman WG, Wang T (2014) **Foramen ovale closure is a process of Endothelial-to-Mesenchymal Transition leading to fibrosis.** *PLoS One* 9:e107175.
184. Shields M a, Ebine K, Sahai V, Kumar K, Siddiqui K, et al. (2013) **Snail cooperates with KrasG12D to promote pancreatic fibrosis.** *Mol Cancer Res* 11:1078–87.
185. Yin T, Wang C, Liu T, Zhao G, Zha Y, et al. (2007) **Expression of snail in pancreatic cancer promotes metastasis and chemoresistance.** *J Surg Res* 141:196–203.
186. Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, et al. (1992) **Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid.** *Br J Cancer* 66:1122–1130.
187. Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr H-JJ, et al. (2007) **Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer.** *Clin Cancer Res* 13:4769–4776.

188. Zhou W, Lv R, Qi W, Wu D, Xu Y, et al. (2014) **Snail contributes to the maintenance of stem cell-like phenotype cells in human pancreatic cancer.** *PLoS One* 9.
189. Javaid S, Zhang J, Anderssen E, Black JC, Wittner BS, et al. (2013) **Dynamic chromatin modification sustains epithelial-mesenchymal transition following inducible expression of snail-1.** *Cell Rep* 5:1679–1689.
190. Shah P, Gau Y, Sabnis G (2014) **Histone deacetylase inhibitor entinostat reverses epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by reversing the repression of E-cadherin.** *Breast Cancer Res Treat* 143:99–111.
191. De Lisle RC, Logsdon CD (1990) **Pancreatic acinar cells in culture: expression of acinar and ductal antigens in a growth-related manner.** *Eur J Cell Biol.*

PUBLICACIONS



El treball inclòs en aquesta memòria ha estat enviat per a la seva publicació:

Jordina Loubat-Casanovas, Núria González Raúl Peña, Clara Francí, Lorena Alba-Castellón, Pilar Navarro, and Antonio García de Herreros **Snail1 is required for the maintenance of pancreatic acinar phenotype.** En revisions in Molecular and Cell Biology 2014

La doctoranda també ha contribuït en altres treballs ja publicats i no inclosos en aquesta memòria:

Batlle R, Alba-Castellón L, Loubat-Casanovas J, Armenteros E, Francí C, Stanisavljevic J, Banderas R, Martin-Caballero J, Bonilla F, Baulida J, Casal JI, Gridley T, García de Herreros A. **Snail1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells.** Oncogene. 2013 Jul 11;32(28):3381-9

Millanes-Romero A, Herranz N, Perrera V, Iturbide A, Loubat-Casanovas J, Gil J, Jenuwein T, García de Herreros A, Peiró S. **Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition.** Mol Cell. 2013 Dec 12;52(5):746-57.

Alba-Castellón L, Batlle R, Francí C, Fernández-Aceñero MJ, Mazzolini R, Peña R, Loubat J, Alameda F, Rodríguez R, Curto J, Albanell J, Muñoz A, Bonilla F, Ignacio Casal J, Rojo F, García de Herreros A. **Snail1 expression is required for sarcomagenesis.** Neoplasia. 2014 May;16(5):413-21.

Herrera A, Herrera M, Alba-Castellón L, Silva J, García V, Loubat-Casanovas J, Alvarez-Cienfuegos A, Miguel García J, Rodríguez R, Gil B, Ma Jesús Citores, Ma Jesús Larriba, Ignacio Casal J, de Herreros AG, Bonilla F, Peña C. **Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells.** Int J Cancer. 2014 Jun 15;134(12):2984-90.

Stanisavljevic J, Loubat-Casanovas J, Herrera M, Luque T, Peña R, Lluch A, Albanell J, Bonilla F, Rovira A, Peña C, Navajas D, Rojo F, García de Herreros A, Baulida J. **Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis.** Cancer Res. 2015 Jan 15;75(2):284-95.

