



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Zeb1 en las células estrelladas del páncreas: implicación en la oncogénesis pancreática dependiente de Kras

Irene Sangrador Escrig

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

Zeb1 en las células estrelladas del páncreas: implicación en la oncogénesis pancreática dependiente de Kras.

Memoria para optar al título de Doctora por la Universidad de Barcelona presentada por

Irene Sangrador Escrig

Trabajo realizado en el departamento de Oncología Gastrointestinal y Pancreática del
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Dra. Eva C. Vaquero Raya
Directora

Irene Sangrador Escrig
Candidata

Dr. Antoni Castells Garangou
Tutor

Barcelona, Junio de 2018



*Soñaremos tan alto que despertaremos
a todos los que estén a nuestro alrededor
y soñaremos tan lejos
que todas estarán alrededor nuestro
y soñaremos tan fuerte
que lo seremos
transmitiendo por contagio la ilusión de un camino
por contacto el calor
por diversión el motivo*

Escandar Algeet

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi ha suposat un gran aprenentatge no només a nivell professional, sinó també personal, i m'ha permès adonar-me de la quantitat de gent preciosa que m'acompanya a la vida. De totes les persones que formen o han format part d'aquesta etapa he après alguna cosa, i per aquest motiu els estic profundament agraïda. No obstant, hi ha algunes que han sigut imprescindibles, i mereixen una menció especial.

Eva, gràcies de tot cor per haver confiat en mi des del primer moment i haver-me ofert l'oportunitat de treballar amb tu. Per haver-me ensenyat tantíssim. M'has donat les eines per a aprendre gaudint, i l'espai i la confiança per prendre decisions i tenir iniciativa. I el més important, m'has transmès la teva passió per la ciència, i això m'acompanyarà sempre. Ets un gran exemple per mi a tots els nivells.

Al Toni li agraeixo el suport i la oportunitat de treballar en el grup de Gastro.

Cristina Fillat, gràcies pels consells científics i per la teva predisposició a ajudar-nos i a col·laborar amb nosaltres.

Em sent molt afortunada de ser part de la família científica que s'ha anat creant al laboratori els últims anys. Quina sort anar a treballar cada matí sabent que passaràs el dia rodejada de grans persones i altes dosis de companyerisme i amistat. I que, per si no fos poc, hi ha moltes possibilitats de que riguis bastant en algun moment. Em queda un grandíssim record del dia a dia al lab, dels berenars, les birres, els sopars, de les excursions i de les sortides de cap de setmana. Elena, Maria, Claudia, Sebas, Laia, Marcos, Eva, Esther, Manuel, Saray, Lorena, Keyvan, Sergio, Maria V., Coral, Elena A., Jenny, Isa, Clara. Sou molt grans.

La meva Elena! des del primer minut has sigut no només una companya de laboratori, sinó també una gran amiga i el meu principal suport aquí dintre. Per tots els esmorzars, sopars, totes les converses i consells, pels riures i abraçades, cines, concerts, festivals, hores de biblioteca, congressos, i per la pau que m'has donat. Un gràcies gegant es queda curt, sense tu hagués sigut impossible acabar aquesta tesi...o almenys acabar-la bé del cap :P

Núria, recorde el dia que ens vam conèixer al màster i de com vaig pensar "aquesta tia i jo serem amigues". També recorde perfectament quan vas començar a treballar al

CEK i de com vaig pensar “com molarà veure’ns cada dia!”. I no anava gens desencaminada en cap de les dues coses :) Gràcies per la teva bona energia, pel suport, per l’ajuda i per tots els grandíssims records que hem creat juntes aquests anys (des del CEK fins a Costa Rica, passant per tots els plans molons a més petita escala). Ets “súper!”.

María (AKA Macaca), qué te voy a decir a ti que no sepas ya! tenerte al lado estos dos últimos años y medio ha sido lo más-guai-del-mundo. Has sido un apoyo brutal, tú y tus coñas, y tus post-its, y tu capacidad para hacerme reír hasta de Zeb1, y la creación de “El cajón”, y tus audios, y tus canciones, y sobretodo tú y ese pedazo de corazón que tienes.

Claudia, companya de cafès, de riures i de descobriments culinaris (tenim pendants un parell de receptes encara :P). Fas les coses fàcils, i el teu punt de vista m’ha fet veure-les fàcils a mi també moltes vegades. Ets molt gran!

Sebas, gràcies pel bon rotllo i per estar sempre disposat a ajudar en tot, des de desxifrar dades de transcriptòmica fins a sobreviure a dies de saturació mental amb paraules d’ànims (o una abraçada o un carrot cake o birres). Gràcies també per posar-me en contacte amb científics famosos del teu poble ;) Ets una grandíssima persona i un gran suport!

Laia, ha sigut genial ser companyes de congressos, i ara de laboratori! No he pogut complir el que vam escriure a la noteta de l’arbre de Liverpool, però...i lo bé que ens ho vam passar aquell EPC?? :) Els teus consells han sigut (i són) valiosíssims, i sempre em fas creure en mi mateixa quan a mi se m’oblida, ets un sol.

Marcos, crack! tu entrada en el lab marcó un antes y un después en el grupo, y nos transmites a todos tu buena energía cada día. Gracias por todo!

Esther, gracias por todo lo que me enseñaste cuando empecé a trabajar en el laboratorio y estaba más perdida que un pato en alta mar, por tu paciencia, tu apoyo y tu cariño. A ti también Manuel, fuiste “el salvador” del grupo! Me has ayudado una barbaridad este último año y siempre con la mejor predisposición.

Maria Rovira, et trobem a faltar! les teves visites de la segona a la quarta, els soparets...Gràcies per la teva grandíssima ajuda amb els subcutanis, ets una crack!!

Una menció especial també a totes les persones que formen part de la petita gran família bluesera...Alba (ets preciosa, gràcies per estar sempre, pels shiatus, pels

bons moments), Miguel (súper parella de ball, ets un grandíssim amic), Eila (la meua leader preferida), i totes les nenes. Sou tots molt especials :)

La Colla Codony, sou les arrels quan es viu lluny de casa, tornar i saber que esteu allà i que res canvia per més que passen els anys. Claudia, per la teua amistat tan bonica, que no canvia a pesar de la distància i els anys.

Bea, por acompañarme y ayudarme a conocerme mejor y a crecer empoderada, por darme herramientas para caminar ligera. Gracias de corazón.

Sirio, el més clar exemple de que la distància no té res a fer si l'amistat és forta. Retrobar-nos i posar-nos al dia sempre és genial i "divertit".

Tania, eres una de las grandes personas en mi vida, gracias por tu cariño, por entenderme, animarme y cuidarme, y por estar siempre aunque estemos lejos.

El meu Pastoret, el teu suport i la teua amistat no es poden explicar amb paraules, i tindre't a Barcelona aquests últims anys ha sigut un regal. Gràcies per TOT.

Teresa i Neus, les meues germanetes. Heu sigut "casa" aquests anys, la seguretat de acabar el dia i tornar a la zona de confort, on tot és fàcil i les tonteries, bromes i risas a llàgrima viva estan assegurades quasi cada dia; però també on els mals dies es difuminen a base de "cenitas guais", de vídeos absurds, de bailoteos per casa al ritme de temazos o simplement a base de seure al sofà i fer-nos companyia. I a Miquel, que ha contribuït a tot açò durant l'últim any, especialment fent-me plorar de la risa, ajudant-me a escriure mails i assegurant-se de que no em faltés mai Nutella. Teresa, tu has sigut especialment imprescindible, m'has cuidat, escoltat, comprès i aguantat amb una complicitat i confiança que no sé explicar amb paraules. Però tampoc calen, ja sabem del que parlem :)

Al tio Jose, que li hauria fet molta il·lusió poder vindre a la meua defensa, et trobem a faltar. A Jesús i Reyes, mis titos, mis segundos padres. A Luis, por todo el cariño.

I per últim, l'agraïment més gran i especial als meus pares i la meua germana, que caminen amb mi a cada pas que done, que són la meua roca i el meu gran suport cada dia. Sou el més important, i res del que he aconseguit a la vida haguera sigut possible sense vosaltres, sempre disposats a fer qualsevol cosa per a que aconseguisca complir els meus somnis i ser feliç. Us estime.

INDICE CONTENIDOS

INDICE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Aspectos generales del cáncer de páncreas	3
2. Modelo de progresión tumoral del ACDP	5
3. Microentorno tumoral en el ACDP	7
3.1. Células estrelladas del páncreas (CEPs).....	9
3.2. Colaboración tumor-estroma.....	12
3.3. Estrategias terapéuticas dirigidas al estroma tumoral.....	14
4. Factor de transcripción ZEB1.....	16
4.1. ZEB1 en el ACDP.....	19
5. El oncogén <i>KRAS</i>	20
5.1. <i>KRAS</i> en el cáncer de páncreas.	21
5.2. Relación entre <i>KRAS</i> y el microentorno tumoral.....	25
5.3. Relación entre <i>KRAS</i> y ZEB1.....	26
6. Modelos para el estudio del ACDP	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Modelos murinos de experimentación	39
1.1. Modelo murino con mutación heterocigota de Zeb1 (<i>Zeb1^{+/-}</i>).....	39
1.2. Modelo murino de cáncer de páncreas	39
1.3. Modelo murino de lesiones precursoras	40
2. Cultivos celulares	41
2.1. Aislamiento de células estrelladas del páncreas (CEPs).....	41
2.2. Aislamiento de acinos	43
2.3. Aislamiento de células neoplásicas pancreáticas obtenidas de tumores <i>KPC;Z^{+/+}</i>	45
2.3.1. <i>KPC</i> : Cancer Cell Isolation Kit (Panomics)	45
2.3.2. <i>KPC1</i> : outgrowth	46
2.4. Cultivo de células neoplásicas pancreáticas <i>Emyc-3</i> y <i>Panc02</i>	47
3. Genotipado.....	47
3.1. Extracción de ADN	47

3.2. PCR estándar	47
4. Generación de tumores subcutáneos	50
5. Ensayos de metaplasia acino-ductal (cultivo de acinos en 3D)	51
6. Generación de medio condicionado (MC)	53
7. Tinciones histológicas	53
7.1. Inmunofluorescencia	54
7.2. Inmunohistoquímica	54
7.3. Histoquímica	55
7.3.1. Hematoxilina y eosina	55
7.3.2. Tricómico de Mallory	55
7.3.3. Alcian blue	56
8. Ensayo de migración celular (<i>wound healing</i>)	57
9. Ensayo de invasión	57
10. Ensayo de proliferación	58
11. Determinación de fragmentación de ADN	59
12. Análisis de citotoxicidad	59
13. Western Blotting	60
13.1. Extracción de proteínas	60
13.2. Cuantificación de proteínas	61
13.3. Electroforesis	61
13.4. Transferencia	62
13.5. Inmunodetección de las proteínas	62
13.6. Cuantificación de las bandas	63
14. Análisis de actividad Ras	64
14.1. Preparación de muestras	64
14.2. <i>Pull-down</i> de Ras (muestra A)	65
14.3. Preparación de proteínas totales (muestra B)	65
14.4. Inmunodetección	65
15. Transfección con RNA interferencia	66
16. Análisis de expresión de ARNm mediante RT-qPCR	67
16.1. Extracción y purificación del ARN	67
16.2. Cuantificación y calidad del ARN	68
16.3. Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)	68
16.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	69
17. Ensayo transcriptómico	70
17.1. Análisis bioinformático	71
18. Análisis estadístico	72

RESULTADOS	73
1. La haploinsuficiencia de <i>Zeb1</i> retrasa el desarrollo del cáncer de páncreas inducido por <i>Kras</i>	75
2. <i>Zeb1</i> se expresa predominantemente en los miofibroblastos del estroma asociados a lesiones preneoplásicas y neoplásicas.	78
3. La haploinsuficiencia de <i>Zeb1</i> retarda la activación del estroma durante la carcinogénesis pancreática inducida por <i>Kras</i>	82
4. Las CEPs con haploinsuficiencia de <i>Zeb1</i> no promueven el crecimiento tumoral..	85
5. La deficiencia de <i>Zeb1</i> en las CEPs condiciona un fenotipo menos activo en estas células.	87
6. Las CEPs haploinsuficientes en <i>Zeb1</i> muestran un perfil protumoral limitado.	92
7. <i>Zeb1</i> en las CEPs promueve la activación de Ras desde estadios iniciales de la enfermedad.	96
8. La expresión de <i>Zeb1</i> en las CEPs regula vías de señalización implicadas en su activación y en la carcinogénesis pancreática.	100
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO	141

INDICE FIGURAS

Figura 1. Proceso de metaplasia acino-ductal (MAD).....	5
Figura 2. Representación del modelo de progresión oncogénica del ACDP	6
Figura 3. Progresión del microentorno tumoral durante el desarrollo del ACDP.	9
Figura 4. Activación de las CEPs.....	11
Figura 5. Comunicación bidireccional tumor-estroma.....	13
Figura 6. El estroma como arma de doble filo.	16
Figura 7. Dominios estructurales y principales proteínas de unión de ZEB1 y ZEB2...	17
Figura 8. Diagrama de activación de RAS.....	21
Figura 9. Modelo de la participación del oncogén <i>Kras</i> en el desarrollo del ACDP basado en tumores KPC.....	23
Figura 10. Interacción mediada por <i>Kras</i> entre las células tumorales y células del estroma circundante.....	25
Figura 11. Técnicas para la generación de GEMMs de lesiones precursoras y de ACDP.....	29
Figura 12. Esquema de la generación y validación de organoides.....	31
Figura 13. Generación de alelos mutantes de <i>Kras</i> ^{G12D} y <i>p53</i> ^{R172H}	40
Figura 14. Esquema de cruces para la generación de los modelos murinos y líneas celulares primarias utilizadas en este estudio.	41
Figura 15. Confluencias que puede tener la suspensión de acinos.....	52
Figura 16. Morfologías ductales tras el cultivo en Matrigel®.	53
Figura 17. Campos por inserto para la cuantificación de la invasión celular.	58
Figura 18. Unión Ras-GTP al dominio RBD.....	64
Figura 19. Inmunoprecipitación de Ras-GTP.....	66
Figura 20. La delección monoalélica de <i>Zeb1</i> retrasa el desarrollo del ACDP en ratones <i>Pdx1-Cre;LSL-Kras</i> ^{G12D} ; <i>p53</i> ^{R172H/+}	76
Figura 21. Características histológicas de los páncreas de ratones KPC con expresión completa y deficiente de <i>Zeb1</i>	77
Figura 22. La heterocigosis de <i>Zeb1</i> condiciona una menor expresión de <i>Zeb1</i> en las lesiones pancreáticas desarrolladas en ratones KPC.....	79
Figura 23. Expresión de <i>Zeb1</i> en diferentes tipos celulares de páncreas de ratones KPC; <i>Z</i> ^{+/+} y KPC; <i>Z</i> ^{+/-}	80
Figura 24. La haploinsuficiencia de <i>Zeb1</i> condiciona una menor densidad de miofibroblastos y de células positivas para <i>Zeb1</i> en las lesiones pancreáticas desarrolladas en ratones KPC.	81

Figura 25. La haploinsuficiencia de Zeb1 resulta en una menor activación del estroma fibroinflamatorio pancreático asociado al desarrollo neoplásico en ratones KPC.....	84
Figura 26. La deficiencia de Zeb1 no impide la formación de ACDP en ratones KPC;Z ^{+/-} a largo plazo.....	85
Figura 27. La heterocigosis de Zeb1 en las CEPs retarda el crecimiento tumoral en un modelo murino subcutáneo de cáncer de páncreas.	86
Figura 28. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs afecta a su fenotipo activado pero no revierte su naturaleza miofibroblástica.....	88
Figura 29. El silenciamiento de Zeb1 en las CEPs inhibe el fenotipo activado sin comprometer su viabilidad.	89
Figura 30. La haploinsuficiencia de Zeb1 disminuye la capacidad migratoria de las CEPs.	90
Figura 31. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad proliferativa.	90
Figura 32. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs aumenta su vulnerabilidad a la apoptosis.....	91
Figura 33. Morfología y expresión de Zeb1 de las líneas celulares Emyc-3 y Panc02.	92
Figura 34. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad pro-migratoria.	93
Figura 35. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad pro-invasiva.	94
Figura 36. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad de promover la proliferación en las células neoplásicas.	95
Figura 37. La expresión de Zeb1 en las CEPs induce MAD en células acinares.	96
Figura 38. La expresión de Zeb1 en las CEPs media de manera paracrina la fosforilación de Akt en las células acinares.....	97
Figura 39. La expresión de Zeb1 en las CEPs estimula de manera paracrina la fosforilación de Akt en las células neoplásicas.	98
Figura 40. La expresión de Zeb1 en las CEPs induce de manera paracrina la actividad de Kras en las células neoplásicas.	99
Figura 41. Vías de señalización canónicas reguladas por Zeb1.....	102
Figura 42. Heatmap de los genes regulados por Zeb1.....	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: componentes y concentraciones de la solución de digestión	41
Tabla 2: componentes y concentraciones de la solución de lavado.	42
Tabla 3: componentes y concentraciones de la solución de gradiente.....	42
Tabla 4: componentes y concentraciones del medio de cultivo de las células estrelladas.....	42
Tabla 5: componentes y concentraciones de la solución de digestión.	43
Tabla 6: componentes y concentraciones de la solución de lavado 1.	44
Tabla 7: componentes y concentraciones de la solución de lavado 2.	44
Tabla 8: componentes y concentraciones del medio de cultivo de acinos.	44
Tabla 9: componentes en la reacción de PCR.....	48
Tabla 10: nombres y secuencias de los cebadores para Zeb1.....	48
Tabla 11: condiciones específicas de PCR para Zeb1.	48
Tabla 12: nombres y secuencias de los cebadores para <i>Kras</i>	49
Tabla 13: condiciones específicas de PCR para <i>Kras</i>	49
Tabla 14: nombres y secuencias de los cebadores para p53.....	49
Tabla 15: condiciones específicas de PCR para p53.	49
Tabla 16: nombres y secuencias de los cebadores para <i>Cre</i>	50
Tabla 17: condiciones específicas de PCR para <i>Cre</i>	50
Tabla 18: componentes y concentraciones del medio completo para el cultivo de acinos en 3D.	53
Tabla 19: Anticuerpos y concentraciones usadas para las tinciones por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.	55
Tabla 20: Reactivos del kit de Tricrómico de Mallory.....	56
Tabla 21: componentes y concentraciones del tampón de lisis RIPA.	60
Tabla 22: Composición del tampón comercial de electroforesis.....	62
Tabla 23: Lista de anticuerpos primarios con sus correspondientes condiciones de incubación.....	63
Tabla 24: Composición del TBS-T	63
Tabla 25: Composición del tampón reductor SDS-PAGE (2x).....	65
Tabla 26: Condiciones de la retrotranscripción en el termociclador.....	69
Tabla 27: Nombre del gen, tamaño del amplicón y identificación de los cebadores utilizados para realizar la RT-qPCR.....	70
Tabla 28: Condiciones de PCR en el termociclador.	70
Tabla 29: Principales funciones biológicas reguladas por Zeb1.....	101

ABREVIATURAS

3D	Tres dimensiones
5-FU	5-Fluorouracilo
ACDP	Adenocarcinoma Ductal de Páncreas
ADNc	ADN complementario
AH	Ácido hialurónico
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Albúmina de suero bovino
CEPs	Células estrelladas del páncreas
CK19	Citokeratina 19
CHX	Cicloheximida
CtBP	<i>C-terminal binding proteins</i>
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
dNTPs	Desoxinucleótidos
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced ChemoLuminiscent</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fw	<i>Forward</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GEMM	<i>Genetically engineered mouse model</i>
GDP	<i>Guanosine-5'-diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine exchange factor</i>
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleucina
IPA	<i>Integrated[®] Pathway Analysis</i>
KPC	<i>LSL-K-Ras^{G12D};p53^{R172H/+};Pdx1-Cre</i>
LDS	Dodecilsulfato de litio
MAD	Metaplasia acino-ductal

MC	Medio condicionado
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasas de matriz
NFkB	Factor nuclear kappa B
NFW	Agua libre de nucleasas
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
ON	<i>Overnight</i>
PanIN	<i>Pancreatic Intraepithelial neoplasms</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSP	<i>Pancreas-specific promoter</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RBD	<i>Ras-binding domain</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retrotranscripción
RTK	Receptor tirosina-cinasa
Rv	<i>Reverse</i>
SBF	Suero bovino fetal
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
siARN	ARN pequeño de interferencia
TA	Temperatura ambiente
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TEM-ATFs	Factores de activación de la TEM
TGF α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRF	<i>Tocotrienol Rich Fraction</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homebox 1</i>
α SMA	<i>Smooth muscle actin alpha</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales del cáncer de páncreas

Las neoplasias pancreáticas se pueden agrupar dependiendo de la línea de diferenciación epitelial (ductal, acinar o endocrina) a la que imiten. Entre ellas, el adenocarcinoma ductal de páncreas (ACDP) y sus variantes histológicas son el grupo más frecuente, constituyendo aproximadamente el 95%^{1,2} de los casos de tumores malignos del páncreas en adultos.

A pesar de presentar una baja incidencia en países desarrollados, el ACDP está asociado a una supervivencia muy reducida, motivo por el cual fue la cuarta causa de muertes por cáncer en el año 2016³. Es destacable la creciente incidencia de esta enfermedad, de manera que se prevé que en 2030 el ACDP sea la segunda causa de muerte por cáncer^{4,5}. Estos datos ponen de manifiesto la extrema agresividad del ACDP.

Existen diversas razones que justifican el mal pronóstico de esta enfermedad. Una de ellas es que en la mayoría de casos el cáncer de páncreas se diagnostica en estadios avanzados dada la ausencia de sintomatología específica en estadios precoces y a la falta de biomarcadores tumorales específicos. Por otro lado, se trata de un tipo de tumor que se disemina de manera muy precoz a órganos distantes a través de la invasión ganglionar, perineural y vascular, lo cual limita el tratamiento quirúrgico del tumor en la mayoría de casos. La tercera razón que justifica su mal pronóstico es su elevada resistencia a las terapias actualmente disponibles de quimioterapia, en combinación o no con radioterapia. Por último, la elevada complejidad a nivel genético del cáncer de páncreas⁶ dificulta el conocimiento de esta enfermedad y el diseño de terapias efectivas. La combinación de estos factores resulta en una tasa de supervivencia extraordinariamente baja, que es globalmente del 5-10% a los 5 años si se consideran todos los casos y del 20% si se analizan los pacientes con tumores localizados y resecados quirúrgicamente.

Se conocen diversos factores que aumentan el riesgo de padecer cáncer de páncreas. La edad y el sexo se consideran los mayores determinantes para desarrollar ACDP, ya que la gran mayoría de casos se desarrollan en pacientes a partir de los 60 años de edad, y la incidencia es un 50% mayor en hombres que en mujeres¹. Por otra

parte, existen una serie de factores de riesgo que, a diferencia de la edad y el sexo, son prevenibles. Alrededor de un 20% de los casos de cáncer de páncreas son atribuibles al consumo de tabaco, el cual incrementa de dos a tres veces y de forma dosis-dependiente el riesgo de sufrir este tipo de cáncer⁷. La obesidad y el consumo elevado de grasas saturadas, de carnes rojas y procesadas y de alcohol también se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad⁸⁻¹². La pancreatitis crónica incrementa también (hasta 10 veces) el riesgo de desarrollar esta neoplasia¹³⁻¹⁵. Por último, existe una base hereditaria de predisposición genética que afecta al 10% de los casos¹.

Como ya se ha mencionado, la falta de terapias efectivas para el tratamiento del cáncer de páncreas es uno de los factores clave que justifica el devastador curso de la enfermedad. Actualmente, la resección quirúrgica se considera la única opción curativa para pacientes con tumores localizados (aproximadamente un 20% de los casos), y ofrece una supervivencia media de 15-20 meses así como una tasa de supervivencia del 20% a los 5 años. El 80% de casos restantes corresponden a tumores localmente avanzados o metastásicos, para los que se descarta la cirugía y el único abordaje terapéutico disponible es la quimioterapia, combinada o no con radioterapia. Un ensayo clínico publicado en 1997 comparando los efectos de la gemcitabina y del 5-fluoracilo, mostraron una media de supervivencia de 5.65 y 4.41 meses respectivamente¹⁶. Desde entonces, la gemcitabina se ha utilizado como quimioterápico de primera línea. Recientemente, se han introducido dos nuevas pautas de tratamiento, que son FOLFIRINOX (una combinación de oxaliplatino, irinotecan, 5-fluoracilo y leucovorin) y la combinación de gemcitabina con nab-paclitaxel (paclitaxel unido a una nanomolécula de albúmina), las cuales han mostrado un aumento significativo, aunque ciertamente escaso, en la supervivencia media de 4.3 y 1.8 meses respectivamente en pacientes con enfermedad metastásica. Por tanto, la realidad actual es que los quimioterápicos disponibles son de muy baja eficacia, ya que sólo consiguen alargar en pocos meses la supervivencia y en ningún caso curan la enfermedad. Estos datos alertan sobre la necesidad urgente de nuevas acciones terapéuticas para el control del cáncer de páncreas.

2. Modelo de progresión tumoral del ACDP

Evidencias basadas en el *lineage-tracing* en tumores murinos demuestran que el adenocarcinoma ductal de páncreas tiene su origen en la célula acinar¹⁷⁻¹⁹. Estas células acumulan mutaciones activadoras en el oncogén *KRAS* y sufren como consecuencia una transformación hacia célula ductal mediante un proceso conocido como metaplasia acino-ductal (MAD)^{20,21}. Durante esta transformación la célula pierde su fenotipo acinar, con la pérdida de expresión de marcadores acinares (como amilasa, lipasa y Mist1), y adquiere fenotipo ductal, con la consiguiente adquisición de marcadores ductales (como citokeratina 19 (CK19), Sox9 y Pdx1) (Figura 1). A nivel morfológico, la MAD se reconoce por la aparición de estructuras ductales con una luz central, cuyas células pueden expresar simultáneamente marcadores ductales y acinares. Cabe destacar que la aparición de este tipo de lesión no tiene que culminar necesariamente en el desarrollo de cáncer de páncreas, ya que estas estructuras también se identifican en la pancreatitis crónica.

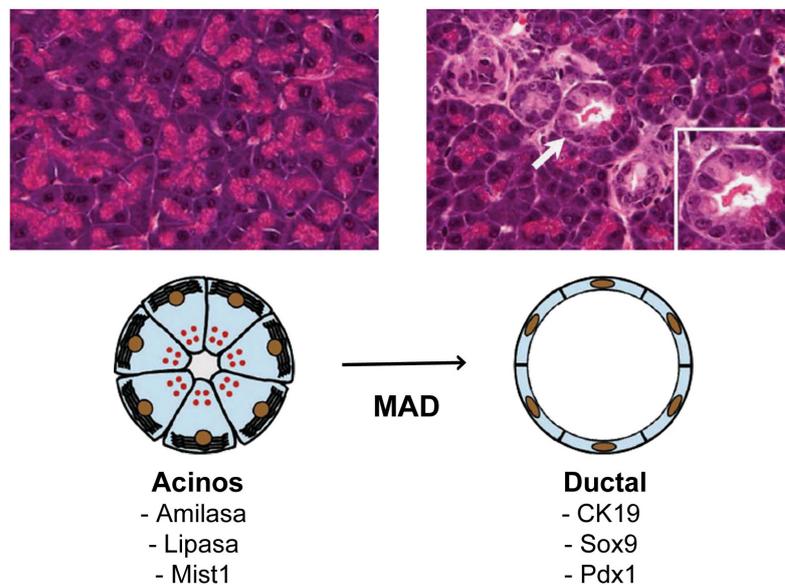


Figura 1. Proceso de metaplasia acino-ductal (MAD).

Imágenes histológicas procedentes de tejido pancreático murino representativas del cambio morfológico que experimentan las células acinares durante el proceso de MAD. Los dibujos esquematizan el cambio morfológico de un grupo acinar hacia estructura ductal, y la respectiva expresión de marcadores acinares y ductales. Imagen adaptada²⁰.

Durante la evolución oncogénica pancreática, las lesiones generadas a través de MAD experimentan una transformación secuencial dando lugar a lesiones precursoras

del cáncer conocidas como PanINs (*Pancreatic Intraepithelial neoplasms*). Anteriormente, las lesiones PanIN se clasificaban en tres grados según su atipia celular y nuclear: PanIN1A y PanIN1B, con un bajo grado de displasia y de atipia nuclear y morfología celular cuboidal; PanIN2, con pérdida de polaridad, morfología celular cilíndrica e hiperchromasia; y PanIN3 o carcinoma *in situ*, que corresponde a la lesión avanzada, con atipia nuclear de alto grado y necrosis luminal, y donde se observan grupos de células embebidas en el espacio luminal del ducto^{22,23}. Aunque esta nomenclatura se sigue utilizando con frecuencia, la recomendación actual es clasificar los PanINs en bajo grado (que comprende PanIN1 y PanIN2) y alto grado (correspondientes a PanIN3)²⁴ (Figura 2). Las lesiones de bajo grado se observan frecuentemente en páncreas de individuos sanos de edad avanzada y de pacientes con pancreatitis crónica, sin relación con la existencia de ACDP. En cambio, las lesiones de alto grado tienen un potencial elevado para progresar hasta carcinoma invasivo, y se observan casi exclusivamente en pacientes que ya han desarrollado ACDP²².

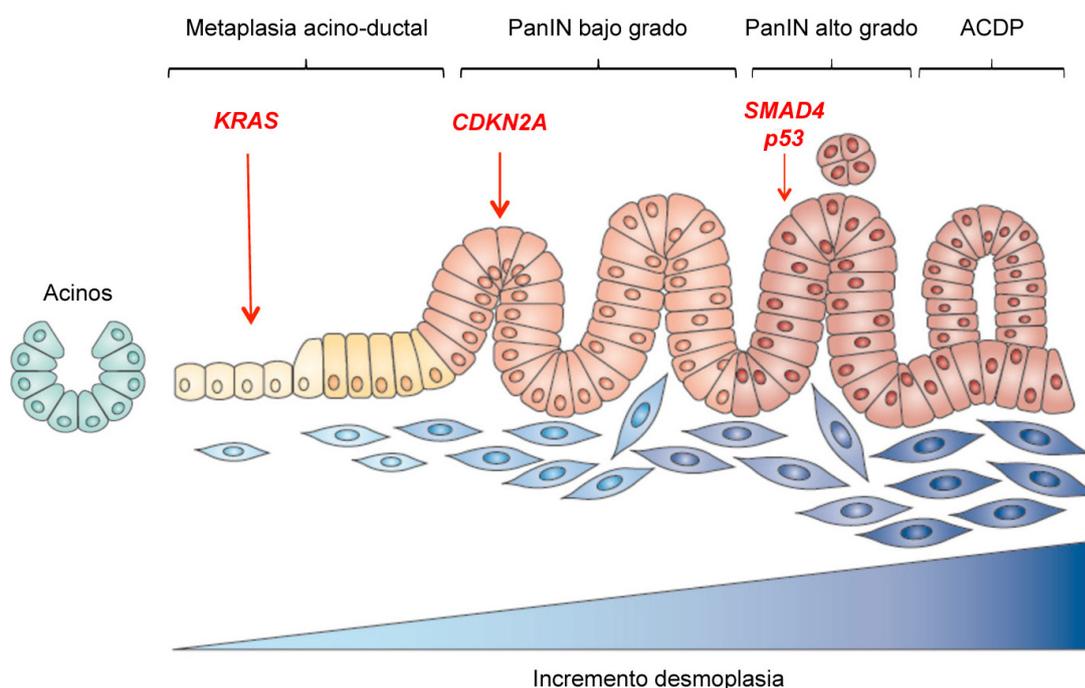


Figura 2. Representación del modelo de progresión oncogénica del ACDP

Las células acinares experimentan una transformación fenotípica que las convierte en células de tipo ductal, las cuales conformarán las lesiones precursoras de tipo MAD y PanIN de bajo y alto grado y finalmente el ACDP. La transformación secuencial del epitelio se acompaña de la generación de un abundante estroma fibroinflamatorio desde etapas muy iniciales. Esta secuencia morfológica está acompañada por mutaciones en oncogenes y en genes supresores

de tumores, como *KRAS*, *CDKN2A*, *SMAD4* y *P53*, necesarias para el desarrollo tumoral. Imagen adaptada²⁵

La progresión de MAD a PanIN y finalmente a ACDP se correlaciona con la adquisición secuencial de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Figura 2). Las mutaciones activadoras en el oncogén *KRAS* son las más prevalentes en el cáncer de páncreas (>95%)^{6,26,27} y las de aparición más temprana, hallándose en el 15-40% de lesiones PanIN de bajo grado^{6,28-30}; esta mutación posibilita la hiperactivación enzimática de manera sostenida de Ras, necesaria para la activación de rutas de señalización oncogénicas. Sin embargo, para que las lesiones precursoras progresen hacia ACDP es también necesaria la acumulación de mutaciones inactivadoras en genes supresores de tumores. Uno de ellos es el gen *CDKN2A*, el cual codifica las proteínas p16/INK4 y p14/ARF, y cuyas mutaciones se detectan en lesiones PanIN de bajo grado (30-40%) y en mayor proporción en lesiones de alto grado (95% de casos de ACDP)^{31,32}. Otras mutaciones inactivadoras frecuentes asociadas al cáncer de páncreas se encuentran en los genes supresores de tumores *TP53*^{33,34} y *SMAD4*⁶, las cuales aparecen en estadíos tardíos de la enfermedad (lesiones PanINs de alto grado: 50-75%)³¹.

Cabe destacar que estudios con modelos murinos han demostrado que la mutación oncogénica en *Kras* por si sola es suficiente para reprogramar las células acinares pancreáticas hacia un fenotipo ductal capaz de iniciar el desarrollo de lesiones precursoras de tipo MAD y PanIN^{19,35}; así mismo, confirman que es necesaria la acumulación de otras mutaciones en genes supresores como *CDKN2A*, *TP53* y *SMAD4* para completar con éxito la progresión hacia adenocarcinoma^{6,32,33,36,37}. Todo esto sugiere que el cáncer de páncreas es el resultado de la acumulación de mutaciones en diferentes genes y vías de señalización, siendo la mutación activadora de *KRAS* un evento clave para el inicio y desarrollo tumoral.

3. Microentorno tumoral en el ACDP

El desarrollo y progresión tumoral no depende únicamente de los mecanismos oncogénicos autónomos de las células neoplásicas, sino que su éxito está estrechamente ligado a los estímulos recibidos del microentorno en el que habitan. Este microentorno está representado por el estroma, una estructura compleja formada

por proteínas de la matriz extracelular (como colágenos, fibronectina y laminina) y por distintos tipos celulares (fibroblastos, células vasculares, neurales e inmunológicas)³⁸. Entre la matriz extracelular y el componente celular del estroma se establece una comunicación bidireccional dinámica, mediada por factores solubles de elevada actividad biológica cuya participación es esencial en el desarrollo tumoral y la diseminación metastásica³⁹⁻⁴².

El estroma pancreático tiene un papel importante en el correcto funcionamiento del órgano sano y en los procesos de reparación y cicatrización. Tras una agresión pancreática, como por ejemplo una pancreatitis aguda, el estroma responde activamente para reparar la lesión y restaurar la homeostasis pancreática. Durante el proceso de reparación se produce la activación de las células inmunológicas, los fibroblastos y las células vasculares del estroma, y como consecuencia, la generación de matriz extracelular y secreción de factores solubles bioactivos³⁸. Sin embargo, en procesos oncogénicos se produce una alteración en las comunicaciones intercelulares entre las células del estroma y las del compartimento epitelial, propiciando como resultado la creación de un microentorno favorable para la progresión tumoral^{38,43-45}.

Una característica muy significativa del ACDP es la existencia de un estroma abundante y denso, el cual puede llegar a constituir el 90% de la masa tumoral. El estroma que forma parte del tumor se conoce también como estroma desmoplásico; la desmoplasia se define como la proliferación exuberante de células del estroma dentro de una matriz extracelular alterada, que acompaña a la formación de un tumor^{44,46}. En el cáncer de páncreas, el compartimento desmoplásico es un sistema bioactivo rico en fibroblastos, células inmunológicas, vasculares y neurales que generan múltiples mediadores solubles que posibilitan la comunicación paracrina entre las diferentes células de la masa tumoral^{46,47}.

Cabe destacar que el microentorno fibroinflamatorio asociado al desarrollo del ACDP no es una entidad estática, sino un sistema en constante transformación desde el origen de las lesiones precursoras^{32,48-50}. Durante la progresión neoplásica, el estroma genera un hábitat inmunodeprimido que favorece el crecimiento, diseminación metastásica y resistencia terapéutica del cáncer³⁸ (Figura 3).

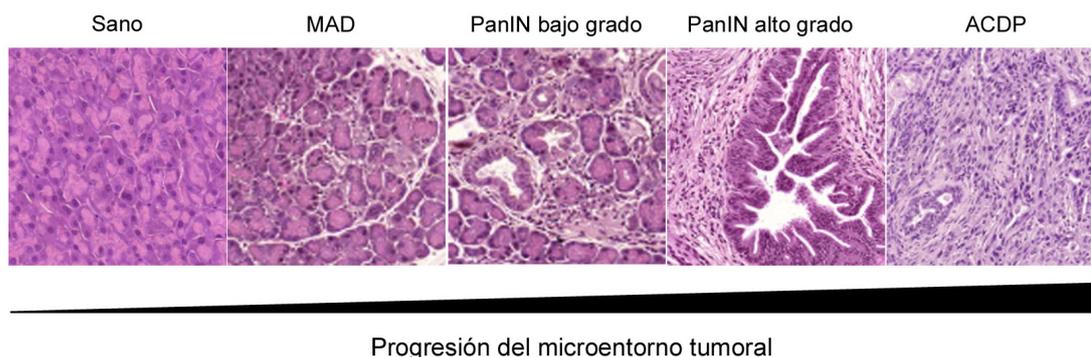


Figura 3. Progresión del microentorno tumoral durante el desarrollo del ACDP.

Imágenes de tejido pancreático de ratón teñido con H&E, que ilustran el aspecto histológico del estroma asociado a los distintos tipos de lesión que se forman durante el desarrollo del cáncer de páncreas.

El estudio del estroma tumoral ha sido posible gracias al desarrollo de modelos experimentales *ex vivo* e *in vivo* que reproducen la complejidad del microambiente tumoral. Uno de los más utilizados son los sistemas organotípicos, un modelo en tres dimensiones (3D) que reproduce la composición tumoral mediante el co-cultivo de células neoplásicas, fibroblastos y células inmunológicas en una matriz extracelular^{51,52}. Otra aproximación de gran valor son los modelos murinos genéticamente modificados de cáncer de páncreas; estos modelos se basan en la generación de ratones portadores de mutaciones genéticas condicionadas a las células progenitoras del páncreas mediante el alelo *Cre*^{33,34,49}. La mutación más comúnmente utilizada es la del oncogén Kras (*Kras*^{G12D/+}), a la cual se añaden otras mutaciones (como *p53*^{R172H/+}) con el fin de asegurar el desarrollo tumoral. Estos tumores recapitulan la trayectoria histopatológica del ACDP humano, desde la generación de lesiones precursoras de tipo MAD y PanIN hasta la formación de metástasis, todo acompañado de un estroma fibroinflamatorio comparable al del ACDP humano.

3.1. Células estrelladas del páncreas (CEPs)

Las CEPs son el componente celular más abundante del estroma tumoral pancreático y tiene una participación clave en la oncogénesis del ACDP⁵³. Fueron identificadas por primera vez en 1998 tras su aislamiento y cultivo *in vitro*^{54,55}, lo cual

significó el inicio de un campo de estudio que ha permitido conocer su naturaleza y su actividad biológica en los procesos fibroinflamatorios y tumorales del páncreas.

En el páncreas sano, las CEPs representan un 4% de la masa celular, se hallan en estado quiescente y se distribuyen en el espacio periacinar e interlobular^{54,55}. El fenotipo quiescente de las CEPs se caracteriza por su morfología estrellada, contenido en gotas lipídicas perinucleares de vitamina A, y expresión de proteínas citoplasmáticas de filamentos intermedios como desmina o proteína gliofibrilar ácida (GFAP)^{38,54}. En respuesta a determinados estímulos nocivos en el páncreas (como la inflamación) las células dañadas liberan grandes cantidades de factores solubles bioactivos, como citoquinas pro-inflamatorias (interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)), factores de crecimiento (como TGF β 1 (*transforming growth factor β 1*) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)) y especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros⁵⁶⁻⁵⁹. Estos mediadores inducen la activación de las CEPs, las cuales adquieren un fenotipo de tipo miofibroblástico, caracterizado por una morfología fibroblastoide, pérdida de las gotas lipídicas de vitamina A, pérdida de la expresión de desmina, expresión de α -actina del músculo liso (α SMA), expresión de receptores de PDGF y TGF β , capacidad de proliferar, de migrar y de producir factores solubles y proteínas de la matriz extracelular (MEC)^{54,55,60}. Una vez activadas, las CEPs son capaces de mantener su propio estado de activación a través de la producción autocrina de factores como PDGF, TGF β 1, y citoquinas y otras moléculas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, COX-2)⁶¹⁻⁶³ (Figura 4).

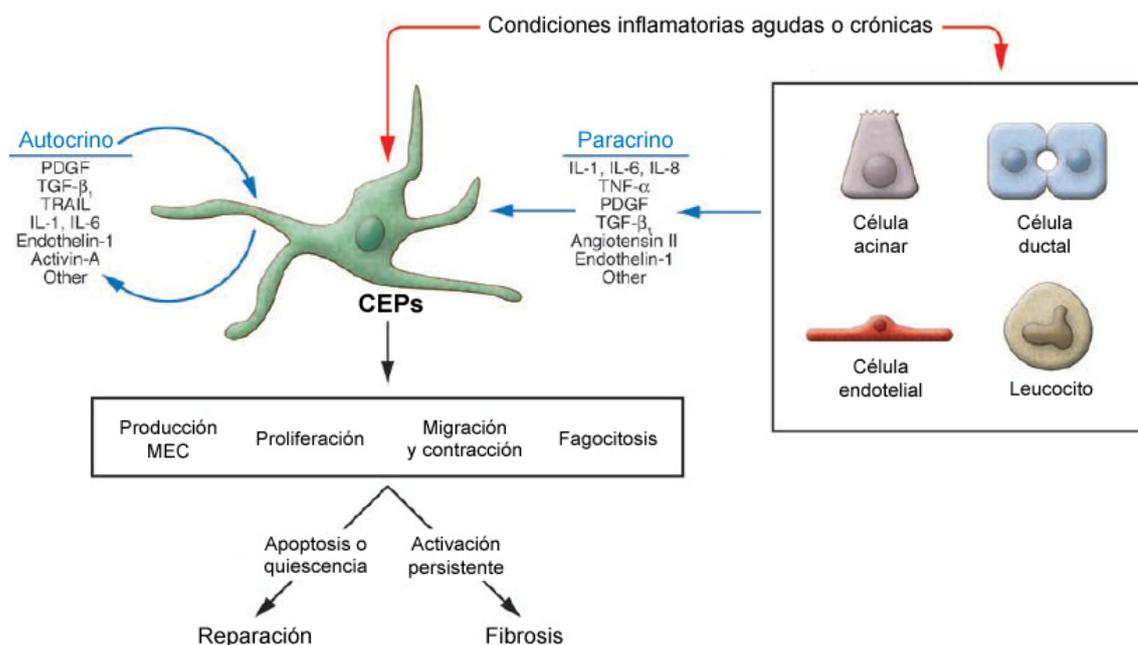


Figura 4. Activación de las CEPs.

En respuesta a una agresión pancreática las células dañadas generan factores solubles que activan las CEPs que se encuentran próximas. Una vez activadas, las CEPs pueden volver a su estado quiescente o entrar en apoptosis tras completar la reparación del tejido, o mantenerse activas mediante estimulación autocrina a través de la generación de sus propios factores. Imagen adaptada⁶⁴

Además de su función reparadora en respuesta a una agresión pancreática, las CEPs tienen un demostrado efecto pro-tumoral. Estudios *in vitro* demuestran que las CEPs activadas promueven la quimio y radioresistencia^{41,65,66}, y la proliferación y migración de las células neoplásicas del páncreas a través de mecanismos paracrinos^{38,40,53,67}. En modelos murinos de cáncer de páncreas también se ha demostrado que las CEPs favorecen el crecimiento tumoral^{40,53} y la diseminación metastásica^{68,69}. Estos estudios respaldan la idea de que la activación continuada y aberrante de la población de CEPs genera un microentorno que acompaña y favorece desde el inicio⁷⁰ el proceso oncogénico y la diseminación metastásica del cáncer de páncreas³⁸.

A pesar de que los fibroblastos asociados al cáncer de páncreas se identifican frecuentemente como CEPs activas⁶⁸, diversos estudios demuestran que esta población es más compleja y heterogénea, ya que incluye también células mesenquimales de la médula ósea, fibroblastos sin fenotipo miofibroblástico y miofibroblastos derivados de células epiteliales a través de la transición epitelio-

mesénquima^{71,72}. Cabe destacar que las CEPs pueden encubrir células madre del cáncer con características morfológicas de miofibroblasto muy similares y originadas a partir de células epiteliales tumorales⁷³.

Los fibroblastos del estroma tumoral también se denominan CAFs (*Cancer Associated Fibroblasts*). Las CEPs que habitan el estroma tumoral tras experimentar un proceso de activación durante la oncogénesis forman parte de la población de CAFs. Sin embargo, las CEPs activadas no están presentes únicamente en el contexto del cáncer sino también en entidades no tumorales, como los estadios precursores de la enfermedad (MAD y PanIN de bajo grado) o la pancreatitis crónica⁴⁴. En esta tesis se ha aislado y estudiado la población de CEPs específicamente.

3.2. Colaboración tumor-estroma

Son numerosas las evidencias que corroboran que la interacción bidireccional del estroma tumoral con las células neoplásicas promueve el inicio, crecimiento, invasión y quimioresistencia del cáncer de páncreas⁷⁴. Diversos estudios *in vitro* demuestran que las células neoplásicas reclutan las CEPs hacia sus proximidades, y éstas a su vez fomentan la actividad tumoral de las células neoplásicas promoviendo su proliferación^{40,41,60}, inhibiendo la respuesta apoptótica^{40,41}, facilitando la migración e invasión⁴⁰, activando la transición epitelio-mesénquima⁷⁵ y proporcionando quimio y radioresistencia^{41,65,66,76}. Por otro lado, las células neoplásicas favorecen la adquisición y el mantenimiento del estado de activación de las CEPs, como demuestran la mayor tasa de proliferación y de secreción de MEC en respuesta al medio condicionado de células tumorales pancreáticas^{53,60,76,77} (Figura 5).

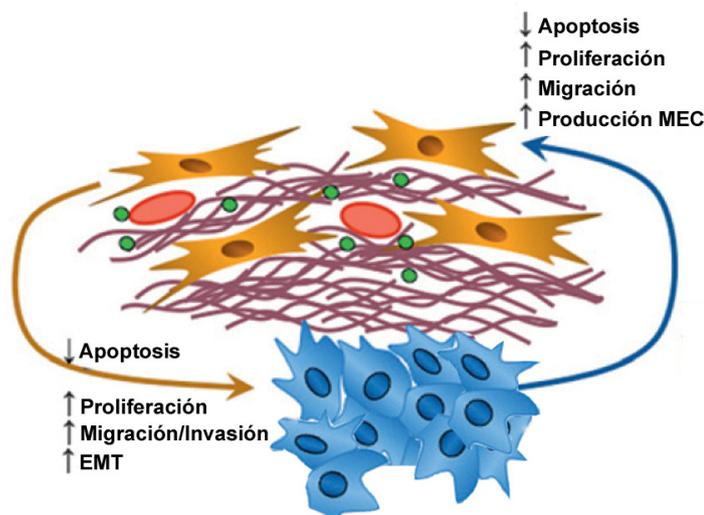


Figura 5. Comunicación bidireccional tumor-estroma.

Imagen descriptiva de los efectos celulares derivados de las interacciones entre células neoplásicas (azul) y CEPs del estroma (amarillo). Imagen adaptada⁴⁵.

Aunque los sistemas *in vitro* son una buena herramienta para analizar determinados efectos celulares, esta aproximación cuenta con limitaciones que deben ser consideradas. Una de ellas es que el proceso de aislamiento celular y el mantenimiento en cultivo de las CEPs puede afectar a la naturaleza y el comportamiento de estas células. Además, los cultivos celulares en monocapa no reproducen la complejidad celular del tumor. Estas limitaciones no existen al utilizar modelos murinos de cáncer de páncreas; los tumores subcutáneos y ortotópicos permiten estudiar la interacción entre células al coinyectar CEPs y células neoplásicas. Utilizando esta aproximación, se ha corroborado que las CEPs incrementan la reacción desmoplásica y promueven el crecimiento tumoral, la invasión local y las metástasis^{40,41,53,60,78}. Es muy demostrativo el estudio de Vonlaufen et al., en el que el modelo tumoral ortotópico generado mediante la coinyección de CEPs y células neoplásicas pancreáticas muestra mayor crecimiento tumoral y más metástasis con respecto a los tumores generados sólo con células tumorales; estos resultados ponen de manifiesto que la interacción entre ambos tipos celulares favorece la supervivencia celular y la progresión tumoral⁴⁰. Otros estudios *in vivo* han observado que las CEPs acompañan a las células neoplásicas del tumor primario en la creación de focos metastáticos, siendo capaces de entrar en el torrente sanguíneo, sobrevivir en circulación y establecer en órganos distantes un microambiente favorable que facilite el crecimiento de las células tumorales y la formación de nódulos metastáticos^{40,41,69,79}.

La señalización intercelular entre las células tumorales y las CEPs resulta en cambios transcripcionales que condicionan la activación de vías de señalización implicadas en la oncogénesis⁸⁰. Las CEPs activas producen un secretoma con actividad protumoral sobre el compartimento epitelial^{81,82}. Dicho secretoma contiene una gran cantidad de mediadores solubles, entre los que se incluyen factores como CTGF, HGF o EGF, que activan la vía de señalización de Ras-MAPK^{83,84}, y moléculas como interleucinas capaces de activar la vía de señalización de STAT3 en las células tumorales⁸⁵. Además de mediar cambios a nivel transcripcional, se ha demostrado que los factores secretados por las CEPs también modifican ampliamente el estado epigenético del tumor³⁹.

3.3. Estrategias terapéuticas dirigidas al estroma tumoral

En el cáncer de páncreas, la comunicación entre células tumorales y el estroma tiene una participación clave en la resistencia terapéutica frente a las estrategias clásicas dirigidas únicamente a las células neoplásicas⁴⁴. Ello ha suscitado un creciente interés sobre la identificación de dianas del estroma susceptibles de actuación terapéutica.

Estudios preclínicos han demostrado la efectividad de terapias que actúan selectivamente sobre moléculas del estroma tumoral inhibiendo vías de señalización específicas, como Sonic Hedgehog (SHH), TGF β ⁸⁶ o mTOR/4E-BP1⁸⁷. Estas aproximaciones tienen como uno de sus objetivos reducir la densidad del estroma y facilitar de esa manera la accesibilidad de los fármacos a las células tumorales.

La vía de señalización de SHH es uno de los principales mediadores del desarrollo del estroma desmoplásico. Por ello, se han desarrollado inhibidores de SHH que reducen la proliferación de los fibroblastos asociados al tumor, y como consecuencia modifican el estroma tumoral. Un ejemplo es el inhibidor IPI-926, cuyo uso en modelos murinos de cáncer de páncreas consigue reducir el volumen del estroma tumoral, incrementar la densidad vascular en el tumor y mejorar la concentración de gemcitabina intratumoral, lo cual resulta en una mayor supervivencia de los animales⁸⁸. En base a estos prometedores resultados, se han llevado a cabo ensayos clínicos en pacientes de cáncer de páncreas avanzado tratados con IPI-926 en combinación con gemcitabina. Sin embargo, el estudio fue interrumpido al observar

una menor supervivencia en el brazo de tratamiento con IPI-926 + gemcitabina respecto a la gemcitabina en monoterapia (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01130142>). A pesar de la falta de éxito de los ensayos clínicos, el estudio preclínico realizado por Olive et al. con el inhibidor IPI-926⁸⁸ puso de manifiesto que la rigidez biofísica de la MEC contribuye a la resistencia terapéutica del ACDP al comprimir los vasos sanguíneos y reducir la perfusión, lo que en última instancia restringe el acceso de los fármacos a las células neoplásicas⁸⁹.

En base a esta idea, investigaciones posteriores desarrollaron ensayos alternativos dirigidos selectivamente a determinados componentes de la MEC, como el ácido hialurónico^{90,91} o la proteína matricelular CTGF⁹², con la intención de reducir la densidad del estroma y mejorar la liberación de los quimioterápicos. El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano que forma parte del tejido conectivo en órganos sanos. En los tumores sólidos se acumula AH, produciendo como consecuencia un aumento de la presión intersticial y la compresión de los vasos sanguíneos. La degradación enzimática del AH con hialuronidasa en modelos murinos de cáncer de páncreas remodela la matriz extracelular, disminuyendo la presión del fluido intersticial del tumor, incrementando el diámetro vascular y mejorando la biodisponibilidad tumoral de los quimioterápicos, lo cual resulta en un incremento de la supervivencia^{90,91}.

Sin embargo, dos estudios recientes en tumores murinos generados mediante modificación genética alertan sobre el riesgo de manipular el estroma tumoral, al demostrar que la eliminación de los fibroblastos del cáncer y la consecuente reducción del estroma resultan en una mayor agresividad tumoral^{93,94}. Uno de los estudios utiliza ratones con delección genética de SHH en el páncreas, y el otro ratones a los que se ha silenciado la expresión de fibroblastos SMA+ en el páncreas, produciéndose en ambos casos una disminución casi total del estroma. Sin embargo, el resultado fue la generación de tumores más indiferenciados, con una mayor vascularidad y proliferación de células tumorales, mayor diseminación metastásica y menor supervivencia.

En vista de estos resultados, el estroma se considera un arma de doble filo, ya que por una parte ejerce una función pro-tumoral y por otra parece limitar el crecimiento del tumor, en parte actuando de barrera contra la diseminación metastásica (Figura 6).

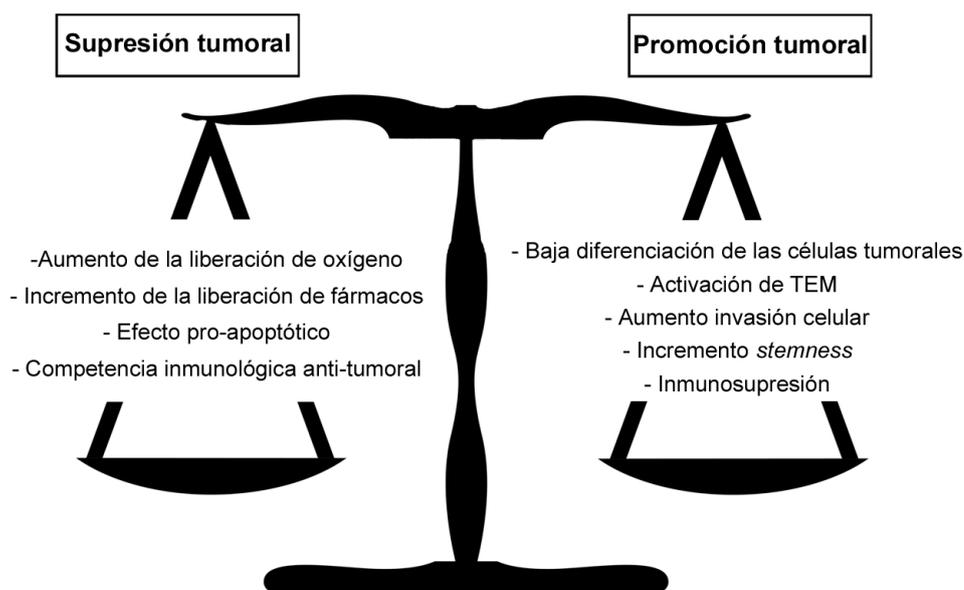


Figura 6. El estroma como arma de doble filo.

La eliminación total del estroma puede tener efectos pro-tumorales, generando como resultado un incremento de características pro-tumorales como la proliferación, invasión, TEM (transición epitelio-mesénquima) y *stemness*. Sin embargo, la reprogramación de este compartimento puede generar un beneficio, provocando efectos como el aumento en la liberación de fármacos y la sensibilización inmunológica.

Por esta razón, el interés actual está dirigido a la creación de nuevas estrategias capaces de remodelar y no de eliminar el estroma tumoral. Con esta aproximación más fisiológica se pretende recuperar el potencial beneficioso del estroma y que sea éste el que ejerza la función anti-tumoral⁹⁵. En este sentido, estudios recientes con tumores murinos pancreáticos han demostrado el potencial efecto de la vitamina A y la vitamina D como remodeladores del estroma; ambas vitaminas inducen la quiescencia de las CEPs, reducen la competencia protumoral del estroma y aumentan la supervivencia^{81,96}.

4. Factor de transcripción ZEB1

ZEB1 (Zinc finger E-box binding homebox 1) es un factor de transcripción nuclear que, junto con ZEB2, forma parte de la familia de proteínas ZEB; estas proteínas se encuentran altamente conservadas entre especies. La expresión de Zeb1 se detectó por primera vez en embriones de pollo, tanto en tejido mesodérmico como en en

tejidos del corazón y del sistema nervioso durante en desarrollo embrionario⁹⁷. ZEB1 tiene un papel esencial en el desarrollo embrionario. La eliminación de la secuencia codificante de *Zeb1* (y por tanto de su expresión) en ratones modificados genéticamente tiene como consecuencia importantes defectos de desarrollo a nivel esquelético y la muerte perinatal del embrión⁹⁸. Otra consecuencia observada es la expresión ectópica de E-cadherina y la pérdida de marcadores mesenquimales como la vimentina en distintos tejidos del organismo y en los fibroblastos aislados de los embriones⁹⁹.

Estructuralmente, las proteínas de la familia ZEB se caracterizan por poseer un homeodominio flanqueado por dos dedos de zinc en los extremos N- y C-terminal, que son los responsables de unirse a secuencias de ADN (conocidas como cajas ZEB o *E-box*) en las regiones reguladoras de los genes diana^{100,101}. Las proteínas de la familia ZEB contienen además regiones independientes que median su unión al ADN, a otros factores de transcripción y a diversos cofactores. Estas regiones consisten en un dedo de zinc extra (mid-ZF)¹⁰², un dominio de interacción con Smad (SID) al que se unen receptores activados de Smad que regulan genes de la vía de señalización de TGF β /BMP^{103,104}, y un dominio llamado CID de interacción con las proteínas corepresoras CtBPs (*C-terminal binding proteins*)^{105,106} (Figura 7).

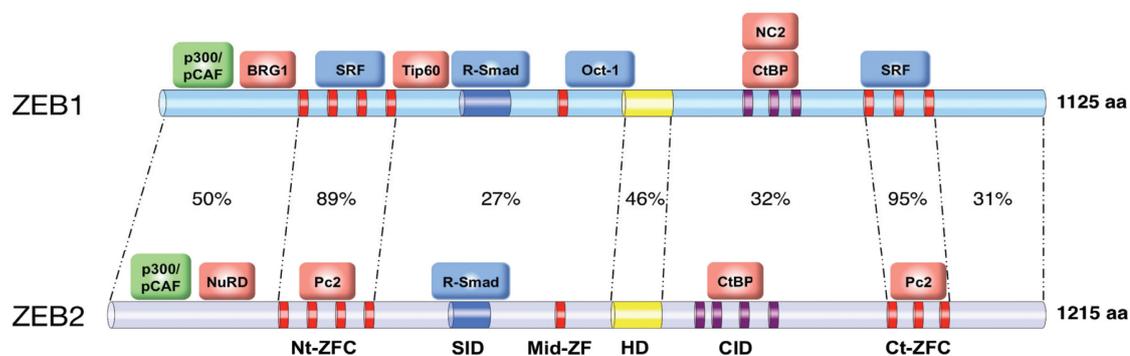


Figura 7. Dominios estructurales y principales proteínas de unión de ZEB1 y ZEB2.

Los porcentajes indican la similitud aminoacídica entre ambos. En verde están representadas las proteínas coactivadoras, en rojo las corepresoras, y en azul otros factores de transcripción. Nt-ZFC: dedo de zinc N-terminal; Ct-BP: dedo de zinc C-terminal; SID: dominio de interacción con Smad; Mid-ZFC: dedo de zinc en medio de la proteína; HD: homeodominio; CID: dominio de interacción con Ct-BP. El mayor grado de similitud entre ZEB1 y ZEB2 se da en las regiones correspondientes a los dedos de zinc y al homeodominio. Imagen original¹⁰⁷.

Debido al número de dominios que posee, ZEB1 es capaz de reclutar una gran cantidad y variedad de factores de transcripción y cofactores. La complejidad en el número y naturaleza de factores de interacción anticipa la elevada actividad transcripcional de esta proteína. Aunque Zeb1 se identificó inicialmente como un represor transcripcional¹⁰⁸⁻¹¹⁰ esta proteína también actúa como activador dependiendo del contexto celular en el que se encuentre^{111,112}. Un claro ejemplo de la función transcripcional dual de ZEB1 es su capacidad de inducir TEM mediante la represión de genes de diferenciación epitelial y la activación de genes de tipo mesenquimal^{107,113,114}. La TEM es un programa de diferenciación celular mediante el cual las células pierden las características epiteliales (que incluyen la pérdida de polaridad celular y de marcadores de diferenciación epiteliales) y adquieren características mesenquimales (como la capacidad de migrar e invadir, y la expresión de marcadores mesenquimales). En su proceso de inducción de TEM, ZEB1 se une a las secuencias E-box del promotor de la E-cadherina y de otras proteínas de diferenciación epitelial, de polaridad y de uniones intercelulares, reprimiendo su expresión^{108,115}. A su vez, induce la activación de proteínas de diferenciación mesenquimal, como la vimentina y la N-cadherina, mediante la unión directa a sus regiones promotoras¹¹⁶. La TEM interviene en la diferenciación tisular durante el desarrollo embrionario y en la reparación tisular. Sin embargo, este programa se reactiva en procesos tumorales y de fibrogénesis para participar de manera activa en la diseminación metastásica y en la generación de tejido fibroinflamatorio.

En tejidos sanos ZEB1 se expresa mayoritariamente en células del estroma¹⁰⁷. En tejidos tumorales, ZEB1 no se expresa en las células neoplásicas que conforman las áreas bien diferenciadas del tumor; sin embargo, si se encuentra presente en las células tumorales indiferenciadas y fibroblastos que forman el frente invasivo, donde su expresión se ha correlacionado con un incremento en la diseminación metastásica y la agresividad tumoral en diversas neoplasias, como la de útero¹¹⁷, vejiga¹¹⁸, colon¹¹⁹, pulmón^{120,121}, endometrio¹²², próstata¹²³ y páncreas¹²⁴, entre otras. También se encuentran células positivas para ZEB1 en el estroma de tumores como el de colon, mama, pulmón y vejiga^{108,118,121}.

En cuanto a la regulación de ZEB1, existen múltiples vías de señalización implicadas, como por ejemplo Wnt¹²⁵, NF-κB¹²⁶, TGFβ¹²⁷, COX-2¹²⁰ y HIF¹²⁸. En cuanto a sus efectos celulares, ZEB1 se ha implicado además de en la TEM, en la proliferación, senescencia, apoptosis y *stemness* de las células que lo expresan. Estas

propiedades funcionales lo convierten en un factor implicado en la resistencia a la quimio y radioterapia^{99,103,124,129-131}.

4.1. ZEB1 en el ACDP

ZEB1 se expresa en el tejido tumoral del ACDP pero no en el páncreas normal. Concretamente, muestra una expresión intensa en el estroma tumoral, especialmente en los fibroblastos^{132,133}, y en menor proporción en las células neoplásicas del frente tumoral^{134,135}. Su expresión tanto en el estroma como en las células tumorales se correlaciona con un peor pronóstico y recurrencia más temprana en pacientes con cáncer de páncreas^{130,134}.

Estudios *in vitro* demuestran que la expresión de ZEB1 en células de cáncer de páncreas promueve la adquisición de características que favorecen la progresión tumoral. Una de estas características asociadas a la expresión de ZEB1 es la quimioresistencia; las células tumorales pancreáticas con elevada expresión de este factor de transcripción muestran elevada quimioresistencia a gemcitabina, 5-Fluorouracilo (5-FU) y cisplatino, mientras que el silenciamiento de ZEB1 las hace vulnerables al tratamiento¹³⁰. Es destacable el hecho de que las células con expresión de ZEB1 que sobreviven al tratamiento quimioterápico experimentan TEM e incrementan su capacidad migratoria e invasiva¹²⁹. ZEB1 también se ha implicado en la generación de células madre del cáncer pancreáticas; en tumores pancreáticos murinos desarrollados en ratones KPC (*LSL-K-Ras*^{G12D}; *p53*^{R172H/+}; *Pdx1-Cre*), Zeb1 se ha identificado en las células madre distribuidas en el estroma y en órganos distantes¹²⁴. En tumores murinos ortotópicos de páncreas se han identificado células madre del cáncer en el frente tumoral, las cuales se reconocen por la co-expresión de β -catenina y Zeb1. Es remarcable que, en este modelo murino, la eliminación selectiva de esta población celular impide el desarrollo de metástasis¹²⁴.

A pesar del demostrado efecto protumoral de ZEB1 cuando se expresa en células neoplásicas pancreáticas, su eliminación selectiva en este compartimento celular no consigue detener el desarrollo tumoral, como demuestran Krebs et al. En este estudio se utiliza un modelo murino de ratones KPC con delección homocigota en *Zeb1* condicionada a las células precursoras del páncreas mediante el alelo *Pdx1-Cre*, de manera que se consigue eliminar por completo la expresión de *Zeb1* exclusivamente

en las células tumorales. El resultado es la formación de tumores con un mayor grado de diferenciación y una menor capacidad de desarrollar metástasis respecto a los ratones con expresión salvaje de *Zeb1*. Sin embargo, la eliminación de *Zeb1* no tuvo ningún efecto en el crecimiento del tumor ni en la supervivencia¹³⁶. Los resultados descritos en este trabajo hacen plantear la posibilidad de que la expresión de *Zeb1* en otras células no epiteliales que conforman el tumor puedan tener una participación relevante en el desarrollo neoplásico. Entre los posibles candidatos celulares destacan los fibroblastos asociados al tumor, lo cuales presentan una elevada expresión de *Zeb1*^{132,133}. De hecho, un estudio realizado en tejido pancreático de pacientes de cáncer de páncreas describe la expresión de ZEB1 mayoritariamente en el estroma y correlaciona un alto grado de expresión con un peor pronóstico de la enfermedad¹³². Estas evidencias ponen de manifiesto la necesidad de estudiar cual es la participación de ZEB1 en las células no neoplásicas del microentorno tumoral.

5. El oncogén *KRAS*

Las proteínas RAS forman parte de la superfamilia de pequeñas GTPasas, las cuales regulan redes de señalización celular participando en el control de funciones fundamentales de la célula, como son la proliferación, diferenciación, metabolismo y supervivencia. Existen 4 tipos de proteínas RAS (*KRAS4A*, *KRAS4B*, *NRAS* y *HRAS*), las cuales están codificadas por los genes *KRAS*, *NRAS* y *HRAS* respectivamente. Las mutaciones oncogénicas en estos tres genes son las más frecuentes en los cánceres humanos^{137,138}, y concretamente las mutaciones en *KRAS* las más prevalentes en el cáncer de páncreas⁶.

La actividad fisiológica de la enzima RAS es transitoria, lo cual implica que no se encuentra en un estado continuo de activación. RAS se activa cuando se une a una molécula de GTP (*guanosine-5'-triphosphate*)¹³⁹, proceso favorecido por moléculas GEF (*guanine exchange factor*)^{140,141}, y se inactiva hidrolizando GTP en GDP (*guanosine-5'-diphosphate*) mediante su actividad GTPasa intrínseca, que a pesar de ser baja aumenta en asociación con moléculas GAP (*GTPase-activating protein*)¹⁴² (Figura 8A). De esta manera, la señalización fisiológica de RAS ocurre cuando un bajo porcentaje de moléculas está unido a GTP¹⁴³, y su activación e inactivación está condicionada por las necesidades funcionales de la célula.

Sin embargo, las mutaciones activadoras en este oncogén ocasionan un cambio en su conformación que impide la interacción con las moléculas GAP inactivadoras; como consecuencia, se enlentece la cinética de conversión de GTP a GDP, generando un estado permanente de activación en forma de RAS-GTP. Además, el cambio de conformación de la proteína mutada mantiene intacta la eficiencia de unión de moléculas GEFs activadoras¹⁴⁴ (Figura 8B). Como resultado de estos eventos se genera una actividad elevada y mantenida de RAS, que pone en marcha vías de señalización que retroalimentan su actividad. Ello condiciona un estado de hiperactivación de RAS¹⁴⁵ necesario para promover la transformación oncogénica en la célula.

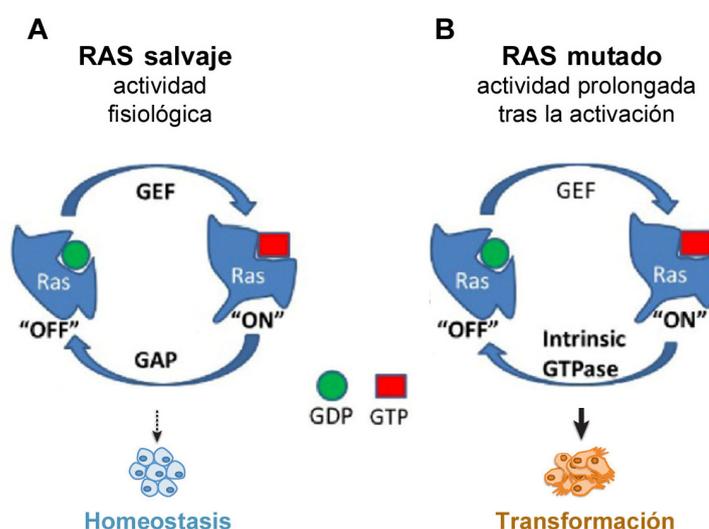


Figura 8. Diagrama de activación de RAS.

(A) Una molécula de RAS salvaje alterna de manera cíclica entre estado inactivo mediante su unión a una molécula de GDP, y estado activo mediante la unión a una molécula de GTP. Esta actividad cíclica participa en las funciones fisiológicas celulares. **(B)** Las moléculas de RAS mutado sufren un cambio de conformación que impide su interacción con las moléculas GAP y que conlleva un estado mantenido de activación mediante unión a GTP. Imagen adaptada¹⁴⁴.

5.1. KRAS en el cáncer de páncreas.

Las mutaciones activadoras en el oncogén *KRAS* son las de aparición más temprana y las más prevalentes en el cáncer de páncreas^{6,26,27}. Las más frecuentes ocurren en el codón G12 (G12D y G12V), aunque también se han observado otras menos comunes en los codones G13 y Q61^{6,146-148}. Todas estas mutaciones no son

equivalentes, sino que provocan distintos patrones de señalización, con consecuencias biológicas diferentes^{149,150}. La coexistencia en un mismo tumor de clonas con diferentes mutaciones en *KRAS* pone de manifiesto la complejidad de la expresión de *KRAS* en el ACDP³⁰.

El desarrollo tumoral en el páncreas está condicionado por el nivel de actividad de *KRAS*, que depende del número de moléculas activas. Una prueba de ello es la frecuente presencia de mutaciones oncogénicas en *KRAS* en el páncreas u otros órganos de individuos de edad avanzada y en el páncreas de individuos con pancreatitis crónica, sin que ello se correlacione con la existencia de tumores^{151–154}. Estas evidencias demuestran que la mutación en *KRAS* por sí sola no tiene grandes efectos sobre la actividad endógena basal de la oncoproteína, de manera que no consigue elevar y mantener su nivel de actividad lo suficiente como para llegar a la hiperactivación mantenida necesaria para mediar un efecto oncogénico. El oncogén *KRAS* tiene la capacidad de magnificar y prolongar la respuesta a determinados estímulos activadores (por ejemplo EGF, NF- κ B, COX-2, entre otros) promoviendo la transformación oncogénica^{14,155,156}. Estos hechos demuestran que *KRAS* mutado no se encuentra constitutivamente activo, sino que requiere de estímulos activadores específicos que le condicionen una hiperactivación a niveles oncogénicos.

La función de *KRAS* en las células pancreáticas depende de su actividad total. A niveles constitutivos, la actividad de *KRAS* actúa en la señalización fisiológica celular, regulando la síntesis proteica, la proliferación, la diferenciación y la homeostasis celular^{144,157}. Una actividad ligeramente superior, provocada por mutaciones en *KRAS* o por alteraciones en las moléculas reguladoras (GEFs y GAPs), estimula el crecimiento y la hiperplasia de las células pancreáticas¹⁵⁸; este incremento en la actividad está también relacionado con la activación de la metaplasia acino-ductal³⁴. En presencia de *KRAS* mutado, condiciones patológicas como la inflamación generan una hiperactivación de la oncoproteína, que puede derivar en senescencia o muerte celular, o facilitar la transformación neoplásica de la célula^{32–34,37,159}.

La señalización oncogénica de *KRAS* forma parte de una red molecular compleja y dinámica que regula una gran cantidad de efectores, como RAF/MEK/ERK, PI3K/PDK1/AKT, RalGDS/p38MAPK, Rac y Rho, Rassf1, NF1 y p120GAP, entre otros^{145,160}. En el ACDP, *KRAS* actúa a través de tres principales vías de señalización, que son RAF/MEK/ERK, PI3K/PDK1/AKT, RalGDS/p38MAPK^{21,148,161–164}. Todas ellas

tienen una participación esencial en el proceso oncogénico desde la generación de la MAD hasta las etapas finales del desarrollo del ACDP.

La evidencia de que la señalización continuada de KRAS es esencial para el inicio, progresión y mantenimiento del ACDP se conoce como “adicción a Kras”. Este concepto se ha demostrado en modelos murinos con Kras inducible en el páncreas mediante el tratamiento con doxiciclina, el cual ofrece la posibilidad de activar e inactivar la expresión de Kras en el momento que se desee. Estos estudios muestran que la inactivación de Kras en lesiones PanIN de bajo grado resulta en la rediferenciación de los ductos displásicos hacia un fenotipo acinar y en un incremento de la apoptosis de las células que conforman las lesiones PanINs^{21,35}. La inactivación de Kras inducida en estadios más avanzados de la enfermedad (PanINs de alto grado o cáncer invasivo) provoca la muerte celular masiva por apoptosis y la regresión del tumor^{35,165}. Sin embargo, otras evidencias demuestran que Kras puede ser prescindible para continuar el desarrollo tumoral^{166,167}. En este sentido se ha observado que, tras la inactivación de Kras en estadios avanzados de la enfermedad, una fracción de células sobrevive a la inactivación y entra en estado de latencia provocando la recaída del tumor¹⁶⁶ (Figura 9). Estas evidencias alertan de la complejidad del cáncer de páncreas, el cual cuenta con mecanismos capaces de sortear la actividad crítica de Kras en el desarrollo oncogénico.

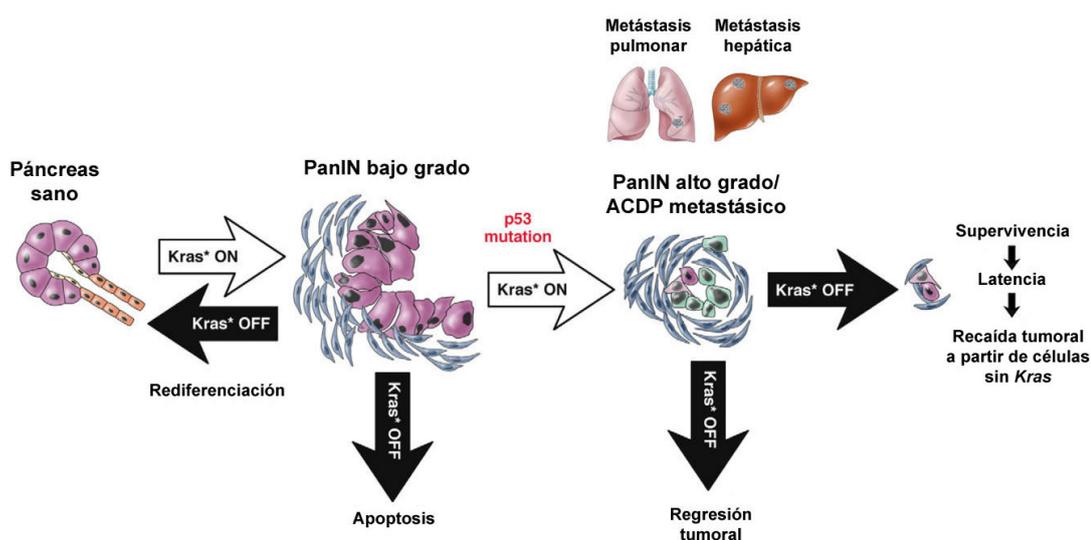


Figura 9. Modelo de la participación del oncogén *Kras* en el desarrollo del ACDP basado en tumores KPC.

La activación oncogénica de Kras en el páncreas sano promueve la formación de lesiones precursoras. La inactivación inducida de Kras en PanINs de bajo grado ocasiona la

rediferenciación de las células ductales hacia fenotipo acinar, o la muerte por apoptosis. La inactivación de Kras en estadios avanzados de la enfermedad causa la regresión del tumor mediante la activación de la apoptosis en las células tumorales. Sin embargo, una fracción de células tumorales sobrevive a la inactivación de Kras y entra en un estado de latencia capaz de provocar la recaída del tumor. (Kras*: Kras inducible). Imagen adaptada³⁶.

A pesar de las múltiples evidencias que revelan la participación decisiva de KRAS en el ACDP, existen otros argumentos que cuestionan esta dependencia. En este sentido, un estudio reciente demuestra que si bien el oncogén Kras promueve la proliferación de las células neoplásicas del páncreas, su eliminación provoca la diferenciación celular hacia un fenotipo mesenquimal a través de la expresión de genes relacionados con la EMT, lo cual se correlaciona con una mayor capacidad de diseminación¹⁶⁷.

La participación crítica de KRAS en el inicio, progresión y mantenimiento del ACDP pone de manifiesto la necesidad de desarrollar terapias dirigidas a bloquear la señalización de KRAS páncreas^{35,165,166}. Una de estas estrategias estaría basada en la inhibición directa de KRAS mediante el bloqueo de su sitio de unión a GTP. Sin embargo, la gran afinidad de KRAS por GDP y GTP, así como la elevada concentración intracelular de estos nucleótidos, dificulta el diseño de ligandos que compitan de manera eficiente con ellos¹⁶⁸. Otras estrategias terapéuticas serían la inhibición indirecta de la actividad de KRAS, ya sea impidiendo la unión a sus moléculas activadoras¹⁶⁹, la inhibición de la interacción KRAS-GEF¹⁷⁰, el bloqueo de la unión de KRAS a la membrana celular^{171,172}, o la inhibición de sus vías de señalización principales (MAPK y PI3K)¹⁷³. Sin embargo, dada la complejidad de la vía de señalización de KRAS y la existencia de vías alternativas en las células tumorales, todavía no se han conseguido desarrollar terapias anti-KRAS efectivas para el tratamiento del cáncer de páncreas^{174,175}. Otro factor que condiciona la ineffectividad de las terapias anti-KRAS es la existencia de clones de células no adictas a KRAS, las cuales muestran una elevada resistencia a los inhibidores específicos contra esta oncoproteína¹⁶⁷.

5.2. Relación entre KRAS y el microentorno tumoral.

El oncogén *KRAS* proporciona a las células neoplásicas propiedades tumorales mediante la activación de mecanismos autónomos; por otra parte, las células de cáncer con expresión de *KRAS* interactúan a nivel no autónomo con el microentorno celular circundante produciendo cambios funcionales en él. Una prueba de ello es la demostración de que la inactivación inducida de *Kras* en PanINs murinos comporta la remodelación del estroma fibroinflamatorio asociado mediante la pérdida de expresión de α SMA y la reducción del número de fibroblastos. Estas evidencias sugieren que la actividad de *Kras* en el epitelio pancreático condiciona la actividad del estroma circundante^{35,165}.

La relación que hay entre la expresión de *KRAS* en el compartimento epitelial neoplásico y el estroma se establece en parte a través de la comunicación paracrina, basada en la secreción celular de mediadores solubles al espacio intercelular. Algunos de estos factores solubles, como proteínas de la familia SHH, la IL-6 y la prostaglandina E¹⁷⁶, son sintetizados en las células neoplásicas de manera *KRAS*-dependiente y secretados al espacio intercelular para ejercer su efecto fisiológico en las células del entorno³⁵ (Figura 10).

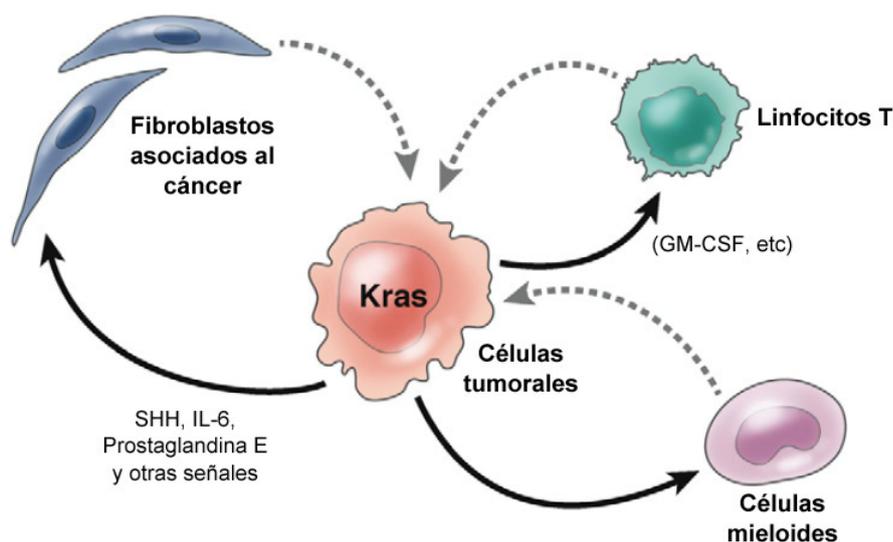


Figura 10. Interacción mediada por *Kras* entre las células tumorales y células del estroma circundante.

Las células tumorales portadoras del oncogén *Kras* secretan moléculas solubles que actúan de forma paracrina sobre las células del estroma circundante, como son los fibroblastos y las células del sistema inmune (flechas negras). A su vez, las células del microentorno establecen

una comunicación inversa con las células tumorales (flechas discontinuas). (GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Imagen adaptada³⁶.

Diversos estudios demuestran el papel de *Kras* como regulador paracrino del microentorno inflamatorio del ACDP. En modelos murinos de cáncer de páncreas se ha detectado alrededor de los PanINs infiltración de células inflamatorias, concretamente de aquellas que tienen un papel supresor de la respuesta inmune como linfocitos T supresores y células supresoras de origen mieloide¹⁷⁷. La secreción de citoquinas por parte de las células tumorales con mutación oncogénica de *Kras* promueve la infiltración de estas células, y como consecuencia se produce la inhibición de la respuesta inmunológica anti-tumoral^{178,179} (Figura 10).

Especialmente interesante es el hecho de que una parte de los genes inducidos *in vitro* en las células tumorales a través de las señales secretadas por el estroma se solapan con genes activados por la mutación oncogénica de *Kras*^{G12D} *in vivo*¹⁶⁵. Estas observaciones son consistentes con los estudios que demuestran que la reacción fibroinflamatoria del estroma coopera con las mutaciones oncogénicas de *Kras* en las células tumorales para promover la progresión del cáncer de páncreas¹⁵. Por otro lado, existe una reciprocidad en la señalización entre CEPs activadas y células tumorales con mutación oncogénica de *Kras*. Esta reciprocidad implica que las CEPs que han sido activadas de forma paracrina por células tumorales *Kras*^{G12D} tienen un perfil de activación concreto, y establecen una señalización no autónoma específica que tiene como consecuencia la activación de *Kras* en las células tumorales únicamente a través de la vía de Akt¹⁸⁰.

5.3. Relación entre KRAS y ZEB1.

ZEB1 se encuentra dentro del grupo de genes que generan dependencia a KRAS, y ambos cooperan en la transformación maligna, inducción de EMT y metástasis del cáncer^{181,182}.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que *Zeb1* es un gen diana en la vía de activación de Ras^{183,184}. Este eje de señalización se ha demostrado en células tumorales. En este sentido se ha demostrado que la eliminación monoalélica de *Zeb1* en ratones es suficiente para prevenir la progresión de adenoma a adenocarcinoma en

un modelo de cáncer de pulmón generado por la mutación oncogénica de *Kras*¹⁸⁵. Sin embargo existe escasa evidencia sobre la función de ZEB1 en los fibroblastos y su relación con KRAS. Sí se sabe que los MEFs con mutación activadora de *Ras* precisan expresar Zeb1 para mantener su viabilidad, fenotipo de miofibroablasto y tumorigenicidad^{186,187}.

El mecanismo por el cual KRAS induce la expresión de ZEB1 todavía no se conoce. Dado que la expresión de ZEB1 es dependiente de factores de crecimiento inducidos por KRAS (como TGF β o EGF, entre otros), se plantea la posibilidad de que KRAS en las células tumorales pueda de forma paracrina a través de la secreción de factores de crecimiento inducir la expresión de ZEB1 en células adyacentes. No obstante, no existe hasta la fecha estudios en cáncer de páncreas que hayan investigado la cooperación heterotípica entre ZEB1 en los fibroblastos y *KRAS* en las células tumorales.

6. Modelos para el estudio del ACDP

El conocimiento que se tiene actualmente de la biología del cáncer de páncreas ha sido posible en gran parte gracias al desarrollo de modelos murinos y de modelos *in vitro*, que permiten mimetizar las características genéticas, celulares e histopatológicas de la enfermedad.

Los modelos murinos son una herramienta de gran utilidad para el estudio de la oncogénesis pancreática, así como de factores que participan en ella, como la inflamación y el microentorno tumoral; también han mostrado un gran beneficio en el estudio y desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas y diagnósticas. Entre los más comúnmente utilizados encontramos los modelos murinos modificados genéticamente (GEMMs) y los modelos tumorales generados mediante el trasplante de células.

Los GEMMs son aquellos ratones cuyo genoma ha sido alterado mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, permitiendo controlar la ganancia o pérdida de función de uno o varios genes. Desde que se llevaron a cabo las primeras aproximaciones para generar GEMMs de cáncer de páncreas, se han desarrollado una gran cantidad y variedad de modelos en función del objetivo del estudio; sin

embargo, no fue hasta 2003 cuando se estableció el que más fielmente reproducía las características histopatológicas del ACDP humano⁴⁹. Este modelo contiene un alelo de *Kras* mutado (*Kras*^{G12D/+}), silenciado mediante una secuencia STOP floxeada (Lox-Stop-Lox o LSL) insertada entre el promotor y el exón 1 de *Kras*. Además, expresa la enzima Cre recombinasa bajo el control de promotores de genes expresados en células precursoras del páncreas, como *Pdx1* o *Ptf1a/P48*. De esta manera, Cre reconoce y corta las secuencias Lox, eliminando la construcción LSL y permitiendo la expresión del alelo mutado de *Kras* en el compartimento epitelial del páncreas. Como resultado, se obtienen ratones con los genotipos *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D} o *Ptf1a/P48-Cre;LSL-Kras*^{G12D} (comúnmente conocidos como KC), que desarrollan todo el espectro de lesiones precursoras en el páncreas (MAD y PanINs de bajo grado) de una forma histológicamente muy similar a las lesiones presentes en humanos. De esta manera, refleja el tipo más común de progresión de ACDP, en el que las mutaciones activadoras en *Kras* (presentes en más del 90% de ACDP humanos) inducen el inicio de la carcinogénesis mediante el desarrollo de lesiones PanIN de bajo grado^{188,189}. Los ratones KC se consideran un modelo de lesiones precursoras, ya que la presencia de ACDP se observa solamente en un pequeño porcentaje de ratones de edad avanzada.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la progresión de PanINs a ACDP requiere, además de la presencia del oncogén *KRAS*, la adquisición de alteraciones genéticas en p16/CDKN2A, p53 y SMAD4, entre otros genes^{6,31-34}. Por esta razón, para generar GEMMs en los que las lesiones precursoras progresen hasta ACDP es necesario añadir al modelo de *Kras* ya establecido mutaciones condicionadas al páncreas en genes como *p16*^{Ink4a}/*p19*^{Arf}, *p53* o *Tgfbr2*^{32,33,37,190}. Como resultado, los ratones desarrollan ACDP invasivo con propiedades características asociadas a su genotipo, por lo que permiten determinar las características y mecanismos moleculares a través de los cuales se desarrollan los distintos subtipos de ACDP y la respuesta a diferentes estrategias terapéuticas¹⁹¹.

Un abordaje alternativo a la adición de mutaciones en combinación con *Kras* mutado para la generación de ACDP es el uso de estímulos como la ceruleina. La ceruleina es un oligopéptido análogo de la colecistoquinina que estimula la secreción de enzimas pancreáticas, produciendo como consecuencia una respuesta inflamatoria en el páncreas. El tratamiento con ceruleina se utiliza comúnmente para generar modelos murinos de pancreatitis aguda o crónica; sin embargo, en respuesta al tratamiento con ceruleina los ratones con expresión de *Kras* oncogénico en el compartimento acinar desarrollan PanINs y ACDP con alta penetrancia (Figura 11).

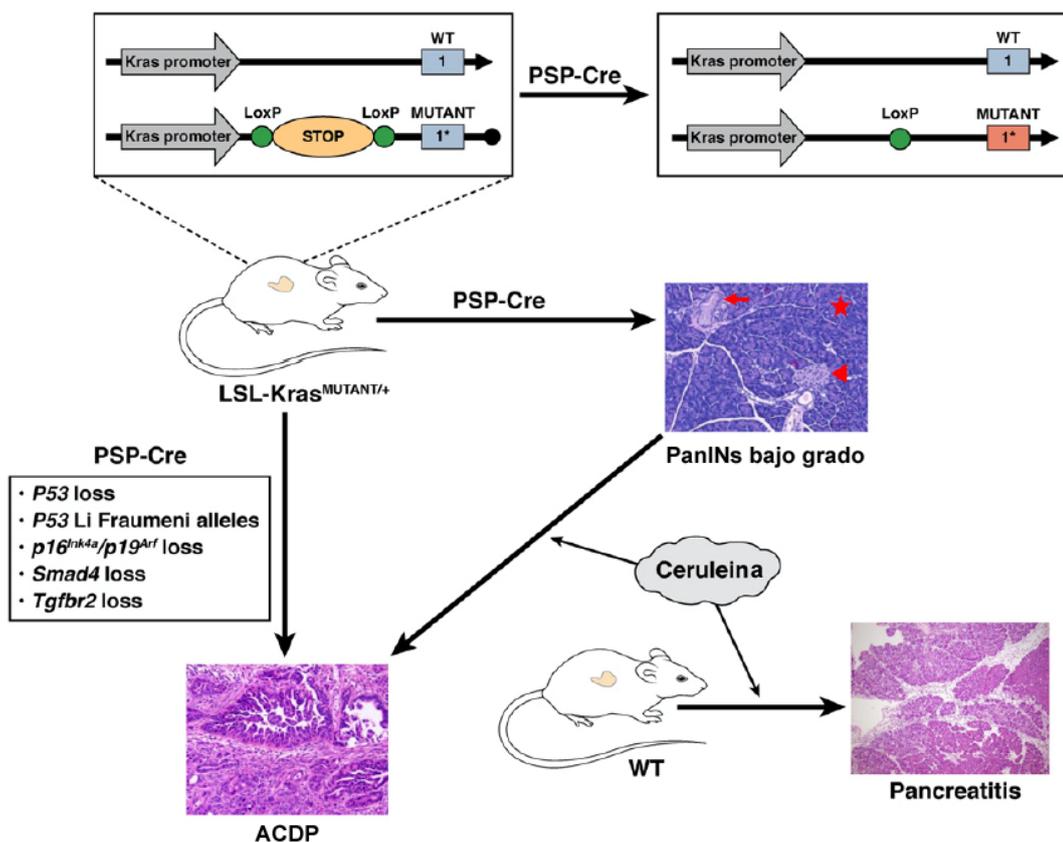


Figura 11. Técnicas para la generación de GEMMs de lesiones precursoras y de ACDP.

La expresión de Cre recombinasa regulada por un promotor específico del páncreas (*pancreas-specific promoter*, PSP) genera la activación condicional de alelos mutantes endógenos de *Kras* en el compartimento epitelial pancreático, induciendo como consecuencia el desarrollo de PanINs de bajo grado. Las lesiones PanIN pueden progresar hasta ACDP tras la pérdida adicional de alelos en genes supresores de tumores como *p16^{Ink4a}/p19^{Arf}*, *p53*, *Smad4* o *Tgfr2*. Eventos no-genéticos como la inducción de pancreatitis con ceruleina cooperan con *Kras* mutado, promoviendo la progresión de PanINs a ACDP. Imagen adaptada¹⁹².

La importancia del estroma tumoral del páncreas en la progresión tumoral ha hecho necesaria la generación de modelos murinos que permitan estudiar la contribución del estroma en la oncogénesis pancreática. Una aproximación es la manipulación genética dirigida a elementos del estroma. Este es el caso de los ratones α SMA-tk que, tras el tratamiento con ganciclovir, eliminan selectivamente los miofibroblastos α SMA⁺ (población predominante del estroma tumoral pancreático)^{93,193}. Otra opción es el silenciamiento de vías de señalización que impulsan la formación y desarrollo del estroma desmoplásico rico en fibroblastos⁹⁴.

A pesar del gran valor y utilidad de los GEMMs de cáncer de páncreas, el tiempo, la dificultad y el coste económico asociados a su generación supone un inconveniente en su uso como herramienta de estudio. Una alternativa a los GEMMs son los modelos murinos generados mediante el trasplante de células neoplásicas en el mismo órgano del cual provienen (tumores ortotópicos) o en una zona distinta (tumores heterotópicos). Estos modelos han sido ampliamente utilizados en estudios pre-clínicos de cáncer de páncreas por el bajo coste y rápido crecimiento tumoral que ofrecen^{40,42,53,69,79,87,194}. Además, ofrecen la posibilidad de generar tumores trasplantando células humanas (tumores xenográficos) en ratones inmunodeprimidos, lo cual supone una ventaja a nivel translacional pero también un inconveniente al obviar el importante papel del sistema inmunológico en la formación del tumor. Existe la alternativa de generar tumores singénicos, en los que el ratón receptor tiene la misma información genética que las células murinas transplantadas, y por tanto no existe histoincompatibilidad ni peligro del rechazo inmunológico. Este tipo de modelos basados en el trasplante de células se ha utilizado ampliamente en el estudio del papel del estroma en la oncogénesis pancreática. El procedimiento experimental consiste la co-inyección de CEPs y células neoplásicas, de forma que se consigue mimetizar de manera aproximada las características celulares del cáncer de páncreas^{40,53,69,87,194}, donde el estroma y su interacción intercelular con el compartimento neoplásico son dos elementos esenciales para la progresión tumoral.

Como alternativa al uso de animales de experimentación animal existen herramientas *in vitro* que permiten modelar de forma aproximada las características del cáncer de páncreas. Uno de los mayores avances que se ha conseguido en la generación de modelos *in vitro* ha sido el desarrollo de sistemas de cultivo de organoides. Los organoides son estructuras tridimensionales de células que se organizan entre sí reproduciendo una arquitectura y función similares al del órgano del cual provienen. El primer modelo de organoides pancreáticos se generó en 2013 a partir de células ductales murinas¹⁹⁵. Más tarde se desarrollaron organoides de ACDP utilizando células aisladas tanto de tumores murinos y de sus focos metastáticos, como de tumores o biopsias humanas¹⁹⁶. Análisis transcriptómicos, proteómicos e histológicos de las lesiones desarrolladas tras el trasplante ortotópico de los organoides generados con células tumorales pancreáticas, revelaron que este sistema de cultivo *in vitro* modela con precisión la histopatología y genética del ACDP¹⁹⁶. Por esta razón, el sistema de cultivo de organoides se considera una herramienta valiosa para el estudio de fármacos y el desarrollo de terapias contra el cáncer de páncreas,

así como para el análisis de las alteraciones moleculares asociadas a la malignidad^{196,197} (Figura 12).

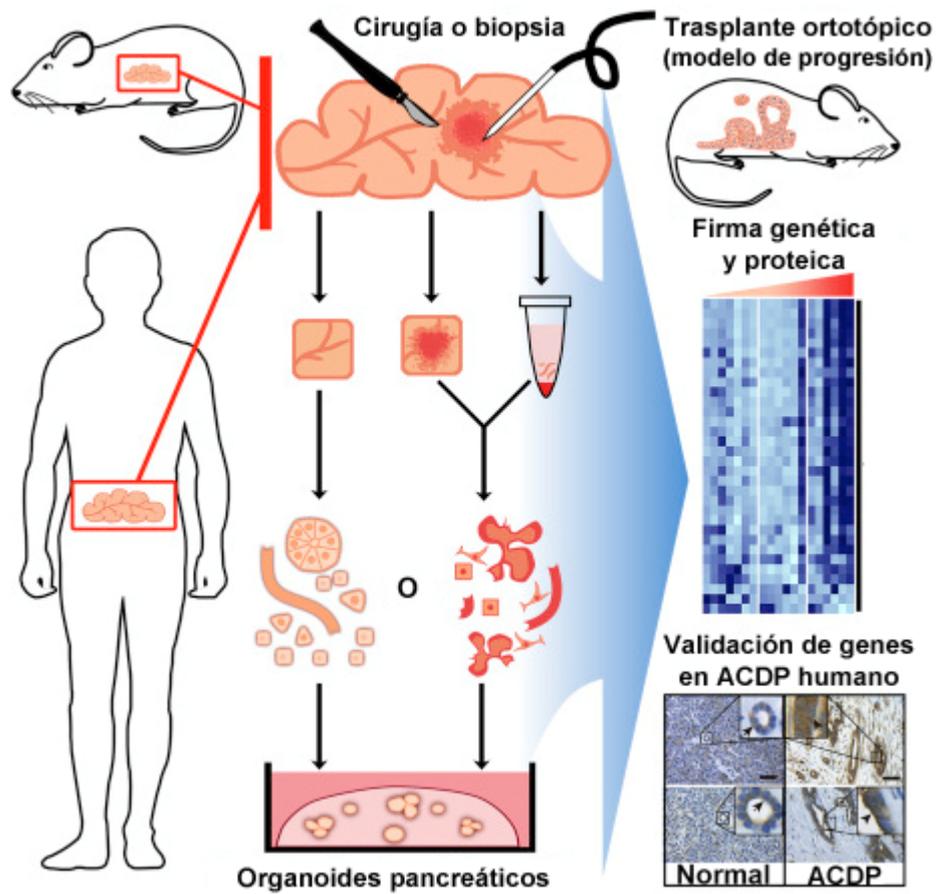


Figura 12. Esquema de la generación y validación de organoides.

Los organoides se pueden establecer a partir de tejido sano o tumoral de procedencia murina o humana. Los organoides procedentes de tumores pancreáticos trasplantados ortotópicamente desarrollan todo el espectro de lesiones y alteraciones genéticas características del ACDP humano. Imagen adaptada¹⁹⁶.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La activación del factor de transcripción Zeb1 por parte de Ras ha mostrado ser un evento necesario para el desarrollo de tumores dependientes de Ras. Por equivalencia, la hipótesis planteada en esta tesis es que el cáncer de páncreas, cuya generación se haya estrechamente vinculada a la actividad oncogénica de *Kras*, precisa la activación del Zeb1 para su desarrollo. Dado que Zeb1 se expresa mayoritariamente en los fibroblastos del estroma tumoral pancreático, este trabajo plantea la existencia de una cooperación heterotípica Ras-Zeb1 mantenida entre las células tumorales portadoras del oncogén *Kras* y las células estrelladas del estroma fibroinflamatorio con expresión de Zeb1.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de Zeb1 en el desarrollo de cáncer de páncreas inducido por el oncogén *Kras* y analizar en las células estrelladas pancreáticas si Zeb1 promueve su activación, fomenta su propiedades protumorales y media el control no autónomo de la señalización de Ras en células tumorales.

Objetivos concretos:

1. Estudiar el resultado de la hemizigosis de *Zeb1* en el desarrollo de cáncer de páncreas inducido por oncogén *Kras* en ratones.
2. Investigar en cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas murinas si la expresión de Zeb1 promueve su fenotipo de activación y media la cooperación paracrina con las células tumorales, induciendo en ellas la migración, invasión, resistencia a la apoptosis y activación de Ras.
3. Analizar en células estrelladas pancreáticas el perfil transcripcional regulado por Zeb1.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos murinos de experimentación

Tanto la estabulación como los procedimientos realizados con los animales de experimentación utilizados para realizar esta tesis fueron aprobados por el Comité ético de experimentación animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona.

1.1. Modelo murino con mutación heterocigota de *Zeb1* (*Zeb1*^{+/-})

Los ratones con mutación heterocigota de *Zeb1* fueron desarrollados por Takagi et al. mediante mutagénesis dirigida, como se especifica a continuación⁹⁸. A partir de un fragmento de ADN del exon 1 del gen, se construyó un vector que contenía un gen de resistencia a la neomicina. Este vector se transfectó por electroporación en células madre embrionarias, que posteriormente se seleccionaron con geneticina (G418). Los ratones quiméricos se produjeron por inyección en el blastocisto de las células madre embrionarias transformadas. Finalmente, los ratones híbridos se cruzaron con ratones C57/Bl6 durante cinco generaciones, con la finalidad de introducir la mutación heterocigota de *Zeb1* en ratones con el fondo genético de la cepa C57/Bl6.

El Dr. Antonio Postigo nos proporcionó los ratones *Zeb1*^{+/-}.

1.2. Modelo murino de cáncer de páncreas

Los modelos murinos *LSL-Kras*^{G12D};*p53*^{R172H/+};*Pdx1-Cre* (KPC) de cáncer de páncreas se generaron en nuestro laboratorio mediante el cruce de ratones *LSL-Kras*^{G12D}, *p53*^{R172H/+} (ambos proporcionados por el Dr. J. Tylers, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, US) y *Pdx1-Cre* (proporcionados por el Dr. Tuveson, University of Cincinnati, Ohio, US), siguiendo el modelo establecido por Hingorani et al.³³ indicado en la Figura 13. Estos ratones son portadores de mutaciones heterocigotas en *Kras*^{G12D} y *p53*^{R172H} condicionadas a las células progenitoras del páncreas a través del alelo *Pdx1-Cre*. Los ratones KPC tienen los dos alelos de *Zeb1* intactos y por tanto una expresión salvaje de la proteína, por lo que también nos referiremos a ellos como KPC;*Z*^{+/+}. Estos ratones se sacrificaron a las 16 y 20

semanas de vida. Ratones $Zeb1^{+/-}$ se cruzaron con ratones KPC para introducirles la delección heterocigota y conseguir ratones $KPC;Z^{+/-}$ (Figura 14). Este grupo se sacrificó a las 20 y 30 semanas de vida. Tras el sacrificio de los animales de ambos grupos, se resecaron los páncreas para el posterior análisis histológico.

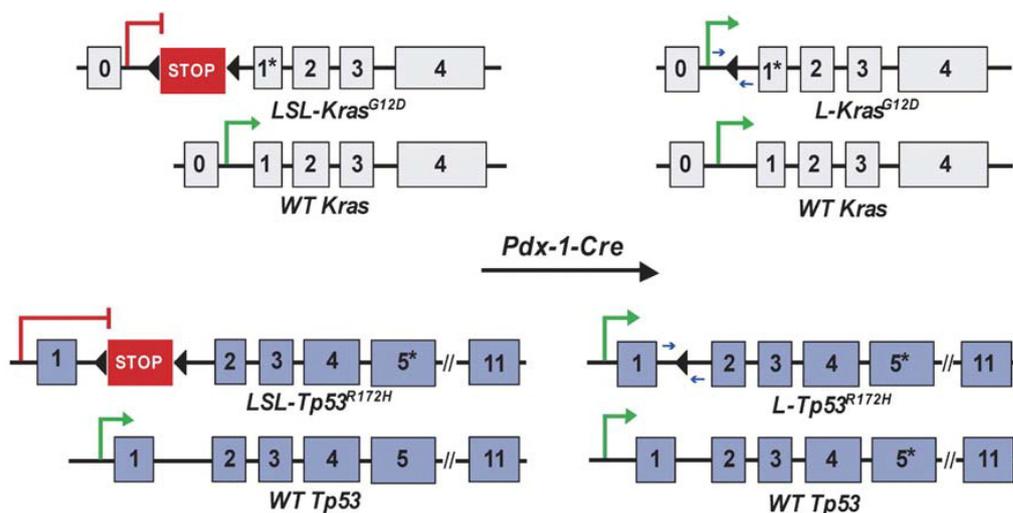


Figura 13. Generación de alelos mutantes de $Kras^{G12D}$ y $p53^{R172H}$.

Esquema de la construcción genética de los alelos mutantes de $Kras^{G12D}$ y $p53^{R172H}$ condicionados al páncreas mediante la recombinación con el alelo $Pdx1-Cre$. Las flechas indican la posición de los cebadores usados para detectar los alelos mutados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Imagen original³³.

1.3. Modelo murino de lesiones precursoras

Para el estudio de la formación de lesiones MAD precursoras del cáncer en el páncreas, se cruzaron ratones que contenían la mutación en $Kras^{G12D}$ con ratones $Pdx1-Cre$, obteniendo ratones $LSL-Kras^{G12D};Pdx1-Cre$ (KC) (Figura 14). Al no tener $p53$ mutado, estos animales generan lesiones en el páncreas de forma mucho más lenta que los KPC. Los animales se sacrificaron entre las 8 y 10 semanas de vida, e inmediatamente después del sacrificio se aislaron las células acinares.

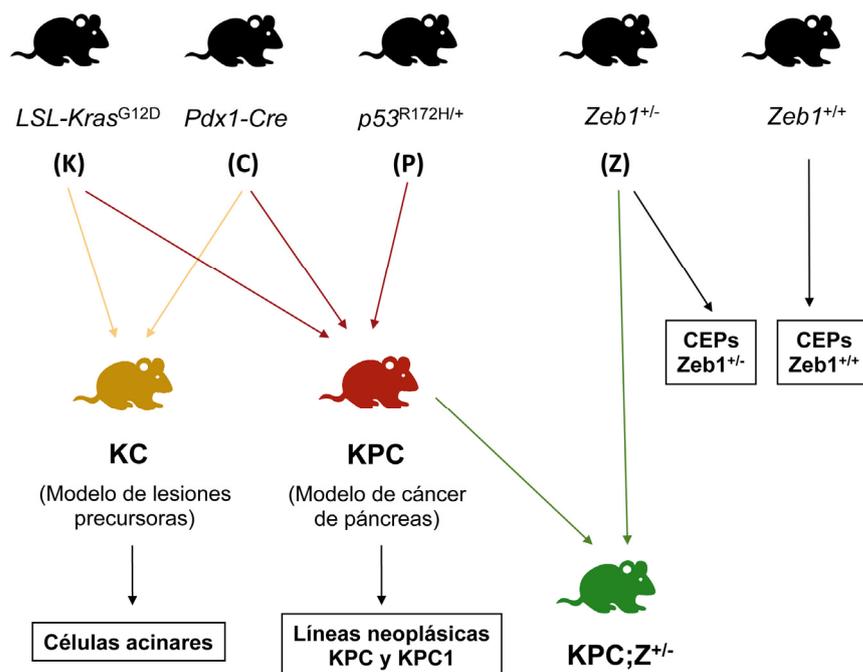


Figura 14. Esquema de cruces para la generación de los modelos murinos y líneas celulares primarias utilizadas en este estudio.

Cruces realizados para obtener modelos murinos con las mutaciones necesarias para nuestro estudio, y modelos a partir de los cuales se aislaron las líneas celulares primarias (métodos especificados en los apartados 2.1, 2.2 y 2.3) utilizadas para estudios *in vitro*.

2. Cultivos celulares

2.1. Aislamiento de células estrelladas del páncreas (CEPs)

Soluciones y medios de cultivo necesarios:

A. Solución de digestión:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Pronasa	0,05%	Roche
DNAsa I	0,025%	Roche
Colagenasa P	0,025%	Roche
Inhibidor de tripsina	0,01%	Sigma
HEPES	10 mM	Gibco

Tabla 1: componentes y concentraciones de la solución de digestión

B. Solución de lavado:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
BSA	0,3%	Sigma
HBSS	-	Sigma

Tabla 2: componentes y concentraciones de la solución de lavado.

(BSA: albúmina de suero bovino; HBSS: solución salina equilibrada de Hanks)

C. Solución de gradiente:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Optiprep 60%	28,23%	Sigma
HBSS	-	Sigma

Tabla 3: componentes y concentraciones de la solución de gradiente**D. Medio de cultivo completo:**

Reactivo	Concentración	Casa comercial
DMEM-F/12 GlutaMAX™	-	Gibco
SBF	15%	Gibco
Estreptomicina	100 U/ml	Gibco
Penicilina	100 U/ml	Gibco
HEPES	15 mM	Gibco

Tabla 4: componentes y concentraciones del medio de cultivo de las células estrelladas.

(SBF: suero bovino fetal)

Las células estrelladas del páncreas (CEPs) se aislaron a partir de ratones de la cepa C57/Bl6 de 10 a 16 semanas de edad, con expresión completa de Zeb1 (Zeb1^{+/+}) o con inactivación monoalélica de Zeb1 (Zeb1^{+/-}) (Figura 14). El método consiste en la separación por gradiente de densidad de una población homogénea de CEPs en estado quiescente.

Los ratones se sacrificaron por dislocación, se reseco el páncreas y se lavó en solución salina a 4 °C. Con una aguja se inyectó solución de digestión (A) en el interior del páncreas para asegurar una buena digestión de todo el tejido. Tras introducir el

páncreas en 10 ml de solución de digestión y trocearlo con tijeras en fragmentos de pequeño tamaño, se incubó durante 12 minutos en un baño a 37 °C con agitación. Para terminar de disgregar el tejido, se añadió a la solución 125 µl de DNAsa y se pasó el tejido digerido a través de una pipeta de cultivo estéril de 2 ml, para luego filtrarlo a través de un filtro de 100 µm (BD Falcon). Se centrifugó la solución resultante a 300 g durante 2 min a temperatura ambiente y tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en 10 ml de solución de lavado (B) y 120 µl de DNAsa. Tras centrifugar las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en HBSS y se mezcló en solución de gradiente (C) hasta una concentración final de Optiprep de 12%. A continuación, se añadieron 3 ml de HBSS sobre la solución que contenía las células y se centrifugó el gradiente resultante durante 12 min a 1400 g, 21 °C y sin freno. Una vez finalizada la separación por gradiente, las CEPs se encuentran en la interfase debido a la menor densidad que les proporcionan las gotas lipídicas perinucleares de vitamina A. Por tanto, se descartó el precipitado celular, se recogieron las CEPs que se sitúan formando un anillo y se traspasaron a un tubo con 5 ml de medio completo (D) para centrifugarlas a 300 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio completo y se mantuvieron en cultivo a 37 °C (5% CO₂) y atmósfera húmeda.

A las 24 horas del aislamiento se observaban células de pequeño tamaño y forma redondeada distribuidas por el frasco de cultivo. Al cabo de una semana, las células proliferaron y adquirieron morfología de fibroblasto. Cuando alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente, se tripsinizaron y amplificaron. Para asegurar la correcta activación y pureza de las CEPs se comprobó la expresión de αSMA (marcador miofibroblástico) y la ausencia de F4/80 (marcador de macrófagos).

2.2. Aislamiento de acinos

A. Solución de digestión:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Colagenasa P	1,33 mg/ml	Roche
HBSS	-	Sigma

Tabla 5: componentes y concentraciones de la solución de digestión.

B. Solución de lavado 1:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
SBF	5%	Sigma
HBSS	-	Sigma

Tabla 6: componentes y concentraciones de la solución de lavado 1.**C. Solución de lavado 2:**

Reactivo	Concentración	Casa comercial
SBF	30%	Sigma
HBSS	-	Sigma

Tabla 7: componentes y concentraciones de la solución de lavado 2.**D. Medio de cultivo completo:**

Reactivo	Concentración	Casa comercial
RPMI 1640	-	Gibco
SBF	10%	Gibco
Estreptomicina	100 U/ml	Gibco
Penicilina	100 U/ml	Gibco
Piruvato de sodio	1 mM	Gibco
Inhibidor de tripsina	0,1 mg/ml	Sigma

Tabla 8: componentes y concentraciones del medio de cultivo de acinos.

Los acinos se aislaron a partir de ratones C57/Bl6 de 4 a 8 semanas de edad con mutación oncogénica en *Kras* condicionada al páncreas (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}*) (Figura 14).

Tras sacrificar los ratones por dislocación, se inyectaron 2,5 ml de solución de digestión (A) en el páncreas antes de resecarlo. Luego se introdujo en un tubo con 5 ml más de solución de digestión, se disgregó con unas tijeras y se incubó en un baño con agitación a 37 °C durante 20 min, tiempo durante el cual la colagenasa P actúa digiriendo el tejido. Tras parar la digestión añadiendo 10 ml de solución de lavado 1 (B) (el SBF inactiva la colagenasa), se centrifugó 1 min a 950 rpm y se descartó el sobrenadante. Se repitió este paso dos veces más. Tras el último lavado, se

descartaron los fragmentos de páncreas grandes no digeridos filtrando la suspensión primero con una gasa y finalmente con un filtro de 100 μm (BD Falcon). A continuación, se depositó la suspensión celular resultante en la superficie de 20 ml de solución de lavado 2 (C), inclinando ligeramente el tubo donde ésta se encuentra y creando dos fases. Tras una centrifuga de 2 min a 950 rpm, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado de acinos con medio de cultivo completo (D), y se sembró en placas Petri.

2.3. Aislamiento de células neoplásicas pancreáticas obtenidas de tumores KPC; $Z^{+/+}$

Se aislaron y establecieron dos líneas celulares tumorales, KPC y KPC1, usando dos técnicas de aislamiento diferentes. Ambas se obtuvieron de tumores desarrollados espontáneamente por ratones KPC; $Z^{+/+}$ a las 20 semanas de vida (Figura 14).

El cultivo de estas líneas se realizó en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de SBF, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina, a 37 °C (5% CO_2) y atmósfera húmeda.

2.3.1. KPC: Cancer Cell Isolation Kit (Panomics)

El aislamiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit proporciona una combinación de soluciones de digestión y purificación optimizada para aislar de manera satisfactoria células tumorales, sin incluir otros tipos celulares presentes en la masa tumoral, como linfocitos, fibroblastos o células intersticiales.

a) Pretratamiento del tejido tumoral.

Tras resecar el tumor se depositó en una placa Petri con medio de cultivo RPMI-1640 sin SBF. Con un bisturí se troceó el tejido en trozos pequeños, se transfirió el medio con el tejido troceado a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm durante 6 min a temperatura ambiente. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en 10ml de la solución de digestión y se incubó durante 3 horas a 37 °C en agitación. A continuación, se añadieron 10 ml de solución de suspensión (proporcionada en el kit) y se mezcló bien con el tejido digerido utilizando pipetas de

diferente volumen. La suspensión resultante se pasó por un filtro de 100 μm y el material filtrado se centrifugó a 1200 rpm durante 8 min. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió de nuevo el precipitado celular en 20 ml de solución de suspensión, de manera que se obtuvo una mezcla celular homogénea.

b) Aislamiento y enriquecimiento de las células tumorales.

Se añadieron 20 ml de solución de purificación (proporcionada por el kit) en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm durante 2 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, sobre ésta se añadieron cuidadosamente los 20 ml de suspensión celular, y se dejó el tubo en posición vertical durante 6 min, tiempo durante el cual las células tumorales se depositaron en el fondo del tubo. Se situó la pipeta en el fondo del tubo y se recogieron 6 ml de solución, que contenía las células precipitadas durante la incubación anterior. Tras una centrifuga de 8 min a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF y 1% de penicilina-estreptomicina.

2.3.2. KPC1: outgrowth

Una vez extraído, el tumor se introdujo en un falcon con 5ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF y 1% de penicilina-estreptomicina, y se dejó reposar a 4 °C durante 2 horas. A continuación, se depositó el tejido en una placa petri y se troceó con una hoja de bisturí hasta obtener trozos pequeños. Para disgregar enzimáticamente el tejido se añadió colagenasa (50 U/ml) en una cantidad total de medio correspondiente a 1 ml por cada 20 mg de tejido, y se dejó incubar a 37 °C ON. Al día siguiente, se utilizaron pipetas de distinto volumen para terminar de disgregar el tejido, y se centrifugó la suspensión en un falcon a 300 g durante 5 min. Tras un lavado con PBS (*Phosphate buffered saline*, Gibco) se resuspendió en medio completo el precipitado resultante y se sembró. Pasados 3 días se observaron células y fragmentos de tejido adheridos. Se tripsinizó todo el contenido de la placa, se resuspendió en medio completo, y se pasó por un filtro de 0,22 μm para eliminar los fragmentos de tejido. Por último se sembró la suspensión, que contenía únicamente células neoplásicas.

2.4. Cultivo de células neoplásicas pancreáticas Emyc-3 y Panc02

La línea celular Emyc-3 fue establecida en el laboratorio de la Dra. Cristina Fillat a partir de tumores pancreáticos de ratones Ela-myc. La línea celular Panc02 fue desarrollada por Corbett et al.¹⁹⁸ y proporcionada por la Dra. Meritxell Gironella. Ambas líneas se mantuvieron en cultivo en medio DMEM-F/12 suplementado con un 10% de SBF, 15 mmol/L de HEPES, 100 U /mL de penicilina-estreptomicina, a 37 °C (5% CO₂) y atmósfera húmeda.

3. Genotipado

3.1. Extracción de ADN

El ADN que se utilizó para genotipar los ratones se obtuvo de la cola, cortando por el extremo un fragmento de 2 mm de longitud aproximadamente. La digestión del tejido se realizó con Direct-PCR Lysis (Viagen), al cual se añadió en fresco Proteinasa K (Roche) a una concentración de 0,1 mg/ml con la finalidad de eliminar la contaminación proteica de las muestras. Los tejidos se incubaron a 55 °C *overnight* (ON) en agitación, seguido de una incubación de 45 min a 85 °C en agitación para inactivar la Proteinasa K.

Tras una centrifuga de 5 min a máxima velocidad se recogió el sobrenadante, que contenía el ADN, y se congeló hasta su uso.

3.2. PCR estándar

La PCR estándar permite la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos de ADN mediante la actividad enzimática de la Taq polimerasa. Esta reacción consiste en la incorporación de desoxinucleótidos (dNTPs) a los cebadores que tienen como diana los extremos de la región de ADN que se quiere amplificar.

Para llevar a cabo la PCR se utilizó una solución comercial llamada *GoTaq® Colorless Master Mix* (Promega), que contiene una versión modificada de la Taq polimerasa sin actividad exonucleasa 5' → 3', dNTPs, MgCl₂ (3mM) y los tampones de reacción a la concentración óptima para una amplificación eficiente del ADN. Además de la

GoTaq®, se añadieron los cebadores *forward* i *reverse*, agua libre de nucleasas (NFW) y la muestra de ADN, en las cantidades especificadas en la tabla siguiente:

Reactivo	Volumen /muestra
GoTaq Colorless Master Mix	12,5µl
Cebador <i>Forward</i> (Fw)	1µl
Cebador <i>Reverse</i> (Rv)	1µl
NFW	10,5µl
ADN	1µl

Tabla 9: componentes en la reacción de PCR

A continuación, se indican para cada gen los cebadores *forward* (Fw) y *reverse* (Rv) y las condiciones de reacción específicas (ciclos, temperatura y tiempo) necesarias para una amplificación óptima del ADN.

- **Zeb1**

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')
Pro1 (Rv)	CCA GAG CCC CAG CAC TAT TCT CC
LACZ-B-509 (Fw Mut)	TCA GAC GGC AAA CGA CTG TCC TG
TM1 (Fw WT)	ACC GCA CCT GGT TTA CGA CAC TC

Tabla 10: nombres y secuencias de los cebadores para Zeb1.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94 °C	5 min
Desnaturalización	33	94 °C	30 seg
<i>Annealing</i> del cebador		69 °C	1 min
Extensión		72 °C	30 seg
Extensión final	1	72 °C	2 min
Almacenaje	1	4 °C	∞

Tabla 11: condiciones específicas de PCR para Zeb1.

- *Kras*

Nombre cebador	Secuencia (5'→ 3')
Mut (Rv)	CGC AGA CTG TAG AGC AGC G
MR8274 (Fw Mut)	CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC
WT (Fw WT)	GTC GAC AAG CTC ATG CGG G

Tabla 12: nombres y secuencias de los cebadores para *Kras*.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94 °C	3 min
Desnaturalización	35	94 °C	30 seg
<i>Annealing</i> del cebador		69 °C	1 min
Extensión		72 °C	1 min
Extensión final	1	72 °C	2 min
Almacenaje	1	4 °C	∞

Tabla 13: condiciones específicas de PCR para *Kras*.

- *p53*

Nombre cebador	Secuencia (5'→ 3')
p53R172HuniR (Rv)	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG
p53R172HmutF (Fw Mut)	GCC ACC ATG GCT TGA GTA A
p53R172HwtF (Fw WT)	AGC CTT AGA CAT AAC ACA CGA ACT

Tabla 14: nombres y secuencias de los cebadores para *p53*.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94 °C	3 min
Desnaturalización	35	94 °C	30 seg
<i>Annealing</i> del cebador		64 °C	1 min
Extensión		72 °C	1 min
Extensión final	1	72 °C	2 min
Almacenaje	1	4 °C	∞

Tabla 15: condiciones específicas de PCR para *p53*.

- *Cre*

Nombre cebador	Secuencia (5' → 3')
Cre (Rv)	CCA GGT TAC GGA TAT AGT CAT G
Cre (Fw)	TGC CAC GAC CAA GTG ACA GC

Tabla 16: nombres y secuencias de los cebadores para *Cre*.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95 °C	2 min
Desnaturalización	35	95 °C	45 seg
<i>Annealing</i> del cebador		55 °C	45 seg
Extensión		72 °C	45 seg
Extensión final	1	72 °C	5 min
Almacenaje	1	4 °C	∞

Tabla 17: condiciones específicas de PCR para *Cre*.

Con el producto de amplificación de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,5% agarosa (Conda) y 0,05% SYBR Safe (Thermo Scientific)). La detección del ADN en el gel se realizó mediante el lector *LAS-4000* (Fujifilm).

4. Generación de tumores subcutáneos

Para generar los tumores, se utilizaron células neoplásicas KPC y KPC1, y CEPs *Zeb1^{+/+}* y *Zeb1^{+/-}*. Las células fueron inyectadas subcutáneamente en cada uno de los flancos inferiores del ratón, utilizando una aguja de 29G. Los ratones receptores que se utilizaron fueron de la cepa C57/Bl6, de forma que no hubo problemas de rechazo. Se administraron $1 \cdot 10^6$ células por tumor, de las cuales $2 \cdot 10^5$ eran células KPC o KPC1 y $8 \cdot 10^5$ eran CEPs *Zeb1^{+/+}* o *Zeb1^{+/-}*. En el caso del control, se administraron $2 \cdot 10^5$ células KPC o KPC1. Las células se homogeneizaron con DMEM sin suplementar en una dilución 1:1 con *Matrigel[®] Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix* (Corning), obteniendo un volumen final de suspensión celular de 100µl para la inyección subcutánea.

Pasados 10 días de la inyección celular, se monitorizó el volumen tumoral de forma directa utilizando un pie de rey. Se midió el diámetro grande (D) y el pequeño (d) del tumor, y se calculó el volumen aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = (D \cdot d^2 \cdot \pi) / 6$$

El volumen se midió cada 3 días hasta el momento del sacrificio a los 20 días de la generación de los tumores. En ese momento, se resecaron los tumores, y se registraron las medidas de peso y volumen a tiempo final.

5. Ensayos de metaplasia acino-ductal (cultivo de acinos en 3D)

La base conceptual de estos ensayos es que los factores de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular presentes en el *Matrigel*[®] son capaces de inducir en un porcentaje de células acinares la transdiferenciación hacia células ductales.

El procedimiento experimental consta de los siguientes pasos:

Para comenzar, es necesario precondicionar la placa de cultivo, que en este caso fueron placas de 96 pocillos. Se añadió en cada pocillo 25 μ l de una mezcla de *Matrigel*[®] *Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix* (Corning) y medio de cultivo en proporción 1:1, formando un “colchón” para evitar que los acinos entren en contacto con el fondo de plástico de la placa. Se situó la placa en el incubador durante 1 hora aproximadamente, tiempo durante el cual el *Matrigel*[®] polimerizó.

Mientras la placa de cultivo se encontraba en el incubador, se aislaron los acinos tal y como se especifica en el apartado 3.2. El precipitado celular obtenido en el aislamiento se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo completo (a la que nombraremos solución A), y de esta suspensión se realizó una dilución 1:10 a un volumen final de 5 ml (500 μ l de suspensión celular en 4,5 ml de medio de cultivo), a la que llamaremos solución B. De esta manera, 125 μ l de solución B incluye un 0,25% del total de acinos aislados, volumen al cual llamamos 1 Unidad. 1 Unidad es la estimación del número de células que se sembrarán por cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Sin embargo, en función del tamaño del páncreas y de la eficiencia del aislamiento, la cantidad de células en 1 Unidad puede variar y es necesario ajustarla

aumentando o disminuyendo el volumen que corresponde a 1 Unidad. Este ajuste es necesario ya que una confluencia mayor o menor que la óptima puede traducirse en una baja eficiencia de transdiferenciación acino-ductal (Figura 15).

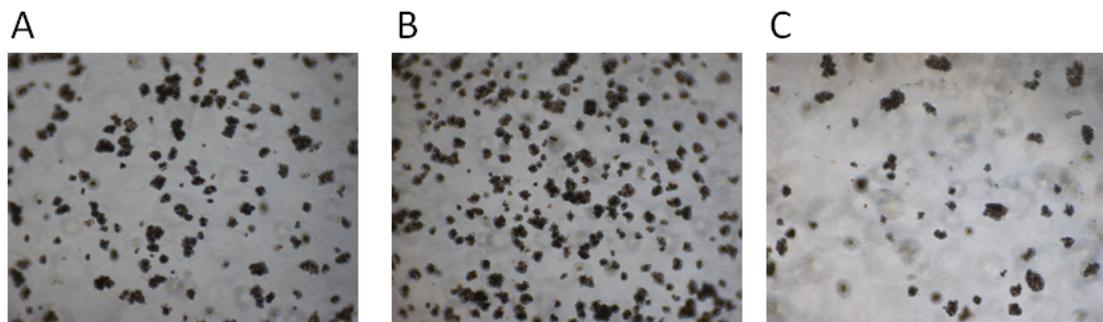


Figura 15. Confluencias que puede tener la suspensión de acinos.

(A) Confluencia correcta para que la MAD ocurra de manera adecuada. **B.** Exceso de confluencia. **C.** Déficit de confluencia.

De esta manera, se preparó el volumen de suspensión celular correspondiente en función del volumen establecido como 1 Unidad y de los pocillos que se quisieran sembrar. Por ejemplo, si finalmente se establecía que 1 Unidad = 100 μ l, para una siembra de 20 pocillos se requerían 2 ml de la solución B. Finalmente, se centrifugó y se resuspendió el precipitado celular en el volumen correspondiente, teniendo en cuenta que el volumen que se siembra por pocillo es de 100 μ l, y que consiste en una dilución 1:1 de Matrigel® (50 μ l) y suspensión celular (50 μ l). Se sembró encima del “colchón” de Matrigel® previamente preparado, y se dejó polimerizar 30 min. Se añadieron cuidadosamente encima 250 μ l de medio atemperado con el tratamiento correspondiente.

Pasados 4 días, con un microscopio óptico se realizó el conteo de formaciones ductales presentes en 9 campos por cada pocillo. Aunque se observaron estructuras ductales con diferentes morfologías, solamente se consideraron válidas aquellas que cumplieran las dos condiciones siguientes: no más de uno o dos espacios luminales, y aquellas cuyo grosor de pared fuese menor que el diámetro del espacio luminal (Figura 16).

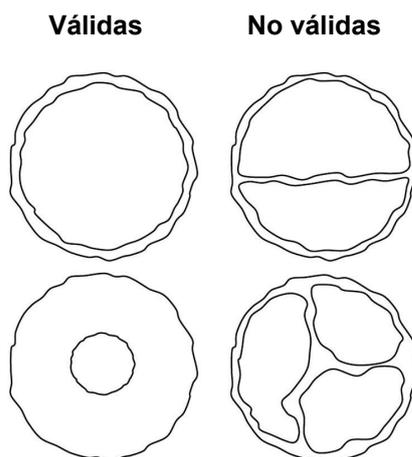


Figura 16. Morfologías ductales tras el cultivo en Matrigel®.

Morfología de estructuras ductales válidas (izquierda) e inválidas (derecha) a tener en cuenta durante la cuantificación.

Reactivo	Concentración	Casa comercial
RPMI 1640	-	Gibco
FBS	1%	Gibco
Estreptomina	100 U/ml	Gibco
Penicilina	100 U/ml	Gibco
Piruvato de sodio	1 mM	Gibco
Inhibidor de tripsina	0,1 mg/ml	Sigma

Tabla 18: componentes y concentraciones del medio completo para el cultivo de acinos en 3D.

6. Generación de medio condicionado (MC)

Las CEPs activas se sembraron a un 60-80% de confluencia y se trataron con TGF β 1 (10 ng/ml) durante 24 horas para asegurar una activación completa. Pasado este tiempo se reemplazó el medio suplementado con TGF β 1 por medio de cultivo a la concentración de SBF correspondiente en función del procedimiento experimental, y se recolectó 24 horas más tarde. Los restos celulares se eliminaron pasando el MC por un filtro de 0,22 μ m (BD Falcon). Solamente se utilizó MC recién recolectado, y en ningún caso se congeló para su uso posterior.

7. Tinciones histológicas

7.1. Inmunofluorescencia

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, y se mantuvieron en etanol al 30% hasta su inclusión en parafina. El desenmascaramiento del antígeno se realizó con tampón citrato a una concentración de 10 mM (29,4 g de ácido cítrico en 1L de agua, pH6) y Tween-20 (0,1 µl/ml, Sigma) durante 3 min en olla a presión. Los tejidos se trataron durante 30 min con 0,1% NaBH₄ en PBS para reducir los grupos aldehído y eliminar autofluorescencia. Luego se incubaron con solución de bloqueo (4% de BSA, 0,5% de Tween-20 y 5% de *Normal Goat Serum* (NGS, Sigma) en PBS) durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, seguido de la incubación overnight (ON) del anticuerpo primario a 4 °C en cámara húmeda. El anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a 37 °C. Ambos anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo.

Para visualizar las tinciones se utilizó el microscopio de fluorescencia NIKON Elipse E50i. Las imágenes se obtuvieron con el software Isis Fluorescence Imaging System (Metasystems).

7.2. Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido embebidas en parafina se desparafinaron con xilol (tres incubaciones de 10 min) y se hidrataron con etanol a concentraciones decrecientes (incubaciones de 5 min, 2x100%, 96%, 70%, 50%), para terminar con un lavado de agua destilada.

Tras el desparafinado y la hidratación, el desenmascaramiento del antígeno se realizó con tampón citrato (10 mM, pH6) durante 3 min en olla a presión. Tras dejar atemperar los portaobjetos dentro de la misma olla, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con PBS al 1% de TritonTM X-100 (Sigma) durante 15 min. La peroxidasa endógena de los tejidos se bloqueó durante 15 min en una solución preparada en fresco de metanol al 0,3% de H₂O₂. Tras hacer un lavado con PBS, se llevó a cabo el bloqueo durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda usando una solución de bloqueo (Kit K5007 Dako) al 3% de NGS. Los tejidos se incubaron ON a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de

bloqueo. Al día siguiente, tras realizar tres lavados de 5 min con PBS, los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario (Kit K5007 Dako) durante 1 hora en cámara húmeda a 37 °C. A continuación, se añadió DAB (3, 3 –diaminobenzidine, Kit K5007 Dako) para detectar la peroxidasa, hasta obtener la tinción adecuada. La contratinción se realizó con hematoxilina. Tras deshidratar los tejidos, se montaron con DPX (Sigma) para preservar la tinción.

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración IHQ//IF
Zeb1	Santa Cruz	1:50 // 1:250
α SMA	Cell Signalling	1:400 // 1:400
CK19	Cell Signalling	1:400 // -
Ki67	AMBION	1:50 // -

Tabla 19: Anticuerpos y concentraciones usadas para las tinciones por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

7.3. Histoquímica

7.3.1. Hematoxilina y eosina

Los tejidos desparafinados e hidratados se incubaron en hematoxilina (Sigma) durante 10 min, seguido de un lavado con agua corriente (2 min) y otro de ácido acético al 1% (1 min) para llevar a cabo el viraje de la hematoxilina. Los tejidos se volvieron a lavar con agua corriente y se incubaron durante 2 min en etanol al 96%. A continuación se procedió a teñir durante 4 min con eosina (Sigma) el citoplasma de las células que conforman el tejido. Para terminar la tinción, se incubaron los tejidos con etanol al 96% y al 100% durante 5 min, y se procedió a la deshidratación y al montaje de los tejidos con DPX (Sigma).

7.3.2. Tricrómico de Mallory

Este método se basa en la tinción selectiva de algunos componentes del tejido conjuntivo de acuerdo con los diferentes niveles de afinidad entre los colorantes y las macromoléculas del tejido. El tejido conjuntivo es principalmente acidófilo debido a la

presencia de grupos básicos, por lo que muestra una fuerte afinidad por los colorantes ácidos.

La tinción se realizó con el kit comercial de Tricrómico de Mallory (Bio-Optica), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los reactivos que contiene el kit son los siguientes:

Reactivo	Componente
A	<i>Weigert's iron hematoxylin</i>
B	<i>Weigert's iron hematoxylin</i>
C	<i>Picrate orange alcoholic solution</i>
D	<i>Fuchsin ponceau polychrome solution</i>
E	Ácido fosfomolibdico
F	Azul de anilina

Tabla 20: Reactivos del kit de Tricrómico de Mallory.

Los tejidos desparafinados e hidratados se incubaron con una mezcla 1:1 de las soluciones A y B durante 10 min, que tiñe de marrón oscuro los núcleos celulares, seguido de un lavado de 10 min en agua corriente para virar la hematoxilina. A continuación, se tiñeron de amarillo los gránulos acidófilos y eritrocitos utilizando la solución C (2 min). Tras incubar los tejidos con la solución D durante 1 min y lavar con agua destilada, se trataron con la solución E de ácido fosfomolibdico (15 min), que actúa como un puente entre las fibras de colágeno a las cuales se une y el azul de anilina. De esta manera, cuando a continuación incubamos los tejidos con la solución F de azul de anilina (2 min), las fibras de colágeno quedaron teñidas selectivamente de un azul intenso.

La deshidratación se realizó con una sola inmersión rápida en el etanol absoluto y en los tres xiloles para evitar que se desvaneciera la intensidad del color azul. Finalmente los tejidos se montaron con DPX.

7.3.3. Alcian blue

Para realizar esta histoquímica se utilizó el Kit comercial Alcian Blue pH 2.5 (Abcam), que contiene una solución de ácido acético, la solución de Alcian Blue y la solución de Safranina.

Los tejidos desparafinados e hidratados se incubaron con la solución de ácido acético durante 3 min, y seguidamente con el Alcian Blue durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de 2 min con agua corriente, y luego con agua destilada. Tras una incubación con la solución de Safranina durante 5 min y dos lavados más con agua corriente, se procede a la deshidratación de los tejidos. La deshidratación se realizó con una sola inmersión rápida en el etanol absoluto y en los tres xiloles para evitar que la tinción de Alcian Blue desapareciera.

8. Ensayo de migración celular (*wound healing*)

Las CEPs o las células neoplásicas se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia cercana al 100%. En el caso de las células neoplásicas, se incubaron en medio sin SBF durante 24 h para sincronizarlas en la misma fase del ciclo celular. Las CEPs son muy sensibles y tras 24 h de privación de SBF entran en senescencia, por lo que no se les realizó la sincronización. En lugar de esto, se pre-activaron durante 24h con TGF β 1 recombinante (10 ng/ml). Al día siguiente, se trataron las células con 10 μ g/ml de *Mitomycin-C*[®] (Inibsa Hospital) durante 1 h con la finalidad de parar el ciclo celular de las células y que la migración observada fuera debida a la migración y no a la proliferación de las células del frente migratorio. A continuación se realizó un lavado con PBS para eliminar bien los restos de *Mitomycin-C*[®], se enriqueció el medio de cultivo con un 10% de SBF, y con una punta de pipeta de 1 ml se realizó una línea sobre la monocapa de células cruzando el pocillo (tiempo 0). Se tomaron imágenes con un microscopio óptico a tiempo 0 y a las 24 horas para luego calcular el área de cierre provocado por la migración de las células.

El área de cierre se calculó utilizando *Adobe PhotoShop C4*, cuantificando el número de píxeles correspondiente al área libre de células. La resta de los valores obtenidos a tiempo final e inicial, nos dio el área de cierre.

9. Ensayo de invasión

Los ensayos de invasión se realizaron usando cámaras de invasión (insertos) con membranas de 8 μm de poro recubiertas de *Matrigel*[®] (*BioCoat*[™] *Matrigel*[®] *Invasion Chambers*, Corning), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 3×10^4 células neoplásicas dentro de cada inserto y se trataron con medio de cultivo al 0,3% de SBF o con medio condicionado de CEPs. Pasadas 24 horas, se utilizó el kit *Differential Quick Stain Kit* (Polysciences) siguiendo las instrucciones del fabricante para teñir las células que habían degradado y atravesado el *Matrigel*[®] y se habían quedado adheridas debajo de la membrana del inserto.

Se contaron el número de células presentes en 5 campos por inserto (Figura 17).

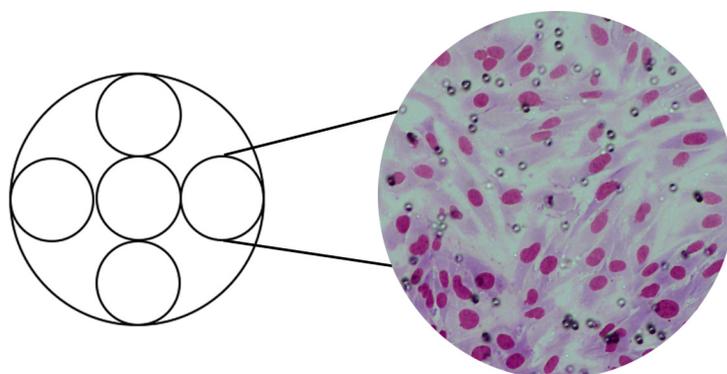


Figura 17. Campos por inserto para la cuantificación de la invasión celular.

Distribución de los 5 campos por inserto que se cuantificaron para calcular el índice de invasión, e imagen de las células adheridas al inserto y teñidas en el momento de hacer el conteo.

Calculando la media de los valores de los 5 campos, se obtuvo el índice de invasión para cada condición.

10. Ensayo de proliferación

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (5000 CEPs/pocillo, 1000 Emvc3p36/pocillo). La proliferación se determinó a las 24 horas, 72 horas y 5 días (en caso de las CEPs) midiendo la cantidad de ADN celular total por fluorescencia con el kit *CyQUANT cell proliferation assay kit* (Molecular Probes). El procedimiento consiste en eliminar el medio de cultivo, congelar las células en la misma placa donde se han cultivado, lo cual provoca un aumento del volumen del citosol y la rotura de las células.

Tras congelar la placa se añadió el colorante fluorescente proporcionado en el kit comercial. La fluorescencia se midió en el lector de placas Fluostar Optima a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente.

11. Determinación de fragmentación de ADN

La fragmentación de ADN es el evento final que ocurre como consecuencia de la activación de la apoptosis en la célula. Se utilizó el kit comercial *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche) el cual determina fragmentos mono y oligonucleosomales, cuya presencia es característica en la apoptosis.

El kit es un inmunoensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos), que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para la detección de ADN e histonas. El anticuerpo anti-histona conjugado con biotina se une a la estreptavidina de la placa. Los fragmentos nucleosomales de la muestra unidos al anticuerpo anti-ADN conjugado con peroxidasa se unen a la placa por medio de la unión de la histona de la muestra al anticuerpo anti-histona. En presencia del sustrato, la peroxidasa reacciona y se detecta mediante espectrofotometría.

Los resultados de la fragmentación de ADN tanto en las CEPs como en las células neoplásicas se normalizaron con los valores de ADN total de cada muestra obtenidos mediante el ensayo de proliferación CyQUANT (detallado en el apartado 10 de materiales y métodos).

12. Análisis de citotoxicidad

El MTS (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega) es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o tras un determinado tratamiento citotóxico.

Las células reducen el reactivo del MTS en forma de un producto llamado formazán, que es soluble en el medio de cultivo y detectable por absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Las responsables de esta reacción de reducción son las

moléculas de NADPH o NADH producidas por las enzimas del metabolismo de las células activas, por lo que la cantidad de formazán detectado por absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

Se sembraron 5000 células por pocillo por triplicado en placas de 96 pocillos, y se cultivaron y trataron durante el periodo de tiempo correspondiente. Después, se añadió el reactivo MTS a una concentración de 100 µl/ml y se leyó la absorbancia a 490 nm tras 1 h, 2 h y 3 h de incubación a 37 °C con 5% CO₂. Los datos de absorbancia obtenidos a las 2 h de incubación fueron escogidos como los más precisos a la hora de realizar las gráficas correspondientes e interpretar los resultados.

13. Western Blotting

13.1. Extracción de proteínas

Los extractos proteicos totales de células se obtuvieron lisando las membranas celulares con el tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA), cuyo contenido es el siguiente:

Reactivo	Concentración	Casa comercial
Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM	Sigma
NP-40	1%	Sigma
Na-deoxycholate	0,5%	Sigma
SDS	0,1%	Sigma
NaCl	150 mM	Sigma
EDTA	2 mM	Sigma
NaF	50 mM	Sigma

Tabla 21: componentes y concentraciones del tampón de lisis RIPA.

Para evitar la degradación de las muestras, se añadieron inhibidores de proteasas al tampón RIPA, concretamente PMSF (0,1 M, Sigma) y cComplete Mini (1 tableta/5 ml RIPA, Roche). En caso de que querer detectar la fosforilación de proteínas, se añadió también el inhibidor de fosfatasa comercial phosSTOP (1 tableta/5 ml RIPA, Roche).

De esta manera, los extractos celulares se incubaron 30 min con el tampón RIPA en hielo. Pasado este tiempo, los restos celulares se descartaron por centrifugación durante 30 min a 14000 rpm y 4 °C.

13.2. Cuantificación de proteínas

La concentración proteica obtenida de los extractos celulares se determinó mediante detección colorimétrica utilizando el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Este ensayo se basa en la capacidad de los enlaces peptídicos de reducir el Cu^{2+} a Cu^+ . El cobre producido es quelado por el ácido bicinónico produciendo como resultado un cambio de color proporcional a la concentración de proteína. Se incubaron las muestras con los reactivos del kit durante 30 min a 60 °C para favorecer la reacción colorimétrica. La absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de 526 nm en el espectrofotómetro Epoch™ (Biotek).

Cada muestra se ajustó a la concentración deseada resuspendiendo en tampón RIPA.

Todas las muestras se llevaron a la misma concentración y volumen resuspendiéndolas en tampón RIPA. A esta mezcla se le añadió un agente reductor (NuPAGE® Sample Reducing Agent, Invitrogen) que contiene 500 mM de ditioneol (DTT), que rompe los puentes disulfuro entre proteínas y mantiene las muestras de proteicas en estado reducido durante la electroforesis. Además del agente reductor, se añadió un tampón de muestra de dodecilsulfato de litio (*LDS Sample Buffer*, Invitrogen), que permite la actividad máxima del agente reductor.

13.3. Electroforesis

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida (geles Bis-Tris Nu-PAGE 4-12% o 12%, Invitrogen). Las muestras cargadas en un mismo gel tenían la misma concentración.

Una vez introducidas en el gel, las proteínas se sometieron a un campo eléctrico (120 V) de forma que migraron hacia el polo positivo a una velocidad variable en función de la resistencia que encontraron en el gel. El SDS que contiene el tampón de

electroforesis (*NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer 20x*, ThermoFisher) desnaturaliza las proteínas, y las envuelve en cargas negativas homogenizando su carga, de manera que la velocidad de migración de las proteínas a través del gel está determinada por su peso molecular.

Reactivo	Concentración
MOPS	50 mM
Tris Base	50 mM
SDS	0,1%
EDTA	1 mM

Tabla 22: Composición del tampón comercial de electroforesis.

13.4. Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se encuentran separadas en el gel por su peso molecular.

A continuación se transfirieron a un soporte más estable, como son las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *PVDF Pre-cut Blotting Membranes, 0,2 μ m pore size*, ThermoScientific). Dado que el PVDF es un material muy hidrofóbico, antes de su uso las membranas se activaron con metanol para aumentar su capacidad de unión a proteínas.

En la transferencia, las proteínas migran del gel a la membrana tras someterse a un campo eléctrico (30 V durante 1 h a 4 °C).

13.5. Inmunodetección de las proteínas

La detección de las proteínas se basa en el reconocimiento de epítomos concretos de los antígenos por parte de anticuerpos específicos.

La membrana se bloqueó durante 2 h a TA con BSA o leche al 5% resuspendidas con TBS-T (Tabla 24), con la finalidad de bloquear las uniones inespecíficas por parte del anticuerpo. A continuación, se incubó la membrana en presencia del anticuerpo

primario que reconocerá la proteína de interés (en la Tabla 23 se indica el tiempo y temperatura de incubación en función del anticuerpo). Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante tres lavados a TA con TBS-T, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody* or *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody*, Thermo Scientific) a una concentración 1:2500 durante 1 h a TA. Los anticuerpos secundarios están conjugados a HRP (*horseradish peroxidase*) y reconocen la cadena pesada del anticuerpo primario.

La detección del anticuerpo unido a la proteína de interés se realiza mediante el kit *SuperSignal WestFemto* (Pierce), basado en el sistema de revelado ECL (*Enhanced ChemoLuminiscent*), en el que la peroxidada degrada el peróxido de hidrógeno favoreciendo la oxidación del luminol. Como consecuencia, se emite una señal de quimioluminiscencia, detectada usando el lector *LAS-4000* (Fujifilm).

Anticuerpo	Peso (kDa)	Casa comercial	Concentración	Tiempo y T ^a
Zeb1	124	Santa Cruz	1:250 in 5% BSA TBS-T	2h TA
Ser473Akt	60	Cell Signalling	1:2000 in 5%BSA TBS-T	4°C ON
panAkt	60	Cell Signalling	1:1000 in 5%BSA TBS-T	4°C ON
Gapdh	36	AMBION	1:1000 in 5%BSA TBS-T	2h TA

Tabla 23: Lista de anticuerpos primarios con sus correspondientes condiciones de incubación.

Reactivo	Concentración
Tris-Hcl (pH 7.5)	10 mM
NaCl	100 mM
Tween-20	0,05%

Tabla 24: Composición del TBS-T

13.6. Cuantificación de las bandas

La intensidad de las bandas se evaluó mediante densitometría con el programa *Adobe Photoshop CS4*. Los valores de la proteína de interés se relativizaron a los valores de intensidad de banda del control endógeno utilizado en cada caso.

14. Análisis de actividad Ras

Se utilizó el *Pan-Ras Activation Assay Kit* (Cell Biolabs) para cuantificar la cantidad de moléculas de Ras activas en cada muestra.

En su estado activado (unido a GTP), Ras se une específicamente al dominio RBD (*Ras-binding domain*) de Raf1 (Figura 18), y controla de esta manera las cascadas de señalización *downstream*. El funcionamiento del kit se basa en la unión específica GTP-RBD; utiliza *beads* de agarosa que contienen la secuencia de unión del dominio RBD, de manera que se unen específicamente a las moléculas de Ras activas. Las moléculas Ras se detectan por western blot usando un anticuerpo Anti-pan-Ras.

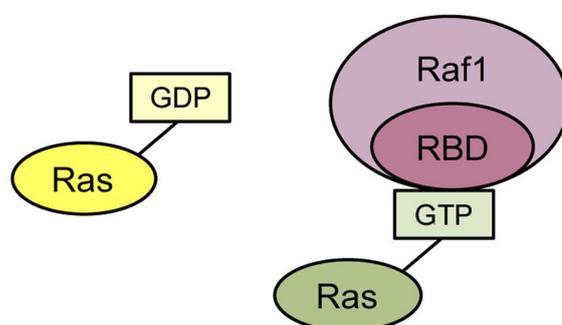


Figura 18. Unión Ras-GTP al dominio RBD.

Imagen descriptiva de la unión de la molécula de Ras activa (Ras-GTP) al dominio RBD de Raf1, en la cual se basa el funcionamiento del ensayo de inmunoprecipitación de Ras (*Pan-Ras Activation Assay Kit*).

14.1. Preparación de muestras

Se recogieron las células en cultivo y se incubaron durante 20 min en hielo con el tampón de lisis (1x) proporcionado por el kit, al cual se añadió en fresco un inhibidor de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 100 mM). Tras esta incubación, los lisados celulares se centrifugaron durante 10 min a 14000 g y 4 °C y se conservó el sobrenadante, donde se encuentra la fracción proteica.

Con este material, se prepararon dos tipos de muestras: la destinada a realizar la inmunoprecipitación (muestra A), y la utilizada para cuantificar la cantidad total de Ras por muestra (muestra B). Ambas se cuantificaron mediante detección colorimétrica por

BCA (*BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific), y se ajustaron los volúmenes con tampón de lisis (1x) hasta conseguir una concentración de 1 mg de proteína (para la muestra A) y 20 µg de proteína (para la muestra B).

14.2. Pull-down de Ras (muestra A)

Se incubaron las muestras proteicas con las *beads* de agarosa durante 1 hora a 4°C en agitación suave, tiempo durante el cual las *beads* se unieron específicamente a las moléculas de Ras activas. Tras una centrifuga de 10 segundos a máxima velocidad las moléculas de Ras inactivas fueron descartadas con el sobrenadante; se recolectaron las *beads* y se lavaron tres veces con tampón de lisis, centrifugando y aspirando el sobrenadante cada vez. Terminados los lavados, se resuspendió el pellet en 40 µl de tampón reductor SDS-PAGE 2x (Tabla 25) y se hirvieron las muestras a 90°C durante 5 min.

Reactivo	Concentración
Tris-HCl	1 M
SDS	10%
Glicerol	20%
B-mercaptoetanol	25%
Azul de bromofenol	1%

Tabla 25: Composición del tampón reductor SDS-PAGE (2x)

14.3. Preparación de proteínas totales (muestra B)

A las muestras correspondientes a la fracción proteica total se les añadió un tampón de dodecilsulfato de litio (*LDS Sample Buffer*, Invitrogen) proporcionado por el kit comercial, y se incubaron a 90 °C durante 5 min.

14.4. Inmunodetección

La electroforesis de las muestras proteicas se realizó en geles de poliacrilamida (Bis-Tris Nu-PAGE 12%, Invitrogen), y la transferencia en membranas de PVDF (*PVDF Pre-cut Blotting Membranes*, 0,2 µm pore size, ThermoScientific). Tras la

transferencia, se bloqueó la membrana con TBS-T (Tabla 24) al 5% de leche y temperatura ambiente.

Para la inmunodetección proteica, se incubó la membrana con el anticuerpo Anti-pan-Ras en una dilución 1:1000 con TBS-T al 5% de leche durante 2 h a TA. Tras tres lavados con TBS-T, se expuso la membrana al anticuerpo secundario (1 h a TA) y se reveló la membrana con ECL (kit *SuperSignal WestFemto*, Pierce). La señal de quimioluminiscencia se detectó con el lector *LAS-4000* (Fujifilm).

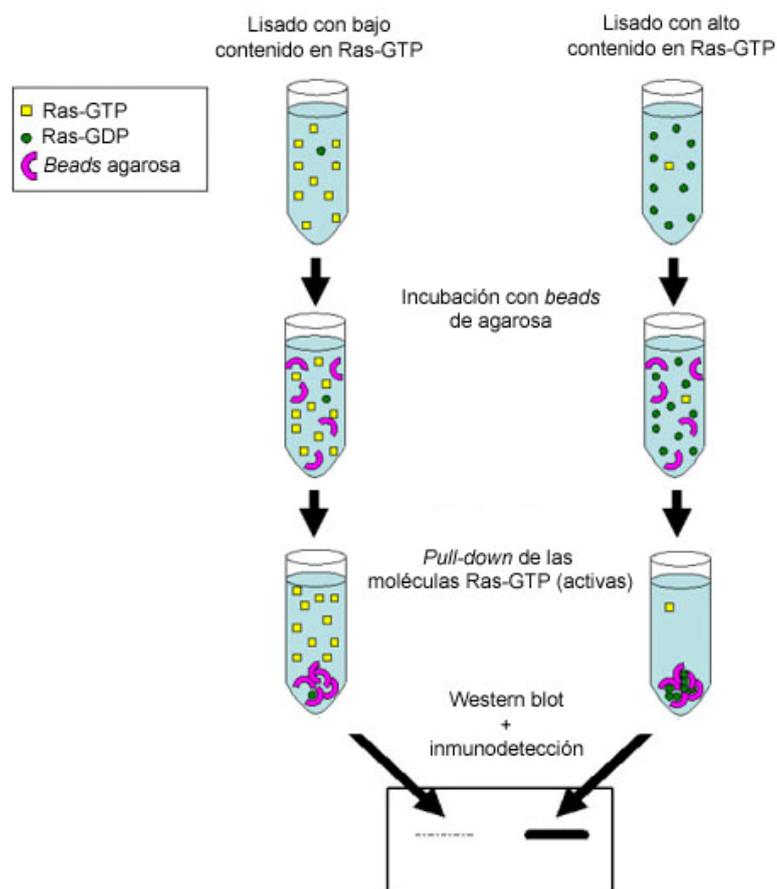


Figura 19. Inmunoprecipitación de Ras-GTP.

Esquema del procedimiento experimental necesario para llevar a cabo la inmunoprecipitación de Ras-GTP.

15. Transfección con RNA interferencia

Mediante esta técnica se realizó un silenciamiento transitorio de *Kras* y de *Zeb1*.

Se sembraron las células en placas de 60 mm a una confluencia aproximada del 80%.

Los medios de transfección se prepararon de la siguiente manera:

- a) Suspensión de lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen): para una transfección eficiente, por cada placa de 60 mm se resuspendieron 15 μ l de lipofectamina en 250 μ l de Opti-Mem[®] (Life Technologies).
- b) Suspensión de oligonucleótidos: por cada placa se prepararon 250 μ l de Opti-Mem[®], con siARN Zeb1 (3'-AAUUUGUACCUUGUCACAAGACCAG-5') a una concentración de 0.3 μ M o siARN Kras (3'-AAUUUGUUCUCUAUAAUGGtg-5') a una concentración de 10nM. Como control negativo de transfección se utilizó una secuencia siARN de bajo contenido en GC resuspendida a una concentración de 0.3 μ M en 250 μ l de medio Opti-Mem[®]. Todas las secuencias de siARN las desarrolló *Integrated DNA Technologies*. En el caso de la secuencia de siKras se comprobó que no hibridara sobre la región donde se encuentra la mutación de *Kras*, lo cual podría limitar su eficiencia de hibridación.

Para realizar la transfección, se agregaron 250 μ l de la suspensión de lipofectamina por cada 250 μ l de suspensión de siARN y se dejó incubar durante 30 min. Durante este tiempo, los lípidos que forman la lipofectamina y los oligonucleótidos forman unos complejos que tienen elevada afinidad por la membrana celular y permiten la entrada del siARN en el citosol. La solución de transfección se añadió a la placa correspondiente que ya contenía medio de cultivo al 10% de SBF.

Tras 24 horas de incubación con el siARN, el medio de cultivo se reemplazó por medio suplementado con un 10% de SBF. Las células se incubaron a 37 °C (5% CO₂) durante 48 h más. El silenciamiento génico se comprobó mediante RT-qPCR y Western Blotting.

16. Análisis de expresión de ARNm mediante RT-qPCR

16.1. Extracción y purificación del ARN

La extracción del ARN de las células cultivadas se realizó con el *RNeasy total RNA preparation kit* (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El procedimiento de

extracción del ARN celular consiste en el tratamiento inicial de la muestra con una solución de β -mercaptoetanol y tiocianato de guanidinio, que facilita el lisado celular e inhibe las ARNasas, seguido de la adición de etanol al 70%. A través de varios pasos de lavado, los contaminantes se eliminan y finalmente el ARN purificado se eluye en un volumen final de 30 μ l de NFW. Se almacena a -80 °C hasta su utilización.

16.2. Cuantificación y calidad del ARN

La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría, basada en la presencia de los anillos aromáticos de las bases nitrogenadas, que confiere al ARN una densidad óptica (o absorbancia) máxima a 260 nm. Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), que determinó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm.

A partir del resultado de densidad óptica a 260 nm, se calcula directamente la concentración de ARN, mientras que su pureza se valora a partir de las relaciones $D.O.^{260/280}$ (determina la presencia de proteínas, fenoles, etc) y $D.O.^{260/230}$ (detecta otros contaminantes usados durante la extracción). Si la pureza del ARN es elevada ambos cocientes tendrán un valor cercano a 2, mientras que en presencia de contaminantes el cociente se acercará a 0.

16.3. Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

La reacción de retrotranscripción del ARNm en ADNc (ADN complementario de cadena sencilla) es necesaria ya que la ADN polimerasa utilizada en las PCRs reconoce el ADN y no el ARN como molde para realizar las reacciones.

En base a la concentración de ARN obtenida tras la extracción, se ajustó con agua libre de nucleasas el volumen de las muestras de manera que todas tuviesen la misma concentración a la hora de realizar la RT.

Para realizar la RT, se utilizó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Applied Biosystems) y el termociclador *Mastercycler*[®] (Eppendorf).

El kit está basado en una combinación de cebadores de seis nucleótidos con secuencias generadas al azar para asegurar la síntesis eficiente de ADNc a partir de todas las moléculas presentes en la muestra.

Se establecieron las siguientes condiciones del termociclador:

Ciclo	Duración	Temperatura
1	10 min	25 °C
2	2 h	37 °C
3	5 min	85 °C
4	∞	4 °C

Tabla 26: Condiciones de la retrotranscripción en el termociclador

El volumen final de la reacción fue de 20 µl.

16.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La tecnología de la RT-qPCR está basada en la detección de una señal fluorescente producida durante la amplificación, la cual es proporcional a la cantidad de ADNc que se quiere detectar.

Mediante esta técnica, a partir del ADNc obtenido tras la retrotranscripción, se realizó una cuantificación de los transcritos de los genes problema. A partir de la señal de fluorescencia obtenida, se genera una curva de amplificación en la que se representa el número de ciclos de la PCR frente a la fluorescencia detectada. Para este estudio, se usó el sistema de fluorescencia *TaqMan*[®] *Gene Expression* (Applied Biosystems).

Los cebadores (*TaqMan*[®] *Gene Expression Assays*, Applied Biosystems) usados en la RT-qPCR fueron los siguientes:

Gen	Tamaño amplicón	Nº identificación
<i>Zeb1</i>	60	Mm00495564_m1
<i>B2m</i>	77	Mm00437762_m1
<i>Acta2</i>	95	Mm00725412_s1
<i>Mmp9</i>	76	Mm00442991_m1
<i>Col1a1</i>	89	Mm00801666_g1

Tabla 27: Nombre del gen, tamaño del amplicón y identificación de los cebadores utilizados para realizar la RT-qPCR.

Se añadieron en cada pocillo de la placa de reacción 2,5 µl de muestra por duplicado, y 10 µl de la siguiente mezcla (volúmenes por pocillo): 6,25 µl de *TaqMan*[®] *Universal PCR MasterMix*, 2,5 µl de H₂O libre de nucleasas y 0,62 µl de *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (de cada cebador, el endógeno y el específico). Se añadió un control negativo con NFW por cada cebador usado para asegurar la ausencia de contaminantes.

La PCR se realizó en el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) con el programa de ciclos siguiente:

Ciclo	Duración	Temperatura
Pre-PCR	2 min	50 °C
	10 min	95 °C
PCR (50 ciclos)	15 seg (desnaturalización)	95 °C
	1 min (unión/extensión)	60 °C

Tabla 28: Condiciones de PCR en el termociclador.

17. Ensayo transcriptómico

1.1. Análisis de expresión génica con microarray

Tras cultivar las células de estudio, se aisló y cuantificó el ARN mediante el mismo procedimiento detallado en los apartados 16.1 y 16.2.

El análisis transcriptómico de las muestras se realizó en la Unidad de genómica del Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona de la siguiente manera:

Tras un primer control de calidad utilizando el Bioanalyzer 2100 (Agilent), el ARN se retrotranscribió a ADNc. Las moléculas de ADNc se marcaron con Cyanine-3 utilizando el *SureTag Complete DNA Labeling kit* (Agilent), siguiendo las indicaciones del fabricante. Al ADNc marcado (600 ng de cada muestra) se le añadió el tampón de hibridación y el agente bloqueante (Agilent), y se incubó la mezcla a 95 °C durante 3 min. A continuación, se hibridó el ADNc al microarray *SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 8x60K* (Agilent) durante 40 horas a 65 °C en un horno de hibridación con rotación. Tras escanear el microarray a una resolución de 3 µm (*High-Resolution Microarray Scanner G2539A*, Agilent), se extrajeron los datos de intensidad de cada hibridación individual mediante el *Feature Extraction software 10.7* (Agilent). Estos datos sin procesar se transfirieron a la Unidad de Bioinformática del CRG para su posterior análisis.

17.1. Análisis bioinformático

Los análisis de expresión diferencial se realizaron con el paquete *Limma*¹⁹⁹.

Se utilizó el programa IPA (*Integrated® Pathway Analysis*, Qiagen) para realizar diferentes análisis de enriquecimiento a partir de los datos de expresión génica diferencial. IPA contiene una base de datos muy completa y precisa (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*, IPKB), que lo convierte en una herramienta de gran utilidad para el análisis e interpretación de datos.

Una de las funcionalidades de IPA es la generación de redes génicas de interacción directas e indirectas para la identificar las funciones biológicas. Para ello, IPA utiliza la *Global Molecular Network* (GMN), una base de datos elaborada a partir de IPKB y compuesta por miles de anotaciones funcionales ya establecidas de genes con interacciones conocidas entre ellos. Las redes génicas se establecen mediante un algoritmo complejo, que se basa en la observación de que los genes más fuertemente conectados tienden a estar involucrados en funciones biológicas similares. El algoritmo consulta en la GMN las conexiones (directas e indirectas) de los genes incluidos por el usuario, generando redes asociadas a funciones biológicas, y completándolas mediante otras conexiones génicas cercanas. Aquellos genes incluidos por el usuario i

que forman parte de las redes resultantes son destacados como *Focus genes*. De esta forma, proporciona redes génicas compuestas por una cantidad concreta de genes (n) y sus *Focus genes* (f). Con estos datos calcula el p -value para cada red génica (mediante un test exacto de Fisher), que representa la probabilidad de encontrar f o más genes de la lista de *Focus genes* en un conjunto de n genes del GMN aleatoriamente seleccionados. Este p -value se transforma a p -score para representarlo de forma más visual, de manera que un p -score alto implicará una alta significancia estadística:

$$p\text{-score} = -\log_{10}(p\text{-value})$$

También realizamos un análisis de las vías de señalización canónicas enriquecidas por los genes diferencialmente expresados. En este análisis la significancia para cada vía de señalización se muestra como p -score e indica la probabilidad de asociación al azar de cada gen incluido en el análisis de expresión diferencial con la vía canónica en cuestión. De esta manera, valores más altos de p -score indican mayor significancia estadística.

Por último, se representaron en un *heatmap* los genes que formaban parte de las vías canónicas enriquecidas de forma más significativa, con el objetivo de mostrar de forma visual cómo estaban regulados estos genes entre las diferentes muestras.

18. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los resultados se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5.0.

Todos los resultados están expresados como la media \pm SEM (*Standard error of the mean*). Los análisis estadísticos se realizaron usando el test *t-Student* para la comparación de dos grupos, o análisis de la varianza unidireccional (*one-way ANOVA*) para la comparación de 3 o más grupos. Cuando el análisis ANOVA mostró diferencias significativas, se realizaron comparaciones por pares entre las medias mediante el test *post-hoc Newman-Keuls*.

Se consideró la existencia de significancia estadística con valores de p -value $<$ 0,05.

RESULTADOS

RESULTADOS**1. La haploinsuficiencia de *Zeb1* retrasa el desarrollo del cáncer de páncreas inducido por *Kras*.**

Zeb1 es un factor de transcripción clave durante el desarrollo embrionario⁹⁸, por lo que los ratones con delección homocigota de *Zeb1* no son viables y mueren de forma prenatal. Por esta razón, para estudiar la participación de *Zeb1* en el desarrollo del cáncer de páncreas utilizamos ratones con expresión heterocigota de *Zeb1* (*Zeb1*^{+/-}). El páncreas de estos ratones presentaban apariencia histológica normal.

Así pues, para estudiar el efecto de la deficiencia de *Zeb1* en el desarrollo tumoral pancreático, generamos dos modelos murinos: *KPC;Z^{+/+}* y *KPC;Z^{+/-}*. Ambos modelos son portadores de mutaciones heterocigotas en *Kras* (*LSL-Kras^{G12D}*) y en *p53* (*p53^{R172H/+}*) condicionadas a las células progenitoras del páncreas a través del alelo *Pdx1-Cre* (ratones *KPC*); la diferencia entre ambos modelos murinos recae en que los ratones *KPC;Z^{+/+}* tienen una expresión completa de *Zeb1*, mientras que los *KPC;Z^{+/-}* contienen una mutación inactivadora en un alelo de *Zeb1* que resulta en la expresión heterocigota. El grupo control está formado por ratones sin ningún tipo de mutación en los genes mencionados anteriormente. Los ratones se sacrificaron a las 20 semanas de edad y se obtuvo el páncreas para estudio anatomopatológico.

El análisis de la tinción con H&E mostró que el páncreas de los ratones *KPC;Z^{+/+}* presentaba en todos los casos ACDP, que afectaba de forma difusa la práctica totalidad de la glándula. Estos tumores eran mayoritariamente bien diferenciados y presentaban abundante componente desmoplásico. Sin embargo, el páncreas de los ratones *KPC;Z^{+/-}* mostraron lesiones MAD y PanINs de bajo grado (75% del páncreas) alternadas con tejido normal (25% restante), todo ello inmerso en una extensa reacción estromal. Los páncreas *KPC;Z^{+/-}* no mostraron lesiones PanIN de alto grado ni adenocarcinoma ductal en ningún caso (Figura 20 A y B).

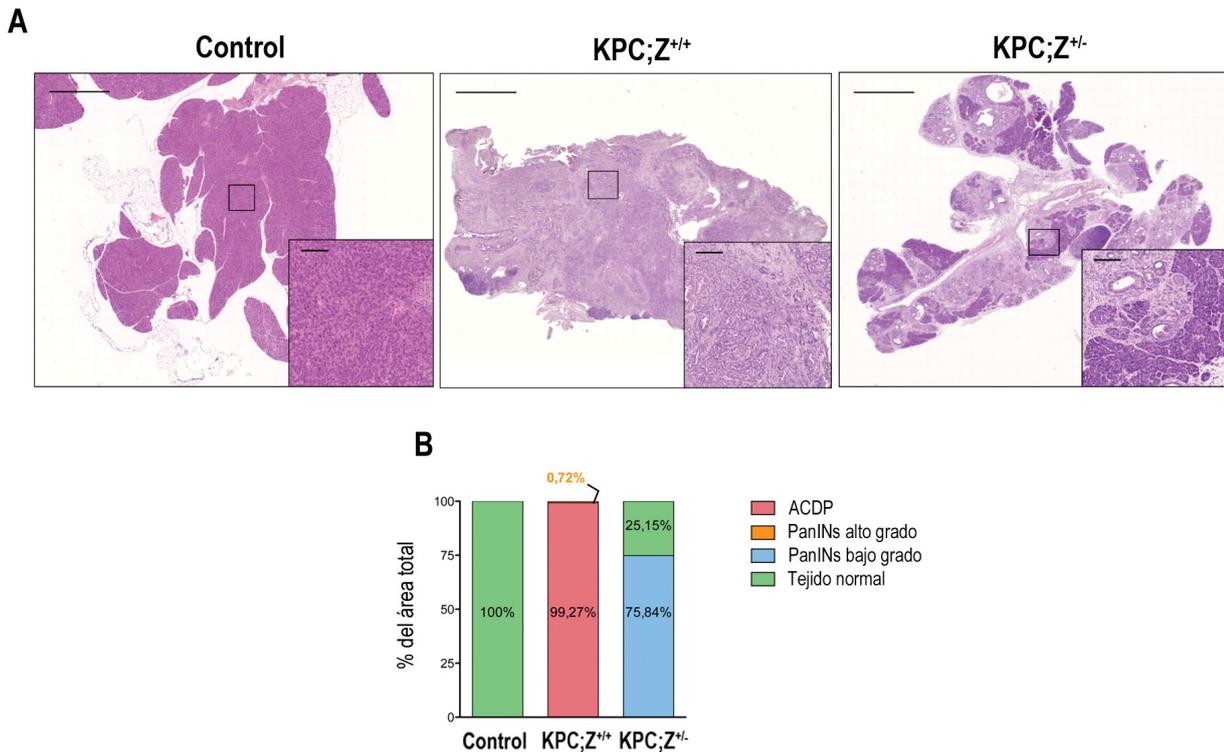


Figura 20. La delección monoalélica de Zeb1 retrasa el desarrollo del ACDP en ratones *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{R12H/+}*.

(A) Imágenes representativas de tinciones de H&E de páncreas de ratones Control, KPC;Z^{+/+} (n=5) y KPC;Z^{+/-} (n=4) sacrificados a las 20 semanas de edad y **(B)** cuantificación del porcentaje de área correspondiente a tejido normal, PanINs de bajo grado, PanINs de alto grado, y ACDP. Los recuadros muestran una imagen aumentada de las secciones de tejido seleccionadas. Barra de escala: 2000µm para las imágenes principales y 200µm para las secciones aumentadas. Las barras en el gráfico muestran la media del % de área que conforma la sección pancreática de cada ratón.

La tinción con Alcian Blue, que permite identificar la mucina intracelular que caracteriza las lesiones precursoras de cáncer de páncreas^{1,200}, mostró en los páncreas KPC;Z^{+/-} una afectación extensa de lesiones MAD y PanIN. Sin embargo, el contenido de células con diferenciación mucinosa resultó ser escaso y disperso en los páncreas KPC;Z^{+/+} (Figura 21A). Esta observación corrobora un menor grado de lesiones pancreáticas en los ratones KPC;Z^{+/-} que en los KPC;Z^{+/+}. A continuación analizamos la expresión de CK19, un marcador epitelial de diferenciación ductal expresado en las lesiones precursoras y cancerosas de páncreas. Tanto las lesiones precursoras en los páncreas KPC;Z^{+/-} como el adenocarcinoma en los páncreas KPC;Z^{+/+} mostraron expresión de CK19, demostrando que la haploinsuficiencia de *Zeb1* no modifica la transformación ductal que da origen a las lesiones. La

cuantificación del área de estructuras ductales positivas para CK19 fue también menor en los páncreas KPC;*Z*^{-/-} que en los KPC;*Z*^{+/+}, lo cual demuestra una transformación neoplásica menos extensa en los ratones deficientes en *Zeb1* (Figura 21B). Por último, analizamos el índice de proliferación celular del tejido pancreático mediante la inmunotinción nuclear con Ki67. La cuantificación de núcleos positivos para Ki67 mostró un índice de proliferación 4 veces menor en los ratones KPC;*Z*^{-/-} que en los KPC;*Z*^{+/+} (Figura 21C). Al analizar la distribución de Ki67 en los diferentes tipos celulares, ésta se concentraba en las células neoplásicas y del estroma en los páncreas KPC;*Z*^{+/+}, mientras que en los páncreas KPC;*Z*^{-/-} la presencia de Ki67 se limitaba a las células del estroma pero era apenas evidente en las células que conformaban los PanINs.

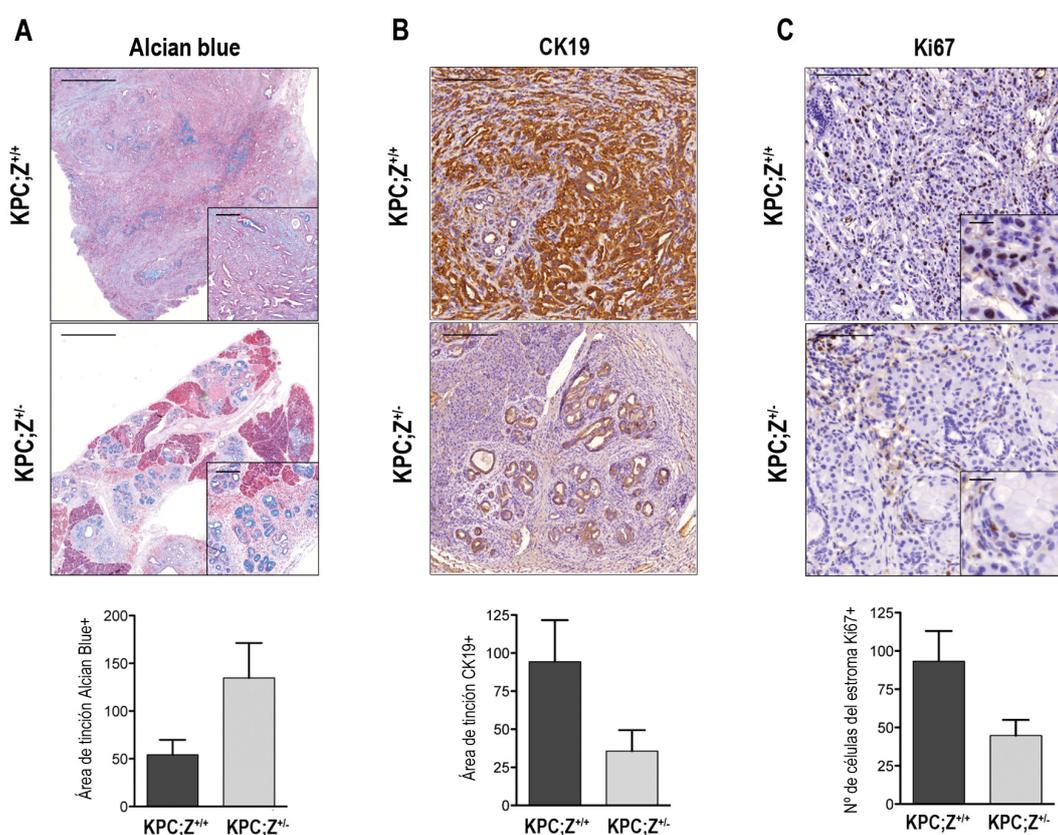


Figura 21. Características histológicas de los páncreas de ratones KPC con expresión completa y deficiente de *Zeb1*.

(A) Imágenes representativas de tinciones de Alcian Blue (barra de escala: 1000µm para las imágenes principales y 200µm para las secciones aumentadas), (B) de CK19 (barra de escala: 200µm) y (C) de Ki67 (barra de escala: 100µm para las imágenes principales y 50µm para las secciones aumentadas) en páncreas de ratones KPC;*Z*^{+/+} (n=5) y KPC;*Z*^{-/-} (n=4) sacrificados a las 20 semanas de edad. La cuantificación relativa de cada tinción se muestra en los gráficos situados debajo de las imágenes. Para las tinciones de Alcian Blue y CK19, las barras

representan la media \pm SEM del área con tinción positiva en al menos 5 campos por sección de cada páncreas. En el caso de Ki67, la cuantificación corresponde a la cantidad de núcleos positivos en al menos 5 campos (20x) por sección de cada páncreas.

Estos resultados demuestran que la heterocigosis de *Zeb1* condiciona un menor grado de progresión en tumores inducidos por mutaciones en *Kras* y *p53*.

2. *Zeb1* se expresa predominantemente en los miofibroblastos del estroma asociados a lesiones preneoplásicas y neoplásicas.

Tras demostrar que la expresión de *Zeb1* contribuye al desarrollo tumoral, planteamos evaluar el patrón de expresión de *Zeb1* en el páncreas de los ratones KPC;*Z*^{+/+} y KPC;*Z*^{+/-}.

Las tinciones de *Zeb1* mostraron una inmunopositividad nuclear muy abundante en los páncreas de los ratones KPC;*Z*^{+/+}, que se vio reducida en aproximadamente un 50% en los páncreas KPC con delección heterocigota de *Zeb1* (Figura 22 A y B). Por otro lado, además de cuantificar los núcleos positivos analizamos la intensidad de tinción nuclear. Con este fin, clasificamos los núcleos positivos en tres categorías: 1+: núcleos de intensidad débil; 2+: núcleos de intensidad media; 3+: núcleos de elevada intensidad. Con los datos de positividad nuclear obtenidos, realizamos un cálculo semi-cuantitativo mediante *H-score* del nivel de intensidad de tinción total del tejido, según la siguiente fórmula²⁰¹:

$$[1 \times (\% \text{ células } 1+) + 2 \times (\% \text{ células } 2+) + 3 \times (\% \text{ células } 3+)]$$

Este análisis reveló una menor cantidad de núcleos de elevada intensidad de tinción en los páncreas KPC;*Z*^{+/-} (14% frente al 54% en los KPC;*Z*^{+/+}) y una proporción mayor de núcleos de intensidad débil (49% frente a 18% en los KPC;*Z*^{+/+}). Estos resultados muestran que la delección heterocigota de *Zeb1* resulta no sólo en una reducción de la cantidad de células que expresan este factor de transcripción, sino también en una menor carga nuclear de *Zeb1* en las células positivas. (Figura 22C)

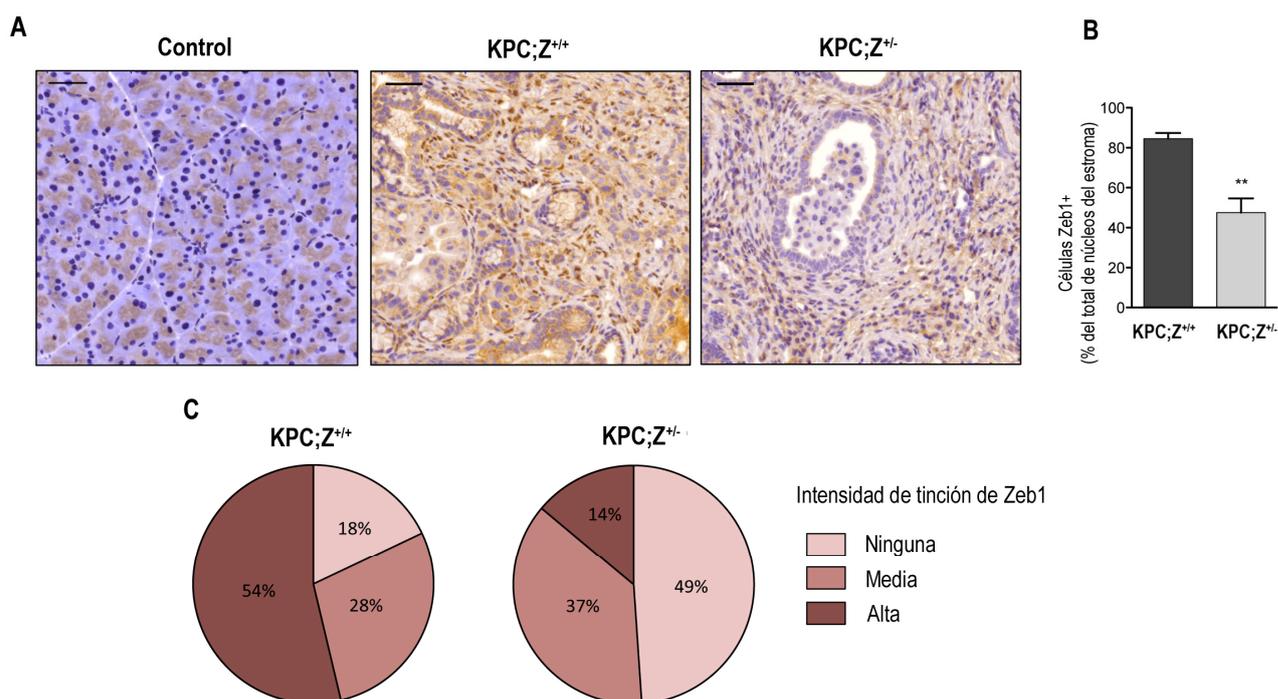


Figura 22. La heterocigosis de Zeb1 condiciona una menor expresión de Zeb1 en las lesiones pancreáticas desarrolladas en ratones KPC.

(A) Imágenes representativas de la inmunotinción de Zeb1 en las secciones pancreáticas de los ratones KPC;Z^{+/+} (n=5) y KPC;Z^{+/-} (n=4) de 20 semanas (barra de escala: 100µm). Representaciones gráficas de (B) la inmunopositividad y (C) la intensidad de tinción nuclear de Zeb1 en el páncreas de ratones KPC;Z^{+/+} (n=5) y KPC;Z^{+/-} (n=4) de 20 semanas. En ambos casos se cuantificaron al menos 5 campos aleatorios por sección de cada ratón. Las barras representan la media ± SEM de tinción observada en los campos cuantificados por sección, ** $p < 0.01$ (*t-Student*). Los valores de los gráficos de sectores representan la media del porcentaje de células para cada intensidad de los campos cuantificados por cada ratón.

Independientemente de cual fuese la dotación genética del tejido, la mayor parte de células positivas formaban parte del estroma. Una gran proporción de estas células del estroma se identificaron morfológicamente como fibroblastos (células con morfología *spindle shape* y núcleo ovalado) (Figura 23A), mientras que una pequeña cantidad correspondía a macrófagos, células endoteliales y linfocitos (Figura 23 B-D). De manera puntual, se identificó tinción nuclear de Zeb1 en las células tumorales de los páncreas KPC;Z^{+/+} (Figura 23E) y en las lesiones precursoras de los KPC;Z^{+/-} (Figura 23F).

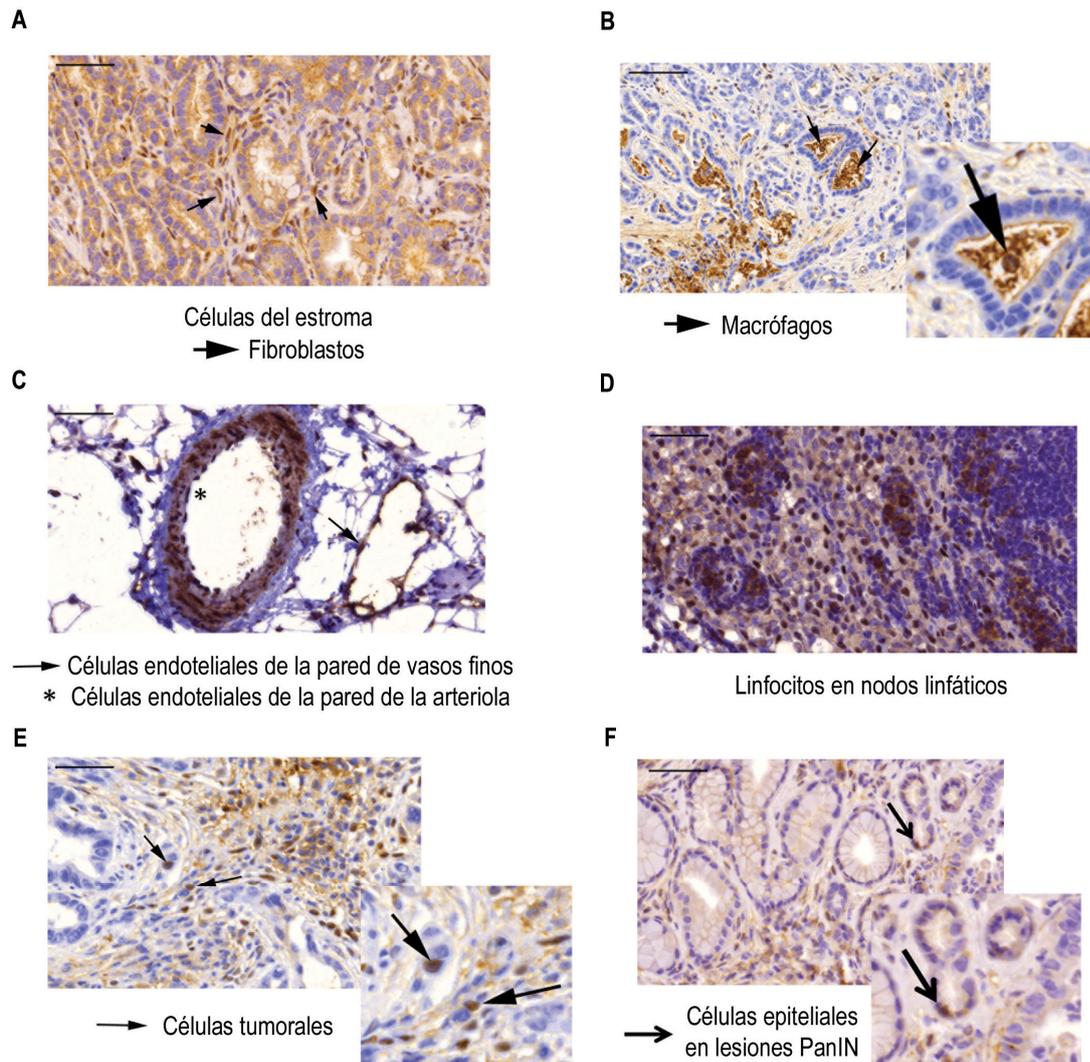


Figura 23. Expresión de Zeb1 en diferentes tipos celulares de páncreas de ratones KPC;Z^{+/+} y KPC;Z^{+/-}.

Tinciones por inmunohistoquímica de Zeb1 en páncreas de ratones KPC;Z^{+/+} y KPC;Z^{+/-} de 20 semanas. Imágenes representativas que muestran núcleos positivos para Zeb1 en (A) fibroblastos del estroma, (B) macrófagos, (C) células endoteliales, (D) linfocitos, (E) células neoplásicas de ratones KPC;Z^{+/+}, (F) en células epiteliales de lesiones PanINs de ratones KPC;Z^{+/-}. Barra de escala: 100µm para las imágenes principales y 50µm para las secciones aumentadas.

Dado que la población celular mayoritaria del estroma fibroinflamatorio pancreático corresponde a miofibroblastos, planteamos identificarlos mediante co-inmunofluorescencia de αSMA y Zeb1 (Figura 24A, paneles superiores). Alrededor de un 66% de las células del estroma pancreático de los tumores KPC;Z^{+/+} co-localizaron αSMA y Zeb1 (αSMA+/Zeb1+, señaladas en la figura con una flecha), mientras que el

34% restante de núcleos positivos para Zeb1 correspondían a células no miofibroblásticas (α SMA-/Zeb1+, señaladas en la figura con una punta de flecha) (Figura 24B). Sin embargo, tal y como ya se observó en las tinciones por inmunohistoquímica de Zeb1 (Figura 22A), los páncreas KPC; $Z^{-/-}$ mostraron un menor contenido en células positivas para Zeb1 que los KPC; $Z^{+/+}$, y ello se correlacionó con una clara disminución en el contenido en miofibroblastos (Figura 24A, paneles inferiores). La distribución observada de la co-tinción de α SMA y Zeb1 (α SMA+/Zeb1+; α SMA+/Zeb1-; α SMA-/Zeb1+; α SMA-/Zeb1-) revela una composición variada de células que conforman el estroma, que incluye miofibroblastos α SMA+ (también conocidos como myCAFs²⁰²), fibroblastos α SMA- (o iCAFs²⁰²), células del sistema inmune y células neoplásicas que a través de la transición epitelio-mesénquima se han desprendido del agregado de células tumorales.

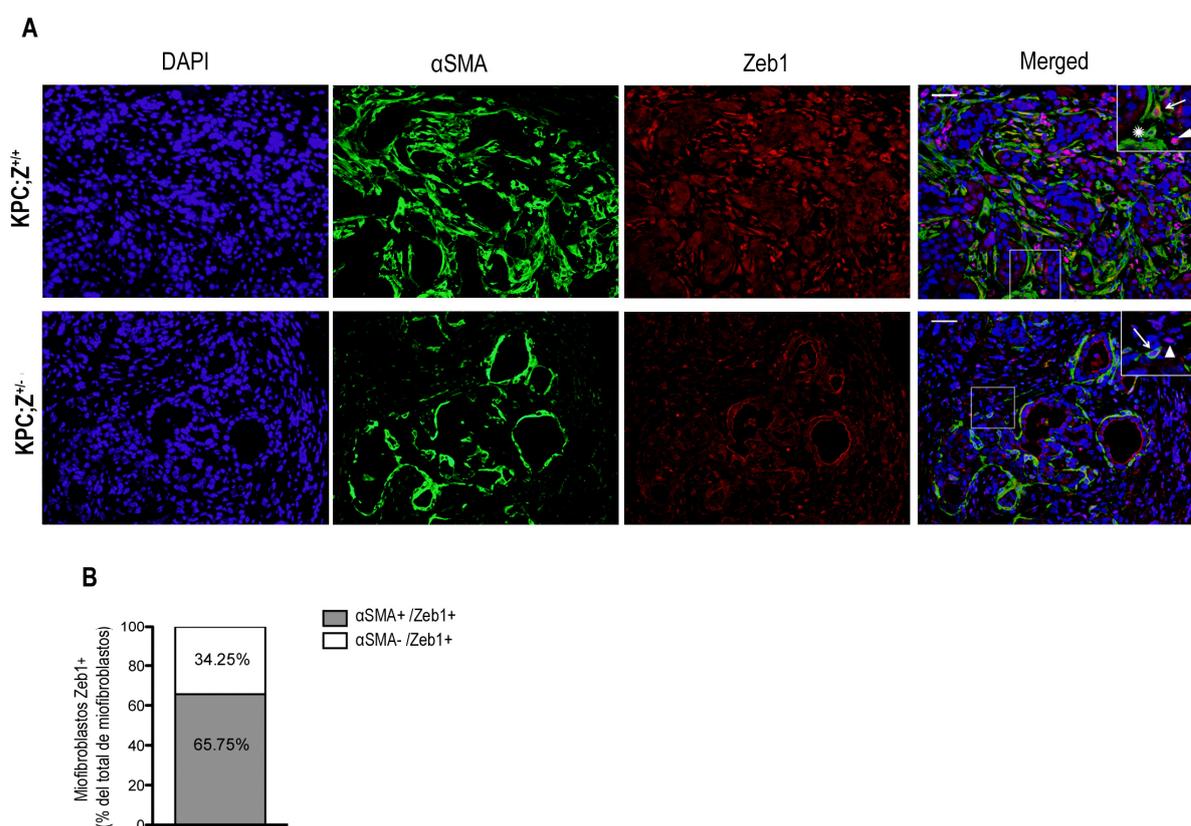


Figura 24. La haploinsuficiencia de Zeb1 condiciona una menor densidad de miofibroblastos y de células positivas para Zeb1 en las lesiones pancreáticas desarrolladas en ratones KPC.

(A) Imágenes representativas de tinciones mediante co-inmunofluorescencia de α SMA (verde) y Zeb1 (rojo) de secciones pancreáticas de ratones KPC; $Z^{+/+}$ (n=3) y KPC; $Z^{-/-}$ (n=2) de 20 semanas. Contratinción de los núcleos con DAPI (azul) (barra de escala: 100 μ m para las

imágenes principales y 50µm para las secciones aumentadas). Las flechas señalan los miofibroblastos que expresan Zeb1, las puntas de flecha a las células no miofibroblásticas y positivas para Zeb1 y el asterisco a los miofibroblastos negativos para Zeb1. **(B)** Porcentaje de miofibroblastos del estroma (α SMA+) positivos y negativos para Zeb1 en los tumores KPC; $Z^{+/+}$ de 20 semanas (n=3).

Los resultados obtenidos indican que Zeb1 se expresa mayoritariamente en los miofibroblastos del estroma fibroinflamatorio asociado a lesiones precursoras y cancerosas en el páncreas.

3. La haploinsuficiencia de *Zeb1* retarda la activación del estroma durante la carcinogénesis pancreática inducida por *Kras*.

Los resultados observados en los apartados anteriores muestran que la heterocigosis de *Zeb1* condiciona que los ratones KPC desarrollen lesiones precursoras en lugar de cáncer, y que el estroma contenga una menor cantidad de miofibroblastos. Teniendo en cuenta que la cantidad de miofibroblastos en el estroma tumoral comporta una mayor activación del estroma, y que ello se correlaciona con una mayor agresividad de la enfermedad²⁰³, planteamos evaluar la activación del estroma en los páncreas KPC; $Z^{+/+}$ y KPC; $Z^{+/-}$. Para ello, analizamos el contenido en colágeno (componente de la matriz extracelular y marcador fibrogénico) y el contenido en α SMA (marcador de miofibroblastos). Con el objetivo de determinar el impacto del déficit de Zeb1 en la activación del estroma, con los datos obtenidos se evaluó el Índice de Activación del Estroma (ASI)²⁰³, que se calcula como la relación entre el área de tinción positiva de α SMA y el área positiva de colágeno.

Las tinciones con tricrómico de Mallory revelaron una cantidad de colágeno dos veces superior en los páncreas de los ratones KPC; $Z^{+/-}$ en comparación con los KPC; $Z^{+/+}$, ambos de 20 semanas. Por el contrario, la cantidad de miofibroblastos fue un 50% menor en los páncreas de ratones KPC; $Z^{+/-}$ en comparación con los KPC; $Z^{+/+}$, como muestran las tinciones con α SMA (Figura 25A, paneles centro y derecha). Como consecuencia, el Índice de Activación del Estroma resultó cuatro veces menor en los ratones KPC; $Z^{+/-}$ que en los KPC; $Z^{+/+}$ (Figura 25C), sugiriendo que una reducción parcial de la expresión de Zeb1 es suficiente para alterar el balance fibrocelular del

estroma durante la progresión del cáncer páncreas determinado por la mutación oncogénica de *Kras*.

No obstante, considerando que el estroma sufre una remodelación continua durante la carcinogénesis pancreática²⁰, y que las lesiones PanIN de bajo grado están rodeadas de una red abundante, organizada y compacta de fibras de colágeno⁵⁰, consideramos la posibilidad de que las diferencias que se observan en el estroma pudieran estar causadas por un enlentecimiento de la carcinogénesis en los ratones KPC;Z^{+/-}. Para estudiar esta opción, comparamos los páncreas de ratones KPC;Z^{+/+} de 16 semanas (edad a la cual presentan lesiones precursoras y no cáncer de páncreas) con los páncreas de ratones KPC;Z^{+/-} de 20 semanas; este análisis nos permitió comparar el estroma asociado a lesiones precursoras con independencia de la expresión de Zeb1. Mediante el estudio anatomopatológico de los tejidos teñidos con H&E confirmamos que los páncreas KPC;Z^{+/+} de 16 semanas y los KPC;Z^{+/-} de 20 semanas mostraban únicamente lesiones PanINs de bajo grado y MAD, sin evidencia de lesiones de alto grado ni adenocarcinoma. El estroma asociado a las lesiones precursoras en ambos grupos era rico en colágeno y poco abundante en miofibroblastos (Figura 25A, paneles izquierda y derecha), en comparación con el estroma que acompañaba las lesiones tumorales de los ratones KPC;Z^{+/+} de 20 semanas (Figura 25A, paneles centro), de modo que el ASI resultó equiparable en ratones KPC;Z^{+/+} de 16 semanas y KPC;Z^{+/-} de 20 semanas (Figura 25C).

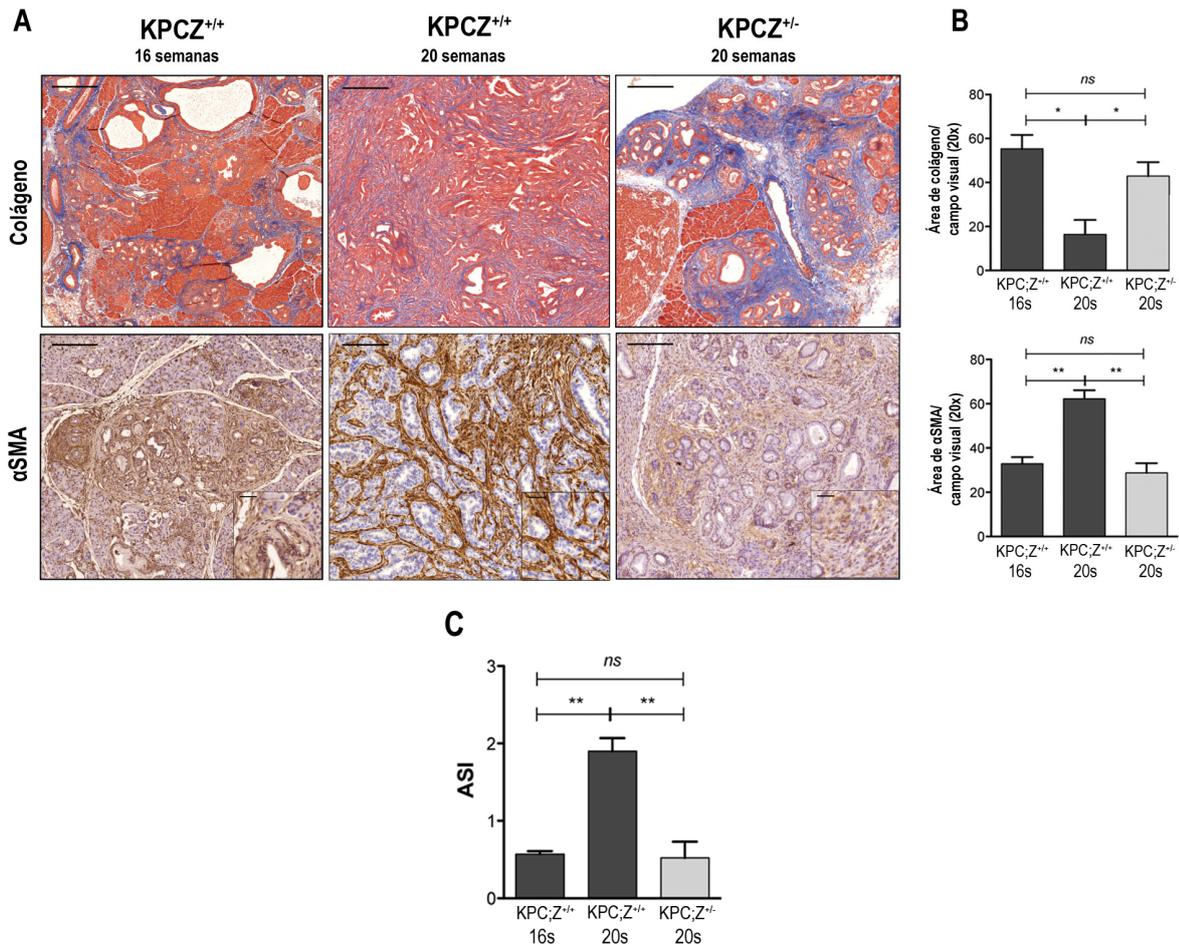


Figura 25. La haploinsuficiencia de Zeb1 resulta en una menor activación del estroma fibroinflamatorio pancreático asociado al desarrollo neoplásico en ratones KPC.

(A) Imágenes representativas de tinciones con tricrómico de Mallory de las fibras de colágeno (paneles superiores, barra de escala: 500 μ m) y de α SMA para la identificación de los miofibroblastos (paneles inferiores, barra de escala: 200 μ m), a partir de secciones pancreáticas de ratones KPC;Z^{+/+} de 16 semanas (n=5), KPC;Z^{+/+} de 20 semanas (n=5) y KPC;Z^{+/-} de 20 semanas (n=4). (B) Cuantificación relativa del área de colágeno y del área de expresión de α SMA en las inmunotinciones realizadas en las secciones pancreáticas mencionadas. (C) Índice de activación del estroma (ASI), calculado como el área de tinción positiva para α SMA dividida por el área de tinción positiva para colágeno. En B y C las barras representan la media \pm SEM de tinción observada en 5 campos aleatorios por sección de cada ratón. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: no significativo (*one-way ANOVA*).

Para confirmar que la heterocigosis de *Zeb1* retarda pero no impide el desarrollo de cáncer en ratones KPC, se extendió el periodo de observación de los ratones KPC;Z^{+/-} a 30 semanas. El análisis anatomopatológico mediante tinción con H&E del tejido pancreático de ratones KPC;Z^{+/-} a las 30 semanas de vida mostró la existencia

de adenocarcinoma ductal con afectación difusa de toda la glándula (Figura 26), confirmándose la hipótesis de que el déficit de Zeb1 enlentece pero no impide el desarrollo de cáncer de páncreas.

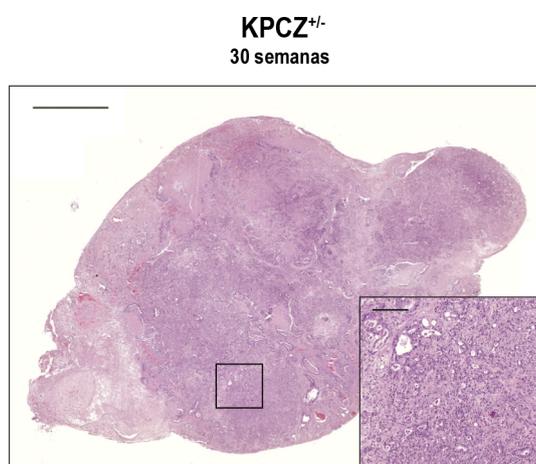


Figura 26. La deficiencia de Zeb1 no impide la formación de ACDP en ratones KPC;^{Z^{-/-}} a largo plazo.

Imagen representativa de tinciones con H&E de páncreas de ratones KPC;^{Z^{-/-}} sacrificados a las 30 semanas de vida (n=3). El recuadro muestra una imagen aumentada de la sección de tejido seleccionada. Barra de escala: 2000 μ m para la imagen principal y 200 μ m para la sección aumentada.

Así pues, estos resultados demuestran que la restricción de Zeb1 no reduce el número de miofibroblastos del estroma fibroinflamatorio, sino que enlentece la evolución oncogénica del estroma pancreático asociada al oncogén *Kras*.

4. Las CEPs con haploinsuficiencia de Zeb1 no promueven el crecimiento tumoral

Los resultados en los apartados previos sugieren que la heterocigosis de *Zeb1* retarda la progresión del cáncer de páncreas en los ratones KPC, principalmente a través de la generación de un estroma menos colaborador con el tumor. Para confirmar si el retraso en el desarrollo tumoral observado en los ratones KPC;^{Z^{-/-}} se debe principalmente a la expresión deficiente de Zeb1 en las CEPs y no en el compartimento epitelial, establecimos un modelo murino de tumores subcutáneos mediante la inyección de células neoplásicas KPC (grupo control), co-inyección células

KPC y CEPs Zeb1^{+/+}, y co-inyección de KPC y CEPs Zeb1^{+/-}. Pasados 20 días de la inyección subcutánea, los tumores derivados de células KPC + CEPs Zeb1^{+/+}, mostraron un volumen significativamente mayor que aquellos formados con células KPC y CEPs Zeb1^{+/-}, mientras que los tumores generados con células KPC + CEPs Zeb1^{+/-} crecieron de forma similar al grupo control (Figura 27 A y B). El peso de los tumores formados por células KPC + CEPs Zeb1^{+/-} fue también significativamente menor que el de los tumores KPC + CEPs Zeb1^{+/+} (Figura 27C).

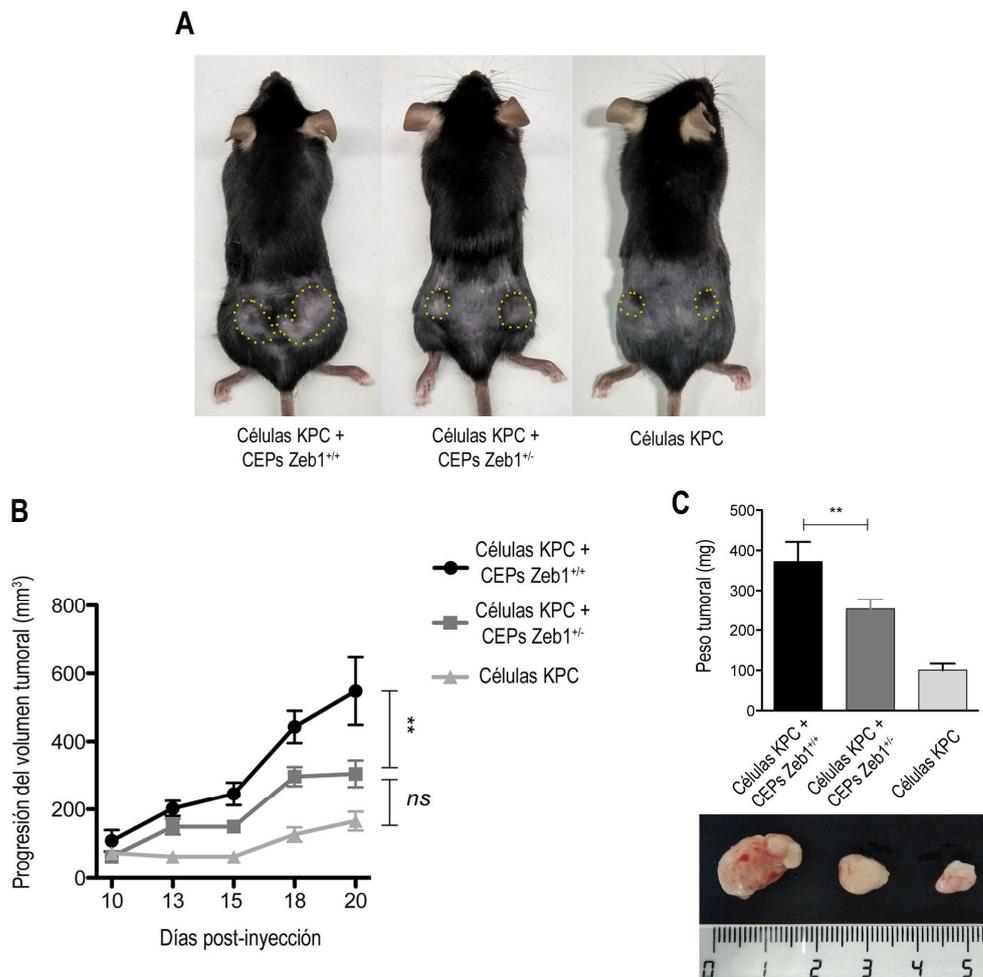


Figura 27. La heterocigosis de Zeb1 en las CEPs retarda el crecimiento tumoral en un modelo murino subcutáneo de cáncer de páncreas.

(A) Imágenes representativas de ratones portadores de tumores pancreáticos subcutáneos generados con células KPC, células KPC + CEPs Zeb1^{+/+} y células KPC + CEPs Zeb1^{+/-}. (B) Gráfico de curvas representando el crecimiento tumoral, basada en el cálculo del volumen mediante medidas bidimensionales de cada tumor en el transcurso de 20 días tras la generación de los tumores. (C) Gráfico de barras representando el peso tumoral e imágenes representativas de los tumores resecados 20 días después de la inyección de células. Los datos en ambas gráficas representan la media ± SEM de 12 tumores (grupo KPC), 11 tumores

(grupo KPC + CEPs $Zeb1^{+/+}$) y 14 tumores (KPC + CEPs $Zeb1^{+/-}$). ** $p < 0.01$, *ns*: no significativo (*one-way ANOVA*).

Estos resultados confirman que las CEPs heterocigotas en *Zeb1* no promueven el crecimiento tumoral.

5. La deficiencia de *Zeb1* en las CEPs condiciona un fenotipo menos activo en estas células.

Para investigar si la expresión de *Zeb1* en los miofibroblastos media su fenotipo activado y sus propiedades protumorales, establecimos cultivos primarios de CEPs a partir de páncreas de ratones $Zeb1^{+/+}$ y $Zeb1^{+/-}$. Para realizar los experimentos, utilizamos únicamente CEPs en el 2^o y 3^{er} pase de cultivo, que es cuando presentan un fenotipo activado de tipo miofibroblástico. Mediante RT-qPCR analizamos cambios a nivel transcripcional en α SMA (*Acta2*), metaloproteinasa 9 (*Mmp9*) y colágeno tipo I (*Col1a1*), marcadores de activación de CEPs.

Para asegurarnos de que las CEPs en cultivo alcanzaran una activación completa similar al fenotipo de los miofibroblastos del microentorno tumoral, fueron tratadas con TGF β 1 recombinante (10 ng/ml) durante las 24 h previas al análisis. La cuantificación de ARNm mostró una reducción del 25% en la expresión de *Zeb1* en las CEPs $Zeb1^{+/-}$ en comparación con las $Zeb1^{+/+}$, tanto en condiciones basales (Figura 28A) como tratadas con TGF β 1 (Figura 28B). La haploinsuficiencia de *Zeb1* no afectó a la expresión de *Acta2*, aunque sí que causó una reducción significativa de *Mmp9* y *Col1a1*, tanto en condiciones basales como en células activadas con TGF β 1. Estos resultados indican que la reducción parcial de *Zeb1* en las CEPs es suficiente para atenuar su fenotipo activado, aunque no para revertir su naturaleza miofibroblástica.

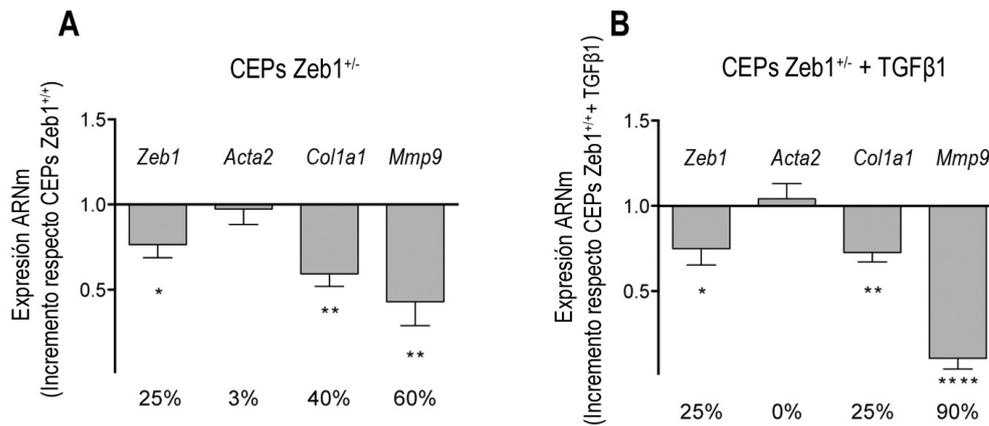


Figura 28. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs afecta a su fenotipo activado pero no revierte su naturaleza miofibroblástica.

Niveles de ARNm de *Zeb1*, *Acta2*, *Col1a1* y *Mmp9* determinados por RT-qPCR en CEPs *Zeb1*^{+/-} en condiciones basales (A) o estimuladas (B) con TGFβ1 recombinante (10 ng/ml) durante las 48h previas al análisis. Valores normalizados respecto al control endógeno β2-microglobulina, y expresados respecto a los niveles de expresión en CEPs *Zeb1*^{+/+}. Las barras representan la media ± SEM (n=4) y los números bajo cada barra expresan la reducción porcentual de cada gen respecto a su expresión en las CEPs *Zeb1*^{+/+}. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ (*t-Student*).

Con el objetivo de conseguir una reducción mayor en la expresión de Zeb1, transfectamos las CEPs *Zeb1*^{+/+} con siARN específico de Zeb1 (si*Zeb1*). La expresión de Zeb1 en las CEPs transfectadas disminuyó un 90% en comparación con las CEPs transfectadas con el siControl (Figura 29A). Como consecuencia, los genes *Acta2*, *Mmp9* y *Col1a1* sufrieron una infraregulación drástica y significativa, lo que indica que la expresión de Zeb1 es necesaria para la activación fenotípica de las CEPs. Ensayos de viabilidad mediante MTS permitieron comprobar que la infraregulación observada en las células transfectadas no se debía a la pérdida de la viabilidad celular como posible efecto tóxico de la lipofectamina durante el proceso de transfección (Figura 29B).

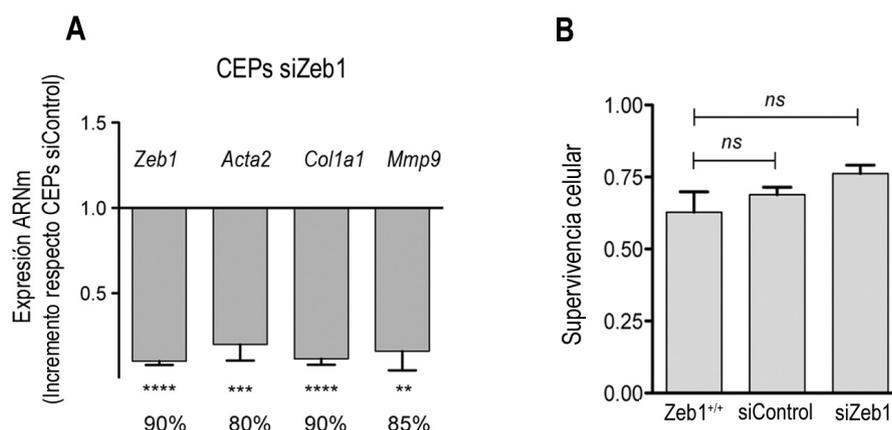


Figura 29. El silenciamiento de Zeb1 en las CEPs inhibe el fenotipo activado sin comprometer su viabilidad.

(A) Niveles de ARNm de *Zeb1*, *Acta2*, *Col1a1*, and *Mmp9* determinados por RT-qPCR en CEPs Zeb1^{+/+} transfectadas con siZeb1. Valores normalizados respecto al control endógeno β 2-microglobulina. Las barras representan la media \pm SEM (n=4) y los números bajo las barras expresan la reducción porcentual de cada gen respecto a su expresión en CEPs Zeb1^{+/+}; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, (*t-Student*). **(B)** Ensayo de viabilidad mediante MTS realizado en las CEPs a las 48 h de la transfección con siZeb1 o siControl. Datos representados respecto a la viabilidad de las CEPs Zeb1^{+/+} sin transfectar; ns: no significativo.

A continuación, investigamos el impacto funcional de la deficiencia de Zeb1 en las CEPs. Para ello, se analizó la migración, proliferación y resistencia a apoptosis de las CEPs en función de su expresión de Zeb1.

Los análisis de migración mostraron que las CEPs con expresión hemicigota de Zeb1 tenían una menor capacidad migratoria respecto a las CEPs Zeb1^{+/+}, tanto en condiciones basales como tratadas con TGF β 1. El tratamiento con TGF β 1 se utilizó a 0h como estímulo pro-migratorio⁵⁸ (Figura 30 A y B). Estos resultados demuestran que el déficit de Zeb1 en las CEPs limita su competencia migratoria.

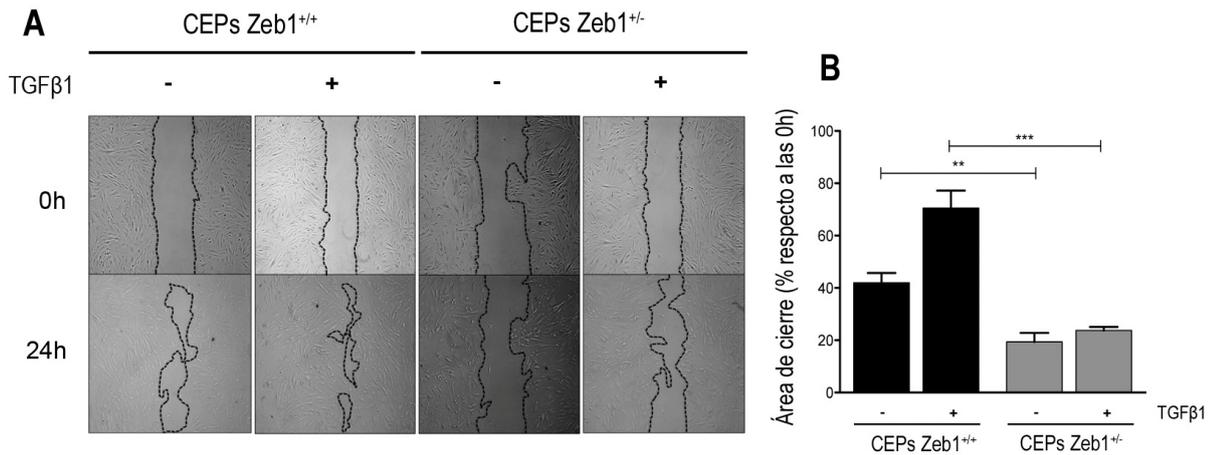


Figura 30. La haploinsuficiencia de Zeb1 disminuye la capacidad migratoria de las CEPs. Las CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-} se sembraron a confluencia alta (95%) y se pre-activaron durante 24h con TGFβ1 recombinante (10 ng/ml). Tras la pre-activación, en el tiempo 0 se realizó una herida central con punta de pipeta y se añadió TGFβ1 (10 ng/ml) o vehículo. Tras 24 h, se analizó el área cerrada en cada condición **(A)** Imágenes representativas obtenidas con microscopio de contraste de fases y **(B)** respectiva cuantificación del área de cierre. Las barras representan la media ± SEM de 4 experimentos independientes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (*t-Student*).

La capacidad de proliferar es otra característica que adquieren las CEPs al activarse⁶⁰. Por otro lado, Zeb1 es un conocido regulador de la proliferación celular⁹⁹. Las CEPs haploinsuficientes en Zeb1 mostraron una proliferación menor que las CEPs con expresión completa de Zeb1, tanto en condiciones basales como expuestas al mitógeno PDGF-BB (2 ng/ml) (Figura 31).

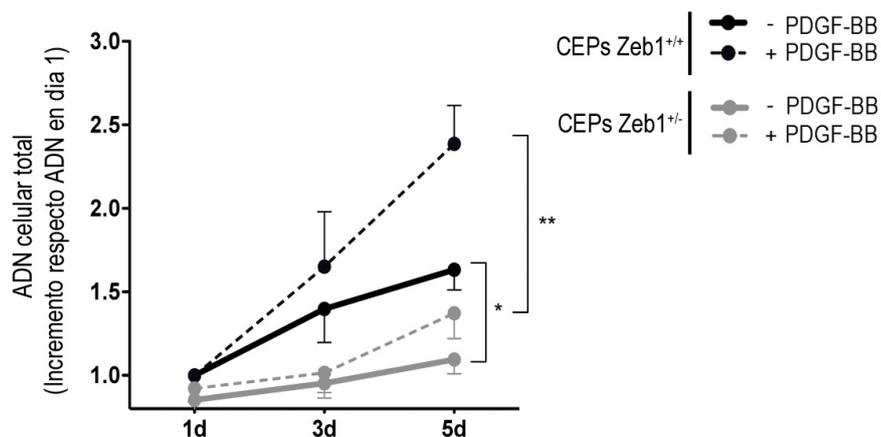


Figura 31. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad proliferativa.

Curvas de proliferación de CEPs $Zeb1^{+/+}$ y $Zeb1^{+/-}$ a 1, 3 y 5 días, tras la exposición al agente mitogénico PDGF-BB (2 ng/ml) o a vehículo. Los datos muestran la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (*one-way ANOVA*).

Como ya se ha mencionado en el apartado de introducción, otra de las características asociadas al fenotipo activado de las CEPs es la adquisición de resistencia a estímulos apoptóticos. Dadas las evidencias descritas hasta el momento del papel de *Zeb1* como regulador de la apoptosis¹⁰⁷, evaluamos si el déficit de *Zeb1* promueve la respuesta apoptótica en las CEPs. Para ello, tratamos las células con dos estímulos pro-apoptóticos ya conocidos: *Tocotrienol Rich Fraction* (TRF, 20 μ M), un activador de la vía intrínseca de la apoptosis²⁰⁴, y TNF α (20 ng/ml) más cicloheximida (CHX, 10 μ g/ml) para estimular la vía apoptótica extrínseca. Como se puede observar en la figura 32, las CEPs hemicigotas en *Zeb1* son más vulnerables a la apoptosis (Figura 32).

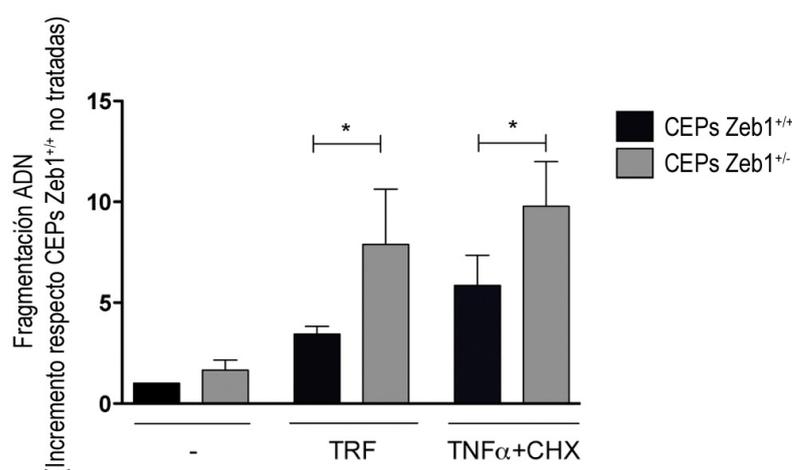


Figura 32. La haploinsuficiencia de *Zeb1* en las CEPs aumenta su vulnerabilidad a la apoptosis.

Cuantificación de la fragmentación de ADN mediante test de ELISA como indicador de muerte por apoptosis en CEPs $Zeb1^{+/+}$ y $Zeb1^{+/-}$, en respuesta al tratamiento con TRF 20 μ M o con TNF α (20 ng/ml) + CHX (10 μ g/ml) durante 48h. Las barras indican la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ (*one-way ANOVA*).

Estos resultados indican que *Zeb1* promueve el estado de activación de las CEPs, y que la haploinsuficiencia de *Zeb1* comporta un fenotipo más quiescente.

6. Las CEPs haploinsuficientes en *Zeb1* muestran un perfil protumoral limitado.

A continuación, evaluamos si la restricción de *Zeb1* en las CEPs compromete sus propiedades protumorales mediante análisis de su capacidad para promover la migración, invasión y proliferación de las células neoplásicas. Con la intención de plasmar la heterogeneidad que caracteriza el cáncer de páncreas utilizamos dos líneas celulares murinas de páncreas con fenotipos muy diferentes: *Emyc-3*, de fenotipo mesenquimal (morfología fibroblastoide) y con elevada expresión de *Zeb1*, y *Panc02*, de fenotipo epitelial (morfología cuboidal) y con baja expresión de *Zeb1* (Figura 33).

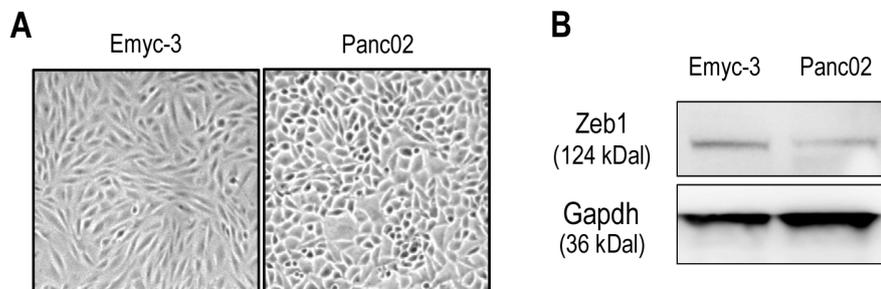


Figura 33. Morfología y expresión de *Zeb1* de las líneas celulares *Emyc-3* y *Panc02*.

(A) Imágenes obtenidas con microscopio de contraste de fases que muestran la morfología de las líneas celulares tumorales *Emyc-3* y *Panc02*. (B) Análisis mediante Western blot de la expresión proteica de *Zeb1* en ambas líneas celulares. La expresión de *Gapdh* se utilizó como control endógeno de carga.

Los ensayos de migración mostraron que el MC de las CEPs *Zeb1*^{+/-} aumentó de forma significativa la migración de ambas líneas neoplásicas en comparación con el medio de cultivo control. Sin embargo, este efecto pro-migratorio fue prácticamente nulo al tratar las células neoplásicas con MC de CEPs *Zeb1*^{+/-} (Figura 34 A y B).

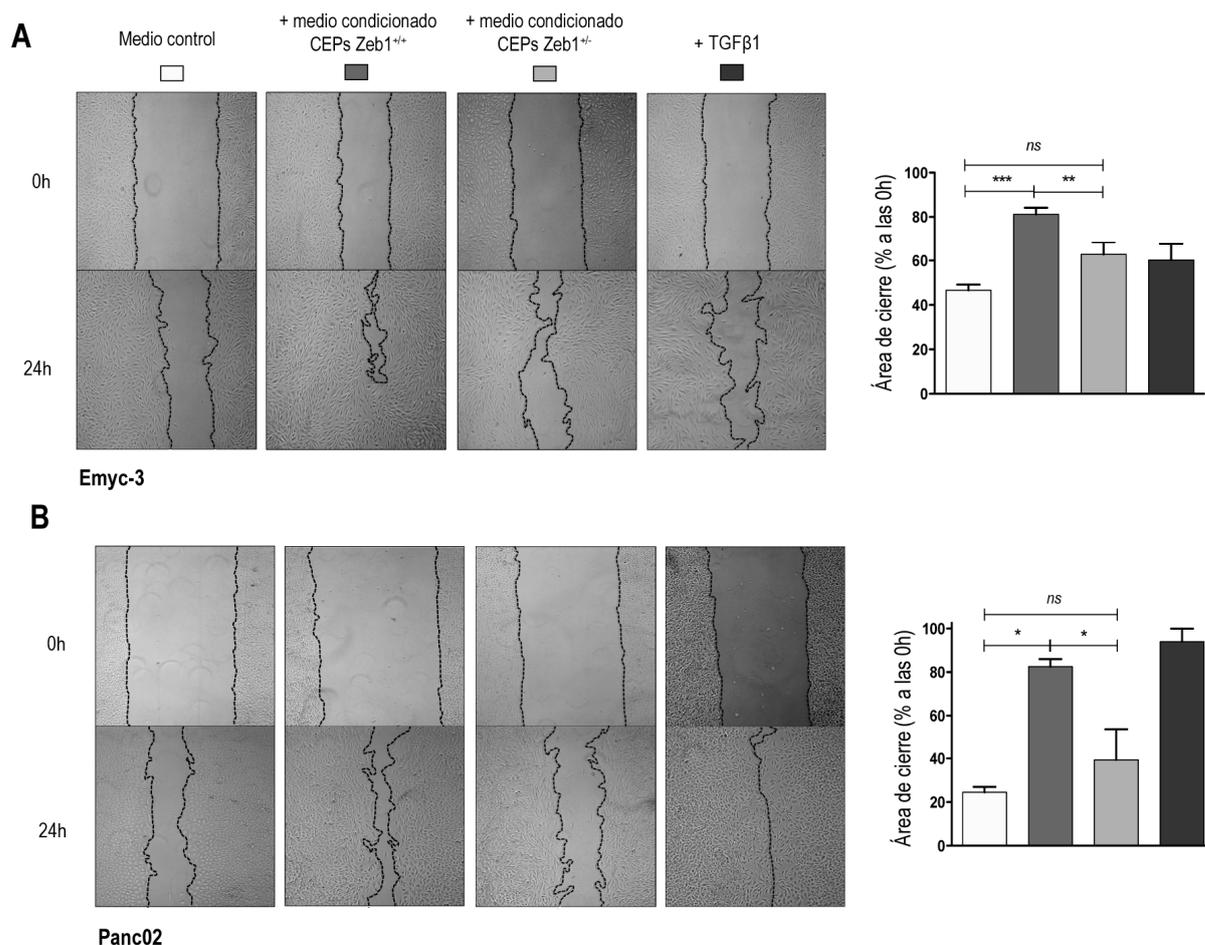


Figura 34. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad pro-migratoria.

Migración de **(A)** Emyc-3 y **(B)** Panc02 en respuesta a medio condicionado de CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-}. Se utilizó TGFβ1 (10 ng/ml) como control positivo. Paneles de la izquierda: imágenes representativas obtenidas con un microscopio de contraste de fases. Paneles de la derecha: correspondiente cuantificación del área de cierre para cada condición. Las barras indican la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: no significativo (*one-way ANOVA*).

Para evaluar si la expresión de Zeb1 en las CEPs media su actividad pro-invasiva en las células neoplásicas, llevamos a cabo experimentos de invasión en Matrigel[®], que tiene una composición rica en proteínas de la matriz extracelular y se utiliza comúnmente para mimetizarla. Para ello, las líneas neoplásicas Emyc-3 y Panc02 se sembraron sobre el Matrigel[®] y se cultivaron durante 48h con MC de CEPs con alta, media y baja expresión de Zeb1 (Zeb1^{+/+}, Zeb1^{+/-} y siZeb1 respectivamente). Al final del experimento, se contabilizó el número de células que habían degradado y atravesado la matriz extracelular. El MC de las CEPs Zeb1^{+/+} estimuló significativamente la capacidad invasiva de ambas líneas neoplásicas respecto a las

CEPs cultivadas en medio control, mientras que este efecto fue prácticamente nulo al exponer las células a MC de CEPs *Zeb1*^{+/-} y *siZeb1* (Figura 35 A y B). Se utilizó TGFβ1 (10 ng/ml) como control positivo pro-migratorio y pro-invasivo, el cual resultó ser claramente efectivo en las células Panc02, mientras que no tuvo ningún efecto sobre las Emyc-3; esta diferencia podría ser debida a algún defecto en la vía de señalización de TGFβ1 o de sus receptores.

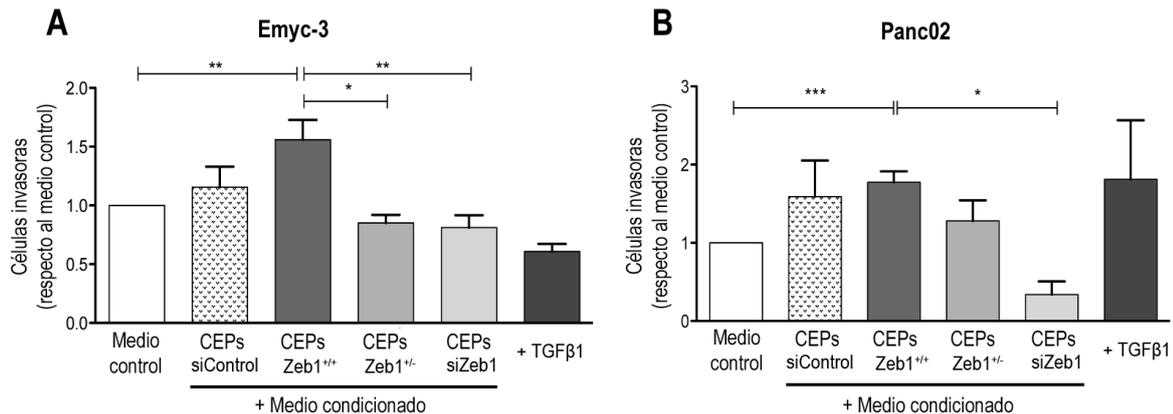


Figura 35. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad pro-invasiva.

Análisis de la invasión de (A) Emyc-3 y (B) Panc02 a través de Matrigel[®] cultivadas en medio de cultivo control y medio condicionado de CEPs *Zeb1*^{+/+}, *Zeb1*^{+/-}, *siZeb1* y *siControl*. Se utilizó TGFβ1 (10 ng/ml) como control positivo. Los datos representan el número de células que han atravesado la capa de Matrigel[®] en cada condición respecto al medio control. Las barras indican la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (*one-way* ANOVA).

Finalmente, estudiamos si la expresión de Zeb1 en las CEPs activadas media su capacidad de promover la proliferación de las células neoplásicas. Las Emyc-3 cultivadas en MC de CEPs *Zeb1*^{+/+} mostraron una mayor proliferación que las cultivadas en medio control; sin embargo, este efecto fue significativamente menor en células expuestas a MC de CEPs *Zeb1*^{+/-} (Fig. 36).

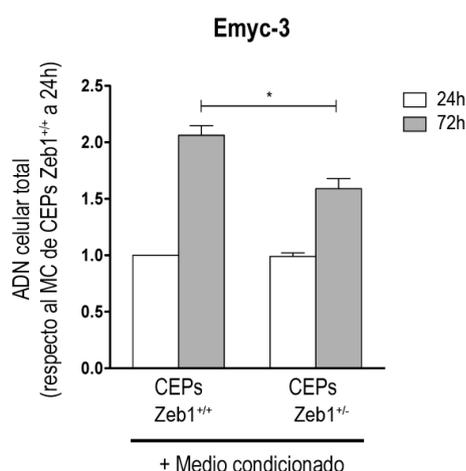


Figura 36. La haploinsuficiencia de Zeb1 en las CEPs limita su capacidad de promover la proliferación en las células neoplásicas.

Análisis de la proliferación celular mediante cuantificación por fluorimetría de la cantidad de ADN en las células Emyc-3 tras 24 h y 72 h de tratamiento con MC de CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-}. Datos expresados respecto a los valores de ADN de Emyc-3 tratadas con MC de CEPs Zeb1^{+/+} a 24 h. Las barras indican la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ (one-way ANOVA).

Estos resultados demuestran la participación de Zeb1 en fomentar las propiedades protumorales de las CEPs, independientemente de su nivel de expresión en las células neoplásicas.

Por otro lado, investigamos si el efecto protumoral de las CEPs dependiente de Zeb1 ocurre desde los estadios más iniciales de la transformación oncogénica. Para ello, analizamos la formación de MAD en cultivos primarios de células acinares, aisladas del páncreas de ratones con mutación oncogénica en *Kras* condicionada al páncreas mediante el alelo *Pdx1-Cre* (ratones KC: *LSL-Kras^{G12D};Pdx1-Cre*). Las células acinares fueron incluidas en una matriz tridimensional de Matrigel[®] y tratadas durante 72 h con MC de CEPs Zeb1^{+/+}, MC de CEPs Zeb1^{+/-}, EGF (control positivo inductor de *Kras* y por consiguiente de MAD en células portadoras de *Kras* mutado) o el vehículo (condición control). Como se puede observar en la figura 37, el MC de las CEPs con expresión completa de Zeb1 promovió de forma significativa la metaplasia ductal de las células acinares, mientras que la formación de estructuras ductales en respuesta a MC de CEPs Zeb1^{+/-} se redujo al nivel basal observado en las células acinares expuestas a medio de cultivo control (Figura 37 A y B).

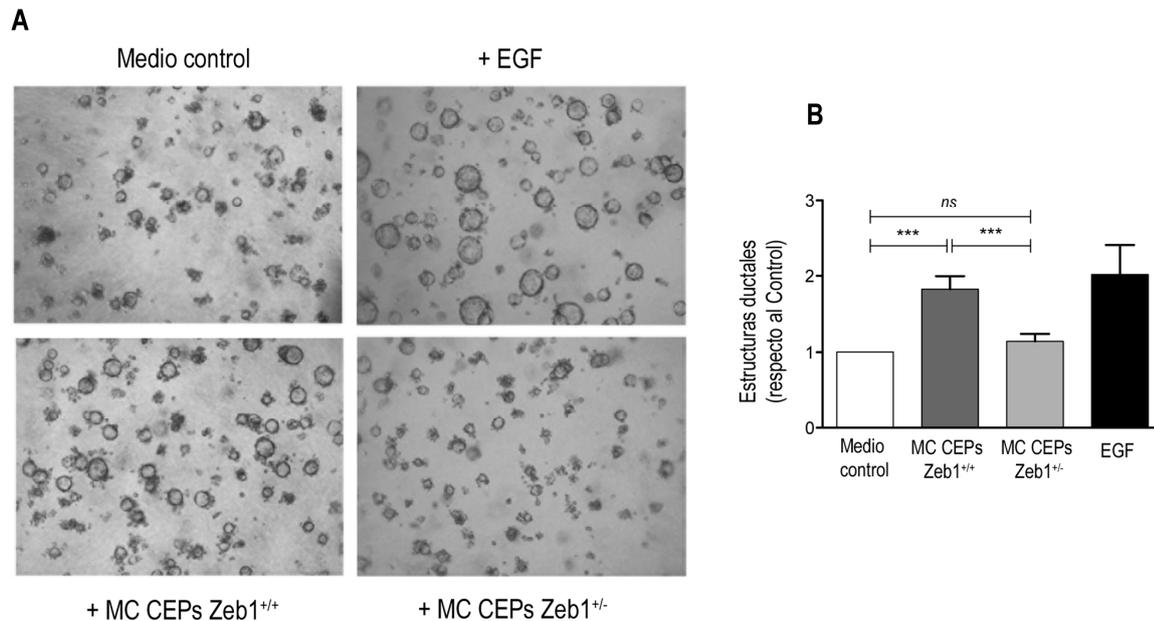


Figura 37. La expresión de Zeb1 en las CEPs induce MAD en células acinares.

Formación de estructuras ductales en células acinares en respuesta al MC de CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-}. EGF (50 ng/ml) se utilizó como control positivo. **(A)** Imágenes representativas obtenidas con microscopio de contraste de fases de cultivos primarios de células acinares cultivadas en Matrigel[®] durante 72 h. **(B)** Correspondiente cuantificación del número de estructuras ductales para cada condición. Los resultados se expresan respecto al número de estructuras ductales en condiciones basales. Las barras indican la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. *** $p < 0.001$, ns: no significativo (*one-way ANOVA*).

Estos resultados indican que las CEPs promueven la MAD en células acinares portadoras del oncogén *Kras*, y este efecto es promovido por mecanismos no autónomos dependientes de Zeb1 en las CEPs. Estos datos refuerzan los resultados *in vivo* descritos en apartados anteriores que mostraban cómo la deficiencia de Zeb1 en las CEPs se asocia a una evolución retardada de la oncogénesis pancreática inducida por *Kras*.

7. Zeb1 en las CEPs promueve la activación de Ras desde estadios iniciales de la enfermedad.

La actividad oncogénica de *Kras* es crítica para el desarrollo del ACDP^{34,144,205}. Existe una gran variedad de factores solubles que estimulan la actividad de *Kras* (como EGF, TGF α , LPS entre otros), muchos de los cuales se encuentran de forma

abundante en el microentorno tumoral e inflamatorio²⁰⁵; concretamente, las CEPs generan una gran variedad de mediadores solubles con efectos protumorales^{40,68}. Además, en apartados anteriores hemos demostrado que Zeb1 es un mediador clave de activación de las CEPs. Dado que la activación de las CEPs y la existencia del oncogén *Kras* son dos eventos que ocurren de manera muy precoz durante la oncogénesis pancreática, nos planteamos la posibilidad de que las CEPs puedan activar *Kras* en células acinares (precursoras del ACDP) y que tal efecto pueda estar mediado por la expresión de Zeb1 en las CEPs.

Para realizar los experimentos que resolvieran esta cuestión, utilizamos células acinares portadoras de la mutación oncogénica de *Kras*^{G12D} obtenidas del páncreas de ratones KC (*Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D}) de 8 a 10 semanas de edad. Estas células se trataron durante 15 minutos con medio de cultivo control, con MC de CEPs Zeb1^{+/+} o con MC de CEPs Zeb1^{+/-}, para después analizar mediante Western blot los niveles proteicos de Ser473Akt, un mediador bajo el control de PI3K en la ruta de señalización de *Kras*. El MC de las CEPs con expresión completa de Zeb1 indujo un incremento del 50% en la fosforilación de Akt en las células acinares, mientras que el incremento fue nulo y comparable al medio de cultivo control en las células tratadas con MC de CEPs heterocigotas para *Zeb1* (Figura 38 A y B).

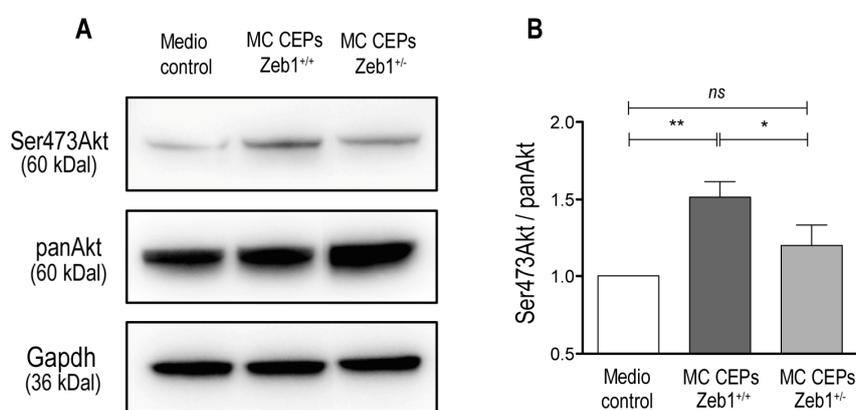


Figura 38. La expresión de Zeb1 en las CEPs media de manera paracrina la fosforilación de Akt en las células acinares.

(A) Análisis por Western blot y (B) cuantificación correspondiente de la fosforilación de Akt y de Akt total en las células acinares expuestas a medio de cultivo control, y a MC de CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-} durante 48 h. Como control endógeno de carga se utilizó Gapdh. Los valores relativos de la cuantificación de Ser473Akt se normalizaron respecto a los valores de panAkt. Las barras de la gráfica indican la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: no significativo (*one-way* ANOVA).

Estos resultados sugieren que la expresión deficiente de Zeb1 en las CEPs merma su colaboración con el compartimento acinar en el inicio de la transformación oncogénica a través de la inhibición de la vía oncogénica de Kras en las células acinares. Estas evidencias amplían los resultados *in vivo* e *in vitro* mostrados previamente, que demuestran la contribución de Zeb1 en las CEPs en promover la formación y el desarrollo tumoral inducido por Kras mutado.

Teniendo en cuenta que la activación y señalización de Kras debe ser continuada para que se dé el inicio y progresión del ACDP, también analizamos el efecto del MC de las CEPs en células neoplásicas de páncreas. Para ello utilizamos dos líneas celulares neoplásicas (KPC y KPC1) generadas a partir de tumores pancreáticos de ratones KPC;*Z^{+/+}* de 20 semanas, de manera que las células obtenidas eran portadoras de la mutación oncogénica de *Kras^{G12D}*. Las células neoplásicas se cultivaron durante 48 h con MC de CEPs *Zeb1^{+/+}* y *Zeb1^{+/-}*, y en ellas se analizaron los niveles proteicos de Ser473Akt. Como se observa en la figura 39, el MC de CEPs *Zeb1^{+/+}* indujo un incremento muy significativo en la fosforilación de Akt de ambas líneas celulares respecto a las células cultivadas en medio de cultivo control, mientras que este aumento fue menor cuando el MC provenía de CEPs haploinsuficientes en *Zeb1* (Figura 39 A y B). Las dos líneas celulares respondieron de la misma forma al tratamiento con MC, por lo que agrupamos los resultados y las nombramos de forma general “KPC”. Estos resultados indican que la expresión de Zeb1 en las CEPs media un efecto paracrino inductor de la actividad de Kras en las células neoplásicas.

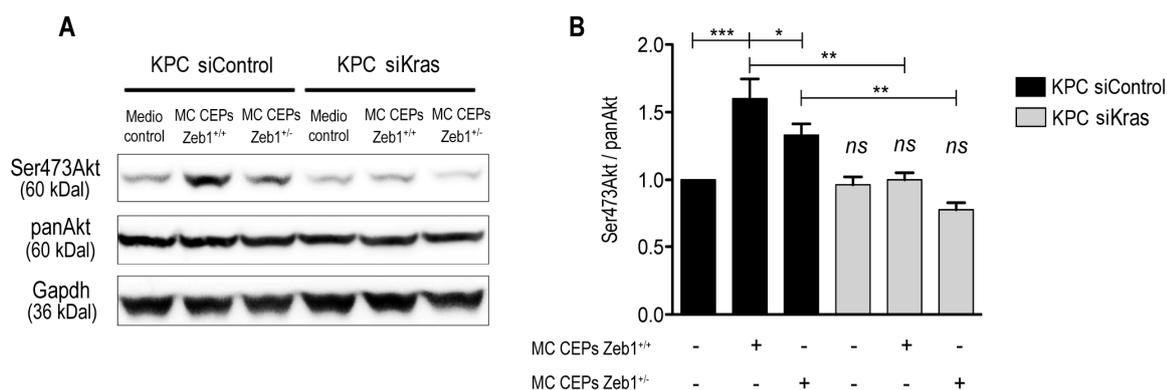


Figura 39. La expresión de Zeb1 en las CEPs estimula de manera paracrina la fosforilación de Akt en las células neoplásicas.

(A) Análisis por Western blot y **(B)** cuantificación correspondiente de la fosforilación de Akt y Akt total en las células KPC transfectadas con siControl o siKras, y expuestas a MC de CEPs *Zeb1^{+/+}* y *Zeb1^{+/-}* durante 48h. Como control endógeno de carga se utilizó Gapdh. Los valores relativos de la cuantificación de Ser473Akt se normalizaron respecto a los valores de panAkt.

Las barras de la gráfica indican la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: no significativo (*one-way ANOVA*).

Dado que Akt no es un mediador activado exclusivamente por Kras sino que también participa en otras vías de señalización, analizamos la fosforilación de Akt en respuesta al MC de CEPs en células neoplásicas sin expresión de Kras. Para ello, transfectamos las células neoplásicas con siARN específico de Kras. Los resultados mostraron que el MC, independientemente de si provenía de CEPs con expresión completa o haploinsuficiente de *Zeb1*, no inducía la fosforilación de Akt en las células neoplásicas sin expresión de Kras, confirmando que dicho efecto es dependiente de la activación de la vía de señalización de Kras (Figura 39 A y B).

Para corroborar los resultados obtenidos en el análisis de la fosforilación de Akt, cuantificamos la actividad de Ras en las células neoplásicas en respuesta al MC de CEPs. Como ya se ha mencionado previamente, Ras se activa uniéndose específicamente a una molécula GTP y se inactiva tras la hidrólisis de GTP en GDP. En el ensayo de actividad de Ras que realizamos, las moléculas de GTP se unen específicamente a las *beads* de agarosa con las que se realiza la inmunoprecipitación, por lo que el nivel de señal será directamente proporcional a la cantidad de Ras activo en nuestra muestra. En concordancia con los resultados de fosforilación de Akt, el MC de CEPs *Zeb1*^{+/+} aumentó en gran medida la cantidad de Ras activo en las células neoplásicas respecto a las células expuestas a medio de cultivo control; sin embargo, este efecto fue prácticamente nulo (y comparable al control) en células tratadas con MC de CEPs con expresión heterocigota de *Zeb1* (Figura 40 A y B).

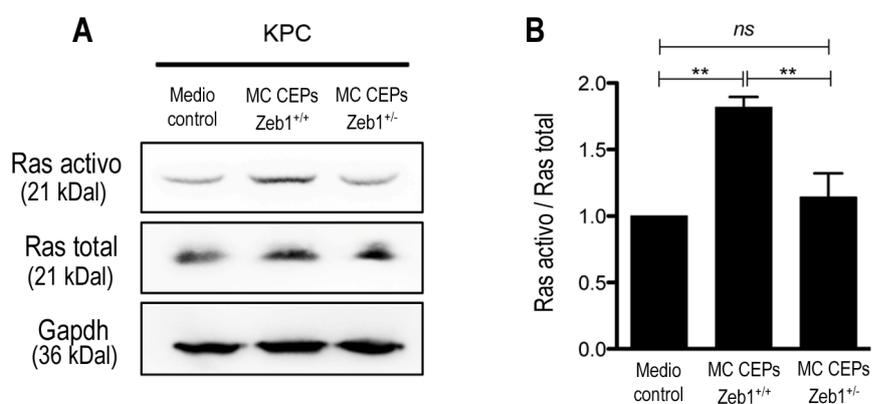


Figura 40. La expresión de *Zeb1* en las CEPs induce de manera paracrina la actividad de Kras en las células neoplásicas.

(A) Western blot representativo del resultado de los ensayos de inmunoprecipitación de Ras en las células neoplásicas KPC expuestas durante 48h a medio de cultivo control y a MC de CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-}. Como control endógeno de carga se utilizó el Gapdh. **(B)** Cuantificación relativa de Ras activo normalizada respecto al Ras total. Las barras indican la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. ** $p < 0.01$, ns: no significativo (*one-way* ANOVA).

En resumen, los resultados de este apartado aportan información novedosa sobre el efecto de las CEPs en promover la actividad de Kras en células acinares y neoplásicas pancreáticas, y demuestran la participación de Zeb1 como mediador heterotípico de este efecto. Estos datos revelan que la expresión de Zeb1 en las CEPs media la activación oncogénica no autónoma de Kras de las células que conforman el compartimento epitelial del tumor desde las etapas más iniciales de la oncogénesis pancreática y durante la evolución tumoral.

8. La expresión de Zeb1 en las CEPs regula vías de señalización implicadas en su activación y en la carcinogénesis pancreática.

En apartados previos hemos demostrado que la expresión de Zeb1 en las CEPs media su fenotipo de activación y promueve sus propiedades pro-tumorales. Para identificar las vías de señalización reguladas por Zeb1 en las CEPs realizamos un análisis transcriptómico que nos permita analizar las diferencias en la expresión génica de las CEPs derivadas de la expresión hemiciogótica de *Zeb1*.

El análisis transcriptómico de CEPs Zeb1^{+/+} y CEPs Zeb1^{+/-} generó datos de expresión diferencial, a partir de los cuales y tras un filtraje se seleccionaron los genes con valores de expresión diferencial estadísticamente significativos ($p\text{-value} < 0,05$). Tras este cribado, se identificaron 1820 genes diferencialmente expresados de manera significativa entre las CEPs Zeb1^{+/+} y Zeb1^{+/-}.

A continuación, utilizando el programa IPA identificamos qué procesos biológicos estaban enriquecidos por los 1820 genes diferencialmente expresados. Un análisis de enriquecimiento con estos genes identificó posibles redes génicas de interacción directas e indirectas y sus funciones biológicas. De todas las redes génicas asociados a la deficiencia de Zeb1 obtenidas tras el análisis de enriquecimiento, la de mayor puntuación ($p\text{-score}=38$) corresponde a las funciones de desarrollo y crecimiento

celular, proliferación celular y cáncer. La segunda red génica con mayor puntuación (p -score=29) engloba genes implicados en muerte y supervivencia celular, y desarrollo y supervivencia del organismo (Tabla 29). Por tanto, estos datos indicarían que Zeb1 regula funciones biológicas con una importante implicación en el funcionamiento y supervivencia de las CEPs.

Funciones	p-score	Focus moleculas
Desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular, cáncer	38	22
Muerte y supervivencia celular, desarrollo y supervivencia del organismo	29	18

Tabla 29: Principales funciones biológicas reguladas por Zeb1.

Funciones biológicas de las redes génicas generadas mediante un análisis de enriquecimiento con los genes significativamente desregulados por Zeb1 en las CEPs.

A continuación, analizamos mediante IPA las vías de señalización canónicas enriquecidas por los genes significativamente desregulados identificados previamente. Para ello, IPA utiliza su propia librería de vías canónicas tanto metabólicas como de señalización, todas ellas generadas en base a la literatura existente. Así pues, el programa identifica qué genes de la lista forman parte de cada vía y calcula la significancia estadística para cada vía de señalización mediante un test exacto de Fisher. Los valores de p -value obtenidos indican la probabilidad de asociación al azar de las moléculas que forman parte de la lista de genes desregulados con la vía de señalización concreta de la librería. Estos análisis mostraron que la hemizigosis de Zeb1 en las CEPs resulta en el enriquecimiento de 264 rutas de señalización canónicas (p -value < 0,05). La más enriquecida correspondió a la “Vía de mecanismos moleculares del cáncer” ($p = 7,9 \times 10^{-15}$). Otras vías enriquecidas fueron Wnt/ β -catenina ($p = 4,7 \times 10^{-10}$), PI3K/AKT ($p = 8,3 \times 10^{-7}$), IGF-1 ($p = 2,2 \times 10^{-7}$), TGF β ($p = 8,9 \times 10^{-7}$), FGF ($p = 2,3 \times 10^{-4}$), EGF ($p = 7,9 \times 10^{-4}$), Integrinas ($p = 1,9 \times 10^{-3}$) y Apoptosis ($p = 2,1 \times 10^{-3}$) (Figura 41). Cabe destacar que todas estas vías tienen una participación sustancial en la activación de las CEPs y en la oncogénesis pancreática.

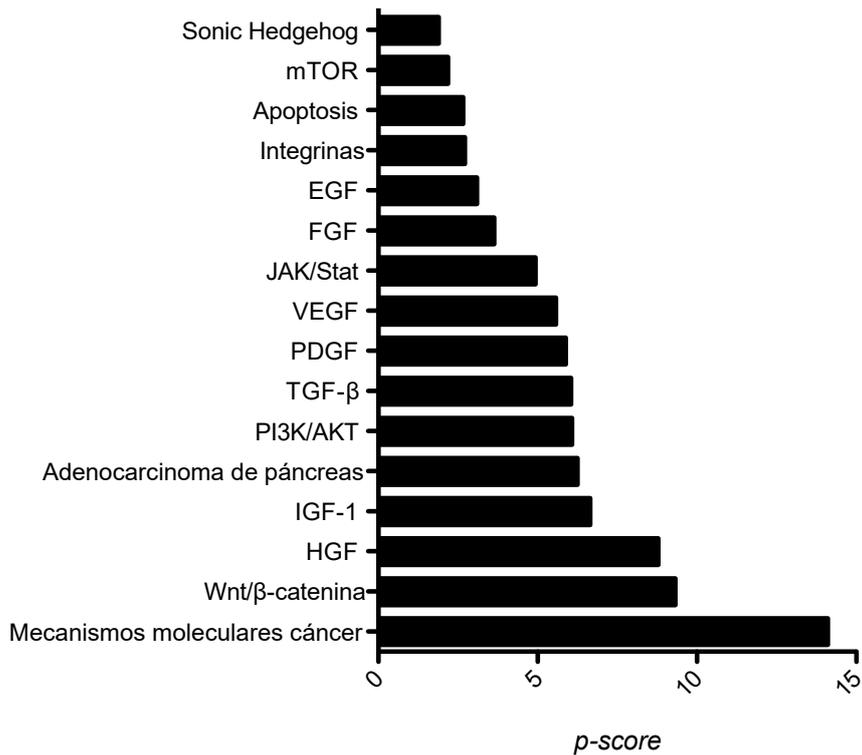


Figura 41. Vías de señalización canónicas reguladas por Zeb1.

Análisis mediante IPA de las vías de señalización canónicas enriquecidas por los genes significativamente desregulados por Zeb1 en las CEPs. El valor de *p-score* muestra la probabilidad de encontrar en la librería de IPA los genes que forman parte de nuestra lista de genes desregulados, para cada vía de señalización canónica.

La representación de los datos mediante un *heatmap* permite mostrar cómo están regulados los genes que forman parte de estas vías de señalización como consecuencia de la deficiencia de Zeb1 en las CEPs (Figura 42).

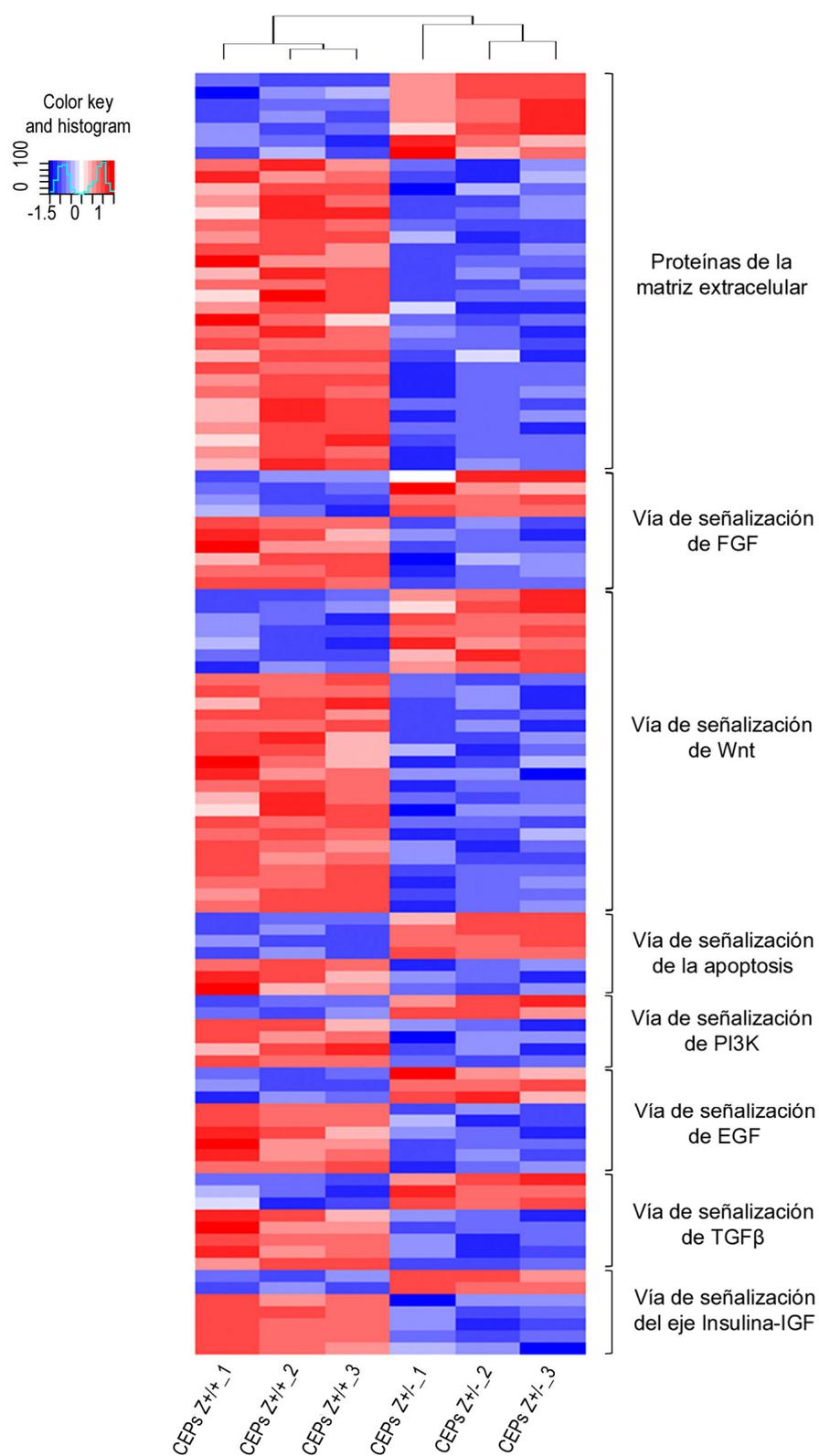


Figura 42. Heatmap de los genes regulados por Zeb1.

Representación mediante *heatmap* de la sobre e infraregulación de los genes que forman parte de las vías de señalización canónicas identificadas mediante IPA, en las CEPs Zeb1^{+/+} (n=3, izquierda) y Zeb1^{-/-} (n=3, derecha).

La heterocigosis de *Zeb1* en las CEPs causa una regulación negativa de la vía de señalización de Wnt, la cual participa en el desarrollo del ACDP²⁰⁶ y en la activación de las CEPs²⁰⁷.

La vía de PI3K también se encuentra negativamente regulada en las CEPs *Zeb1*^{+/-} respecto a las CEPs *Zeb1*^{+/+}. Se conoce que la activación de esta vía se correlaciona con un peor pronóstico del ACDP^{208,209}. Por otro lado, la vía de PI3K en las CEPs está implicada en su migración, proliferación y síntesis de proteínas de la matriz extracelular²¹⁰.

Las CEPs haploinsuficientes en *Zeb1* tienen el eje IGF-Insulina negativamente regulado. Diversos estudios demuestran la implicación de la vía de IGF en el desarrollo y la progresión del cáncer de páncreas. En pacientes de ACDP, se ha identificado un aumento de la expresión intratumoral de IGF1R²¹¹, la cual se asocia a estadios avanzados de la enfermedad y a una peor supervivencia²¹². Por otra parte, altos niveles de insulina promueven la hiperactivación de las CEPs, estimulando su proliferación y la síntesis de matriz extracelular²¹³.

Diversos estudios demuestran en muestras de ACDP humanas la existencia de una comunicación bidireccional entre IGFR y EGFR que podría ser relevante para la progresión y diseminación metastásica tumoral e incluso para predecir la evolución de la enfermedad^{212,214}. El factor de crecimiento EGF es un conocido activador de la vía de señalización de Kras, y la expresión de EGFR en el páncreas es crítica para la transdiferenciación de las células acinares en células ductales durante los estadios iniciales del cáncer de páncreas generado por la mutación oncogénica de *Kras*²¹⁵. Nuestros resultados muestran que la vía de señalización de EGF se encuentra negativamente regulada en las CEPs deficientes en *Zeb1*.

Cabe destacar también la infraregulación en las CEPs *Zeb1*^{+/-} de genes que codifican proteínas de la matriz extracelular y la sobreexpresión de genes implicados en la apoptosis, lo cual sustenta los resultados obtenidos *in vitro* que muestran cómo la restricción en la expresión de *Zeb1* en las CEPs debilita su propio fenotipo activado.

Por otra parte, algunas de las vías de señalización representadas en el *heatmap* controlan la expresión de mediadores solubles implicados en la regulación paracrina de la señalización oncogénica de Ras en las células neoplásicas, como es el caso de

Wnt^{96,216}, EGF¹⁸⁰ y FGF²¹⁷. Especialmente interesante es la vía de señalización de IGF-1 en las CEPs, que forma parte de una ruta intercelular (eje entre IGF1/GAS6 de las CEPs y fosfo-Akt de las células tumorales) que activa Kras en las células neoplásicas¹⁸⁰.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El oncogén *Kras* tiene una participación crítica en el desarrollo del cáncer de páncreas. Por otro lado, el factor de transcripción Zeb1, además de su reconocida implicación en la transición epitelio mesénquima, se ha identificado como mediador necesario para el desarrollo de tumores dependientes del oncogén *Kras*^{181,182}. Además, Zeb1 actúa como diana en la vía de señalización de Ras mediando la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas, ambas necesarias para el inicio y progresión tumoral¹⁸⁶. Una prueba clave que demuestra la dependencia oncogénica Ras-Zeb1 es la obligada expresión de Zeb1 para conseguir el desarrollo de cáncer de pulmón inducido por *Kras*¹⁸⁵. El trabajo de Liu et al. demuestra en un modelo murino que la delección homocigótica de Zeb1 es suficiente para interrumpir la progresión de adenoma a adenocarcinoma pulmonar inducida por el oncogén *Kras*, hecho atribuido a la falta de represión del supresor tumoral Pten por parte de Zeb1 y la consecuente activación de la vía PI3K-pAkt¹⁸⁵. Esta dependencia Ras-Zeb1 podría por tanto ser extrapolable al cáncer de páncreas, cuyo desarrollo está en la mayoría de casos estrechamente asociado a mutaciones oncogénicas en *Kras*.

Para estudiar esta hipótesis, utilizamos el modelo de cáncer de páncreas desarrollado espontáneamente en ratones portadores de mutación activadora en el oncogén *Kras* y de mutación supresora en el gen supresor de tumores *p53*, ambas condicionadas al páncreas mediante el alelo *Cre-Pdx1*, el cual se expresa únicamente en células progenitoras del páncreas de estirpe epitelial durante el desarrollo embrionario (modelo *LSL-Kras*^{G12D}; *p53*^{R172H/+}; *Pdx1-Cre*, abreviado KPC). Estos ratones reproducen con gran similitud la progresión anatomopatológica característica de cáncer de páncreas en humanos, desde las lesiones precursoras (MAD, PanINs de bajo y alto grado) hasta el adenocarcinoma ductal invasivo con diseminación metastásica. Con el fin de estudiar la participación de Zeb1 en el desarrollo tumoral pancreático, se generaron cruces de ratones KPC con ratones con expresión homocigota de *Zeb1* (ratones *Z*^{+/-}), dando como resultado ratones KPC;*Z*^{+/-} y KPC;*Z*^{+/+}. A las 20 semanas de edad, los ratones KPC;*Z*^{+/+} habían desarrollado en todos los casos adenocarcinoma ductal de páncreas, con una afectación casi total de la glándula pancreática. En cambio, ninguno de los ratones con haploinsuficiencia de *Zeb1* sacrificados a las 20 semanas de edad presentaba cáncer de páncreas, siendo únicamente evidente el desarrollo de lesiones precursoras de bajo grado (ADM y

PanINs de bajo grado). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de Zeb1 en el desarrollo tumoral pancreático inducido por el oncogén *Kras*.

Un dato destacable observado en nuestro modelo murino es el patrón de expresión tumoral de Zeb1. Este factor de transcripción no se expresa en tejidos sanos diferenciados mientras que su expresión nuclear se identifica en gran variedad de tejidos tumorales¹¹⁷⁻¹²⁴. En el cáncer de páncreas humano ZEB1 se encuentra expresado en una elevada proporción de casos, mostrando característicamente una distribución nuclear en las células del compartimento desmoplásico, principalmente en los fibroblastos asociados al tumor, y en menor medida en las células neoplásicas del frente tumoral^{132,133}. En nuestro estudio, las inmunotinciones de los tumores pancreáticos generados en los ratones KPC coinciden en mostrar una expresión de Zeb1 intensa y mayoritaria en los miofibroblastos del estroma tumoral y en menor cantidad en otras células desmoplásicas, como linfocitos, macrófagos y células endoteliales, así como en algunas células tumorales. En condiciones de heterocigosis de *Zeb1*, los páncreas de los ratones KPC a las 20 semanas presentan un patrón de distribución de Zeb1 similar al de los ratones KPC;*Z^{+/+}*, consistente en la expresión nuclear mayoritaria en los miofibroblastos del estroma fibroinflamatorio, aunque con una marcada reducción en la carga nuclear y en el número de células positivas.

Este hecho nos hizo plantear la posibilidad de que la restricción de Zeb1 pudiera estar limitando la competencia pro-tumoral del estroma debido a la generación de miofibroblastos con una expresión reducida de Zeb1. Este argumento viene respaldado por diversas evidencias experimentales *in vitro* y en modelos murinos, que reconocen la activa participación de las CEPs en promover el desarrollo^{40,53} y diseminación metastásica^{68,69} del cáncer de páncreas. Además, se conoce que a mayor proporción de miofibroblastos asociados al tumor peor es el pronóstico del ACDP^{203,218}. De hecho, el cálculo del Índice de Activación del Estroma (ASI), resultado del cociente entre el área de inmunopositividad de α SMA y el área colágeno, se reconoce como parámetro predictivo del pronóstico de la enfermedad. En base al cálculo del ASI, se confirma que los tumores con un compartimento desmoplásico con baja proporción de miofibroblastos se asocian a una supervivencia mayor que aquellos con un estroma rico en miofibroblastos²⁰³. Al aplicar este cálculo en nuestros experimentos pudimos comprobar que el grupo KPC;*Z^{+/-}* mostraba un ASI significativamente menor que el grupo KPC;*Z^{+/+}* de la misma edad (20 semanas). Si consideramos que el estroma fibroinflamatorio que acompaña al desarrollo oncogénico pancreático es un sistema en evolución, las diferencias observadas entre ambos

grupos podrían ser resultado de comparar estadios diferentes de la enfermedad, es decir, el estroma fibroinflamatorio asociado a PanINs de los ratones KPC;*Z*^{+/-} con el estroma tumoral asociado a cáncer de los KPC;*Z*^{+/+}. Para esclarecer esta cuestión comparamos el estroma en estadios evolutivos análogos, es decir el de los páncreas KPC;*Z*^{+/+} de 16 semanas de vida con el de los páncreas KPC;*Z*^{+/-} de 20 semanas. Ambos grupos mostraron un ASI equiparable, lo cual implica que la heterocigosis de *Zeb1* condiciona una transformación del estroma más retardada en comparación con los ratones con expresión completa de *Zeb1*. De hecho, a largo plazo (30 semanas de vida), los ratones KPC;*Z*^{+/-} acaban desarrollando cáncer de páncreas de las mismas características que los ratones KPC;*Z*^{+/+}.

Una limitación de nuestro estudio a la hora de atribuir el efecto de la haploinsuficiencia de *Zeb1* en el retardo del desarrollo tumoral pancreático es que en el modelo utilizado la heterocigosis de *Zeb1* no está condicionada al epitelio pancreático. Por ello, a pesar de que la expresión de *Zeb1* esté predominantemente limitada a los miofibroblastos del estroma fibroinflamatorio, nuestros experimentos no pueden confirmar que los efectos observados se atribuyan únicamente a esta población celular. Sin embargo, un estudio publicado recientemente por Krebs et al. aporta evidencias que demuestran indirectamente nuestra suposición. En este trabajo se describe el resultado de la eliminación monoalélica y bialélica de *Zeb1* condicionada exclusivamente al compartimento epitelial de ratones KPC mediante el alelo *Cre-Pdx1*. La conclusión del estudio es que la heterocigosis de *Zeb1* en las células epiteliales pancreáticas no modifica el desarrollo tumoral pancreático ni la supervivencia de los animales en comparación con los ratones KPC con expresión salvaje de *Zeb1*¹³⁶. Esta observación proporciona un argumento de gran valor que sustenta la idea de que es la restricción de *Zeb1* en el estroma y no en las células neoplásicas la responsable de limitar el desarrollo tumoral. Para corroborar esta hipótesis generamos tumores subcutáneos heterotópicos en ratones inmunocompetentes mediante coinyección de células neoplásicas derivadas de tumores KPC con CEPs *Zeb1*^{+/+} y CEPs *Zeb1*^{+/-}. Los tumores generados mediante coinyección de células KPC + CEPs *Zeb1*^{+/+} mostraron un crecimiento significativamente mayor que aquellos formados a partir de células KPC solas. Esta observación confirma y enfatiza estudios anteriores donde se demuestra que la cooperación de las CEPs con las células neoplásicas promueve el desarrollo tumoral^{40,53}. En contraste, los tumores derivados de células KPC + CEPs *Zeb1*^{+/-} mostraron un crecimiento comparable al de los tumores generados sólo con células KPC. Estos resultados apoyan la idea de que es la haploinsuficiencia de *Zeb1* en las

CEPs del estroma la principal condicionante de los resultados descritos en el modelo tumoral KPC;Z^{+/-}.

Un hecho a destacar de este trabajo es la observación de que la haploinsuficiencia de *Zeb1* retarda claramente el desarrollo de cáncer de páncreas pero no es capaz a la larga de impedir su desarrollo. Estas evidencias difieren del resultado descrito en el modelo de cáncer de pulmón inducido por *Kras*, cuya formación se detiene por completo en ratones con delección heterocigota de *Zeb1*¹⁸⁵. Existen diversas razones que pueden justificar esta diferencia. Una de ellas es que la función de *Zeb1* en la señalización oncogénica de *Kras* sea específica y diferente para cada tejido; en relación a esta posibilidad, es posible que existan en el páncreas mecanismos compensatorios que sorteen la carencia de *Zeb1*. Por otro lado, el modelo de oncogénesis pancreática inducida por *Kras* utilizado en nuestro estudio contiene también una mutación supresora en *p53*. La adición de esta mutación supone un mecanismo añadido a la vía de *Kras*, que puede condicionar un incremento suficiente en la determinación del desarrollo carcinogénico como para eludir la dependencia de *Zeb1*. Por último, en nuestro estudio se han utilizado ratones heterocigotos en *Zeb1*, lo cual plantea la posibilidad de que sea necesaria la supresión completa de este factor de transcripción para conseguir detener el desarrollo tumoral pancreático (procedimiento no factible experimentalmente ya que los ratones con delección homocigota de *Zeb1* no son viables⁹⁸). No obstante, se sabe que la supresión homocigota de *Zeb1* específicamente en el compartimento epitelial pancreático de ratones KPC no evita el desarrollo de cáncer de páncreas ni retarda su crecimiento, aunque sí resulta en una mayor diferenciación y menor capacidad metastásica¹³⁶. Esta demostración, en combinación con nuestros resultados, pone de manifiesto que la señalización oncogénica de *Zeb1* no se limita a una estirpe celular y que es posiblemente la actuación combinada y específica en cada célula lo que condiciona el éxito tumoral.

Diversas evidencias experimentales *in vitro* y en modelos murinos demuestran que las CEPs activadas asociadas al estroma fibroinflamatorio pancreático promueven el desarrollo del ACDP, y que este efecto está mediado en parte a través de la comunicación paracrina con las células neoplásicas. Para llevar a cabo esta cooperación paracrina, las CEPs activadas generan gran variedad de factores solubles capaces de iniciar una señalización no-autónoma en las células neoplásicas, la cual fomenta propiedades tumorales como la proliferación, migración, invasión, quimiorresistencia y adaptación metabólica^{40,41,60,68,74}. En base a esta consideración

demostramos *in vitro* los resultados previos descritos en los ratones KPC acerca de la participación que tiene la expresión de Zeb1 de las CEPs en el desarrollo tumoral. Para ello utilizamos cultivos primarios de CEPs obtenidas de páncreas sano de ratones con expresión completa ($Zeb1^{+/+}$) y heterocigota ($Zeb1^{+/-}$) de *Zeb1*. En condiciones de cultivo en superficie de plástico y con medio de cultivo con SBF las CEPs adquieren un fenotipo de activación que asemeja el estado de las CEPs activadas del estroma tumoral. El análisis transcripcional mediante qRT-PCR reveló una menor expresión en las CEPs $Zeb1^{+/-}$ de genes asociados a actividad fibrogénica (*Col1a1* y *Mmp9*), lo cual señala la participación de Zeb1 en las CEPs en la regulación de sus propiedades relacionadas con la fibrosis. Es interesante la observación de que el silenciamiento de *Zeb1* mediante siRNA anula la expresión de *Acta2* (gen que codifica la expresión de α SMA), lo que corrobora evidencias previas sobre la mediación de Zeb1 en la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos²¹⁹. También se ha demostrado previamente que los fibroblastos embrionarios de ratón con expresión nula de *Zeb1* carecen de fenotipo miofibroblástico y presentan una morfología de tipo epitelial caracterizada por la expresión de E-Cadherina⁹⁹. Aunque la expresión de Zeb1 se había identificado previamente en los miofibroblastos tumorales del cáncer de páncreas, no existían evidencias sobre los efectos funcionales en las CEPs. Desde el punto de vista funcional, nuestros resultados muestran información novedosa sobre la función de Zeb1, consistente en promover la proliferación, migración y resistencia a la apoptosis de las CEPs.

Para analizar si Zeb1 media la comunicación con las células neoplásicas a través de señalización paracrina evaluamos diversos efectos en células de cáncer de páncreas en respuesta al medio condicionado obtenido de CEPs, el cual contiene factores solubles secretados por estas células. Esta aproximación permitió comprobar que la expresión heterocigota de *Zeb1* en las CEPs mitiga sus atributos pro-tumorales, condicionándoles una menor capacidad pro-migratoria, pro-invasiva y pro-mitótica sobre de las células tumorales.

La información aportada sobre la participación de Zeb1 como mediador de la activación y adquisición de capacidades pro-tumorales de las CEPs es novedosa, y añade valor a la ya reconocida contribución de Zeb1 en el inicio, invasión, diseminación metastásica y quimioresistencia de las células neoplásicas pancreáticas a través de la transición epitelio mesénquima^{114,130,135}. Nuestros resultados confirman y amplían el campo de actuación de Zeb1 en el desarrollo del ACDP, situando a este factor de transcripción como una nueva diana del estroma tumoral que complementa

las dianas oncogénicas ya descritas en las células neoplásicas. De esta forma, nuestros estudios identifican una vía de regulación oncogénica no autónoma que es dependiente de la expresión de Zeb1 en las CEPs y que fomenta la progresión del cáncer de páncreas.

Con los experimentos *in vitro* descritos hemos analizado el efecto que la expresión de Zeb1 en las CEPs tiene sobre las células que ya han adquirido fenotipo tumoral. Sin embargo, la cooperación oncogénica de las CEPs comienza mucho antes de la generación del adenocarcinoma. En etapas muy incipientes de la oncogénesis, las lesiones de tipo MAD y PanINs de bajo grado se encuentran envueltas por abundante tejido fibroinflamatorio rico en miofibroblastos²⁰. Mediante inmunohistoquímica pudimos comprobar que los miofibroblastos asociados a lesiones de bajo grado de tipo MAD y PanIN mostraban inmunotinción positiva para Zeb1. Ello nos hizo plantear que la cooperación paracrina dependiente de Zeb1 por parte de las CEPs posiblemente se inicie con las células epiteliales todavía no neoplásicas que, al expresar *Kras* mutado, son susceptibles de experimentar una transformación oncogénica. Para investigar esta hipótesis diseñamos ensayos *in vitro* basados en la exposición de células acinares (aisladas de páncreas portadores del oncogén *Kras*) a medio condicionado de CEPs con expresión salvaje o heterocigota de *Zeb1*. En estas células analizamos la inducción de MAD en base al número de estructuras ductales formadas. Estos experimentos mostraron que el medio condicionado de las CEPs con expresión completa de Zeb1 estimulan la inducción de MAD respecto a las células acinares expuestas a medio de cultivo control, y que este efecto es nulo al utilizar medio condicionado de CEPs haploinsuficientes en *Zeb1*.

Desde un punto de vista mecanístico pudimos comprobar el papel de Ras en la comunicación heterotípica entre CEPs con expresión de Zeb1 y células neoplásicas portadoras del oncogén *Kras* (KPC). Observamos que el medio condicionado de las CEPs estimula la actividad Ras y la consecuente activación de pAkt (mediador de la vía de señalización de *Kras*) en las células neoplásicas, y que tal efecto es notablemente menor en respuesta a medio condicionado de CEPs haploinsuficientes en *Zeb1*. Ello sugiere la existencia de un eje de cooperación intercelular Zeb1-*Kras*. Para corroborar esta idea aportamos la prueba de que la fosforilación de Akt en las células neoplásicas en respuesta a medio condicionado de las CEPs se anula al silenciar la expresión de *Kras* con siRNA. Estos resultados corroboran evidencias previas que demuestran que la comunicación recíproca entre CEPs activadas y células neoplásicas portadoras de *Kras* mutado es dependiente de la activación

selectiva de la vía de Akt (Tape et al 2016). Nuestros resultados añaden Zeb1 como una pieza más en este eje de comunicación intercelular. También pudimos comprobar que el medio condicionado de las CEPs induce la fosforilación de Akt en acinos que expresan *Kras* mutado, y este efecto desaparece cuando el medio condicionado proviene de CEPs haploinsuficientes en *Zeb1*. Estas observaciones sugieren que la comunicación entre las CEPs y el compartimento epitelial del páncreas ocurre desde el inicio de la malignidad a través de la activación de la vía de Akt en las células epiteliales portadoras de *Kras* mutado, y corrobora la existencia del eje intercelular Zeb1-Kras. Recientemente, Sherman et al. han demostrado en muestras humanas y murinas de cáncer de páncreas que las señales generadas por los miofibroblastos del estroma inducen la expresión de una firma genética particular en las células neoplásicas³⁹. Es destacable la observación de que los genes que enriquecen la firma inducida por el estroma se solapan con la firma génica activada en respuesta a *Kras*⁸¹, lo cual sugiere que la señalización oncogénica de *Kras* puede estar bajo el control de señales generadas en el microambiente en el que habita la célula portadora del oncogén. Respaldados por estas evidencias, nuestros resultados añaden argumentos sobre la existencia de una vía de comunicación paracrina heterotípica entre CEPs y células epiteliales e incorporan a Zeb1 en el control no autónomo del oncogén *Kras*.

Un análisis transcriptómico nos permitió estudiar en profundidad las vías de señalización reguladas por Zeb1 en las CEPs. Pudimos observar como la sola eliminación monoalélica de *Zeb1* en las CEPs provoca la desregulación de 1820 genes; esta gran cantidad de genes participan en procesos como el cáncer, el desarrollo y la proliferación celular, y la muerte y la supervivencia celular. Un total de 264 vías de señalización canónicas se encuentran enriquecidas por los genes desregulados en las CEPs como consecuencia de la haploinsuficiencia de *Zeb1*, entre las que se encuentran vías implicadas en la activación de las CEPs y en la oncogénesis pancreática. En este aspecto, diversos estudios demuestran que algunas de las principales vías de señalización reguladas negativamente como consecuencia de la haploinsuficiencia de *Zeb1*, como las vías de Wnt, PI3K, IGF y EGFR, están implicadas en la activación de las CEPs^{207,210,213}. Muestra también de un fenotipo menos activado es la infraregulación de genes que codifican proteínas de la matriz extracelular y la sobreexpresión de genes implicados en la apoptosis. Por otra parte, la haploinsuficiencia de *Zeb1* en las CEPs tiene como consecuencia la regulación negativa de vías como Wnt, FGF, EGF y IGF, que tienen una conocida implicación en la regulación paracrina de la señalización de Ras en el compartimento epitelial^{96,180,216,217}. Concretamente, un estudio publicado recientemente ha mostrado

que la vía de señalización de IGF-1 en las CEPs es de gran importancia en la activación de Kras en el compartimento tumoral, ya que establece un eje de comunicación intercelular con las células tumorales a través de la fosforilación de Akt¹⁸⁰. Cabe destacar que todas las vías negativamente reguladas en las CEPs como consecuencia de la heterocigosis de *Zeb1* tienen un papel crucial en el desarrollo del ACDP^{206,208,209,211,212,214}. Estos resultados corroboran la existencia de un eje de comunicación Zeb1-Kras entre las CEPs y las células neoplásicas, y esclarecen las principales vías de señalización a través de las cuales la expresión de Zeb1 en las CEPs regula su fenotipo activado y la oncogénesis pancreática.

Los resultados aportados en esta tesis aportan una nueva evidencia sobre la importancia del estroma en el desarrollo tumoral y descubren la función de Zeb1 como potencial diana de actuación terapéutica. El estroma tumoral es actualmente un área de investigación científica de gran interés para el desarrollo de nuevas terapias. Las aproximaciones investigadas hasta el momento han sido diversas, desde la eliminación selectiva de las CEPs, la inmunomodulación, la disolución de la matriz extracelular o la reprogramación de las CEPs. Cabe destacar el resultado de dos estudios realizados en modelos murinos de cáncer de páncreas que advierten sobre el riesgo de eliminar el estroma tumoral al promover el crecimiento y la dispersión metastásica tumoral^{93,94}. Otros estudios demuestran en modelos murinos de cáncer de páncreas el beneficio terapéutico de la vitamina D y la vitamina A conseguido a través de reprogramar, en lugar de eliminar, las CEPs tumorales hacia un fenotipo quiescente^{81,220}. Teniendo en cuenta la participación que hemos descrito de Zeb1 en la activación de las CEPs y en su actividad pro-tumoral, las evidencias aportadas en este trabajo plantean la opción de diseñar terapias dirigidas a la supresión de Zeb1 en los miofibroblastos, con la finalidad de inducir su inactivación y por tanto la generación de un estroma menos colaborativo con el tumor.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El factor de transcripción nuclear Zeb1 se sobreexpresa en el tejido pancreático durante el desarrollo oncogénico. Su expresión se observa desde la generación de lesiones ductales precursoras, y mayoritariamente en los miofibroblastos del estroma fibroinflamatorio asociado.
2. La delección heterocigota de *Zeb1* en el modelo murino de cáncer de páncreas *LSL-Kras^{G12D};p53^{R172H/+};Pdx1-Cre* retarda el desarrollo tumoral. Ello se asocia a la generación de un estroma menos colaborativo con el tumor y de menor contenido en miofibroblastos con expresión de Zeb1.
3. El desarrollo oncogénico retardado que se observa en el modelo murino *KPC;Z^{+/-}* se debe mayoritariamente a la haploinsuficiencia de *Zeb1* en las CEPs.
4. En cultivos celulares primarios establecidos a partir de páncreas murinos, las CEPs activadas (o miofibroblastos) muestran una marcada expresión de Zeb1, y su represión les condiciona un fenotipo menos activo y potencial pro-tumoral limitado.
5. La expresión de Zeb1 en las CEPs participa como mediador heterotípico de la activación de Ras en las células acinares y neoplásicas portadoras del oncogén *Kras*, estableciendo un eje Zeb1-Kras de comunicación intercelular.
6. Zeb1 regula en las CEPs la expresión autónoma de una gran variedad de genes implicados en vías de señalización con una participación central en la activación de las células estrelladas y en la carcinogénesis pancreática.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Hamilton SR, Aaltonen LA. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics*. 2000.
2. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic Adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2014;371:1039–1049. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1404198>.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7–30.
4. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, et al. European cancer mortality predictions for the year 2017 , with focus on lung cancer. *Ann Oncol* 2017;1–7.
5. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030 : The Unexpected Burden of Thyroid , Liver , and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74:2913–2921.
6. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2017;32:185–203.e13.
7. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT. Cigarette smoking and pancreatic cancer : an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol* 2012;23:1880–1888.
8. Larsson SC, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer : meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer* 2012;106:603–607. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.585>.
9. Bosetti C, Bravi F, Turati F, et al. Nutrient-based dietary patterns and pancreatic cancer risk. *Ann Epidemiol* 2013;23:124–128. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2012.12.005>.
10. Philip B, Roland CL, Daniluk J, et al. A high-fat diet activates oncogenic Kras and COX2 to induce development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gastroenterology* 2013;145:1449–1458.
11. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, et al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J cancer* 2010;126:1474–1486.
12. Lucenteforte E, Vecchia C La, Silverman D, et al. Alcohol consumption and pancreatic cancer : a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case – Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol* 2012;23:374–382.
13. Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2016;2:1–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>.

14. Daniluk J, Liu Y, Deng D, et al. An NF- κ B pathway mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *Cancer Res* 2012;72:1519–1528.
15. Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, et al. Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* 2007;11:291–302.
16. Howard B, Iii AB, Moore MJ, et al. Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer : A Randomized Trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403–2413.
17. La O J-P De, Emerson LL, Goodman JL, et al. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:18907–18912. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0810111105>.
18. Habbe N, Shi G, Meguid RA, et al. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:18913–18918. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0810097105>.
19. Iv JPM, Cano DA, Sekine S, et al. β -catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* 2010;120:508–520.
20. Shi G, Dizenzo D, Qu C, et al. Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* 2013;32:1950–1958.
21. Collins MA, Yan W, Sebolt-Leopold JS, et al. MAPK signaling is required for dedifferentiation of acinar cells and development of pancreatic intraepithelial neoplasia in mice. *Gastroenterology* 2014;146:822–834.e7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.052>.
22. Sipos B, Frank S, Gress T, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology* 2009;9:45–54.
23. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004;28:977–987.
24. Basturk O, Hong S, Wood LD, et al. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol* 2015;39:1730–1741.
25. Morris JP WSHM. KRAS , Hedgehog , Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10:683–695. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2899>.
26. Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015;518:495–501.

27. Sausen M, Phallen J, Adleff V, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun* 2015;6:1–6.
28. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, et al. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005;7:17–23.
29. Kanda M, Matthaei H, Wu J, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2012;142:730–733.
30. Murphy SJ, Hart SN, Lima JF, et al. Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology* 2013;145:1098–1109.e1.
31. Maitra A, Adsay NV, Argani P, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003;16:902–912.
32. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2003;17:3112–3126.
33. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, et al. Trp53 R172H and Kras G12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469–483.
34. Ji B, Tsou L, Wang H, et al. Ras Activity Levels Control the Development of Pancreatic Diseases. *Gastroenterology* 2009;137:1072–1082.e6.
35. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest* 2012;122:639–653.
36. Pasca di Magliano M, Logsdon CD. Roles for KRAS in Pancreatic Tumor Development and Progression. *Gastroenterology* 2013;144:1220–1229. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.071>.
37. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, et al. Both p16Ink4a and the p19Arf-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:5947–5952. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601273103>.
38. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, et al. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012;18:4266–4276.
39. Sherman MH, Yu RT, Tseng TW, et al. Stromal cues regulate the pancreatic cancer epigenome and metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016:1–6.
40. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, et al. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:2085–93.
41. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 2008;68:918–926.

42. Rucki AA, Foley K, Zhang P, et al. Heterogeneous stromal signaling within the tumor microenvironment controls the metastasis of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2017;77:41–52.
43. Yamauchi M, Barker TH, Gibbons DL, et al. The fibrotic tumor stroma. *J Clin Invest* 2018;128:16–25.
44. Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, et al. Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2007;101:887–907. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266048> [Accessed April 28, 2014].
45. Neesse A, Michl P, Frese KK, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 2011;60:861–868.
46. Mahadevan D, Hoff DD Von. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1186–1197.
47. Comoglio PM, Trusolino L. Cancer: the matrix is now in control. *Nature* 2005;11:1156–1159.
48. Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, et al. Pancreatic fibrosis associated with age and ductal papillary hyperplasia. *Virchows Arch* 2005;447:800–805.
49. Hingorani SR, Ili EFP, Maitra A, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–450.
50. Shi C, Washington MK, Chaturvedi R, et al. Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction. *Lab Invest* 2014;94:409–421. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2014.10>.
51. Coleman SJ, Watt J, Arumugam P, et al. Pancreatic cancer organotypics: High throughput, preclinical models for pharmacological agent evaluation. *World J Gastroenterol* 2014;20:8471–8481.
52. Kadaba R, Birke H, Wang J, et al. Imbalance of desmoplastic stromal cell numbers drives aggressive cancer processes. *J Pathol* 2013;230:107–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359139> [Accessed May 7, 2014].
53. Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 2005;128:907–921.
54. Apte M V, Haber PS, Applegate TL. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998;43:128–133.
55. Bachem MG, Schneider E, Groß H, et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998;115:421–432. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508598702094>.
56. Apte M V, Haber PS, Darby SJ. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines : implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999;44:534–541.

57. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, et al. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 2000;80:47–55.
58. Schneider E, Schmid-kotsas A, Zhao J, et al. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Physiol* 2001;281:532–543.
59. Mews P, Phillips P, Fahmy R, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: Potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 2002;50:535–541.
60. Bachem MG, Zhou S, Buck K, et al. Pancreatic stellate cells—role in pancreas cancer. *Langenbeck's Arch Surg* 2008;393:891–900. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00423-008-0279-5>.
61. Shek FW-T, Benyon RC, Walker FM, et al. Expression of Transforming Growth Factor- β 1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis. *Am J Pathol* 2002;160:1787–1798. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000294401061125X>.
62. Phillips P a, Wu MJ, Kumar RK, et al. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut* 2003;52:677–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1773645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
63. Aoki H, Ohnishi H, Hama K, et al. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *AJP Cell Physiol* 2007;292:C259–C268. Available at: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00030.2006>.
64. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, et al. The pancreatic stellate cell : a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 2007;117:50–59.
65. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al. Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 β . *Cancer Res* 2004;64:1331–1337.
66. Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through β 1-integrin signaling. *Animals* 2011;71:3453–3458.
67. Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, et al. Pancreatic Stellate Cells and Pancreatic Cancer Cells : An Unholy Alliance. *Cancer Res* 2008;68:7707–7711.
68. Apte M V, Park S, Phillips PA, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 2004;29:179–187.
69. Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, et al. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 2010;177:2585–2596. Available at: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.090899>.

70. Apte M V., Wilson JS, Lugea A, et al. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology* 2013;144:1210–1219. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.11.037>.
71. Ishii G, Sangai T, Oda T, et al. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:232–240.
72. Scarlett CJ, Colvin EK, Pinese M, et al. Recruitment and activation of pancreatic stellate cells from the bone marrow in pancreatic cancer: A model of tumor-host interaction. *PLoS One* 2011;6:1–8.
73. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* 2012;148:349–361.
74. Haqq J, Howells LM, Garcea G, et al. Pancreatic stellate cells and pancreas cancer : Current perspectives and future strategies. *Eur J Cancer* 2014;50:2570–2582. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.06.021>.
75. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, et al. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;403:380–4.
76. Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, et al. Tumor-Stroma Interaction of Human Pancreatic Cancer: Acquired Resistance to Anticancer Drugs and Proliferation Regulation Is Dependent on Extracellular Matrix Proteins. *Pancreas* 2004;28:38–44.
77. Yoshida S, Ujiki M, Ding XZ, et al. Pancreatic Stellate Cells (PSCs) express cyclooxygenase-2 (COX-2) and pancreatic cancer stimulates COX-2 in PSCs. *Mol Cancer* 2005;4:1–9.
78. Neesse A, Wagner M, Ellenrieder V, et al. Pancreatic stellate cells potentiate proinvasive effects of SERPINE2 expression in pancreatic cancer xenograft tumors. *Pancreatology* 2007;7:380–385.
79. Arumugam T, Brandt W, Ramachandran V, et al. Trefoil factor 1 stimulates both pancreatic cancer and stellate cells and increases metastasis. *Pancreas* 2011;40:815–822. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747314>.
80. Sato N, Maehara N, Goggins M. Gene Expression Profiling of Tumor – Stromal Interactions between Pancreatic Cancer Cells and Stromal Fibroblasts Gene Expression Profiling of Tumor – Stromal Interactions between Pancreatic Cancer Cells and Stromal Fibroblasts. 2004:6950–6956.
81. Sherman MH, Yu RT, Engle DD, et al. Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell* 2014;159:80–93.
82. Wehr AY, Furth EE, Sangar V, et al. Analysis of the human pancreatic stellate cell secreted proteome. *Pancreas* 2011;40:557–566.

83. Yosimichi G, Nakanishi T, Nishida T, et al. CTGF / Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44 / 42 MAPK / extracellular-signal regulated kinase (ERK). *Eur J Biochem* 2001;268:6058–6065.
84. Day RM, Cioce V, Breckenridge D, et al. Differential signaling by alternative HGF isoforms through c-Met: Activation of both MAP kinase and PI 3-kinase pathways is insufficient for mitogenesis. *Oncogene* 1999;18:3399–3406.
85. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000;19:2548–2556. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1203551>.
86. Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut* 2013;62:317–326.
87. Duluc C, Moatassim-Billah S, Chalabi-Dchar M, et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol Med* 2015;7:735–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4459815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
88. Olive KP, Jacobetz M a, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* (80-) 2009;324:1457–61.
89. Neesse A, Michl P, Frese KK, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 2011;60:861–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966025> [Accessed May 6, 2014].
90. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, et al. Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;21:418–429. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>.
91. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2013;62:112–120.
92. Neesse A, Frese KK, Bapiro TE, et al. CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:12325–12330. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300415110>.
93. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* 2014;25:719–734. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814001755> [Accessed May 26, 2014].

94. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:735–747. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814001846> [Accessed May 26, 2014].
95. Froeling FEM, Kocher HM. Homeostatic Restoration of Desmoplastic Stroma Rather Than Its Ablation Slows Pancreatic Cancer Progression. *Gastroenterology* 2015;148:849–850. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.043>.
96. Froeling FEM, Feig C, Chelala C, et al. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-b-catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 2011;141:1486–1497.e14.
97. Funahashi J, Sekido R, Murai K, et al. Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development* 1993;119:433–446.
98. Takagi T, Moribe H, Kondoh H, et al. δ EF1 , a zinc finger and homeodomain transcription factor , is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development* 1998;125:21–31.
99. Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, et al. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 2008;135:579–88.
100. Ikeda K, Kawakami K. DNA Binding through Distinct Domains of Zinc-Finger-Homeodomain Protein AREB6 has Different Effects on Gene Transcription. *Eur J Biochem* 1995;233:73–82.
101. Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, et al. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* 1999;18:5073–84. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033568198&partnerID=tZOtx3y1>.
102. Su MT, Fujioka M, Goto T, et al. The Drosophila homeobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a numb-dependent lineage decision. *Development* 1999;126:3241–3251.
103. Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J* 2003;22:2443–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=155983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
104. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, et al. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* 2003;22:2453–2462.
105. Postigo AA, Dean DC. ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6683–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

106. Furusawa, T, Moribe H, Kondoh H HY. Identifiacion of CtBP1 and CtBP2 as Corepressor of Zinc Finger-Homeodomain Factor EF1. *Mol Cell Biol* 1999;19:8581–8590.
107. Sánchez-Tilló E, Siles L, Barrios O de, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res* 2011;1:897–912.
108. Aigner K, Dampier B, Descovich L, et al. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 2007;26:6979–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2899859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 7, 2014].
109. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24:2375–2385.
110. Guaita S, Puig I, Francí C, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* 2002;277:39209–39216.
111. Watanabe Y, Kawakami K, Hirayama Y, et al. Transcription factors positively and negatively regulating the Na,K-ATPase a1 subunit gene. *J Biochem* 1993;114:849–855.
112. Sánchez-Tilló E, Lázaro A, Torrent R, et al. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 2010;29:3490–3500.
113. Vandewalle C, Roy F Van, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:773–787.
114. Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, et al. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 2011;30:770–82.
115. Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001;7:1267–1278.
116. Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, et al. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 2006;25:4975–4985.
117. Spoelstra NS, Manning NG, Higashi Y, et al. The Transcription Factor ZEB1 Is Aberrantly Expressed in Aggressive Uterine Cancers. *Cancer Res* 2006;66:3893–3903.
118. Sayan AE, Griffiths TR, Pal R, et al. SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:14884–14889. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902042106>.
119. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, et al. A Transient, EMT-Linked Loss of Basement Membranes Indicates Metastasis and Poor Survival in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2006;131:830–840.

120. Dohadwala M, Yang SC, Luo J, et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: Prostaglandin E2 induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:5338–5345.
121. Gemmill RM, Roche J, Potiron VA, et al. ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2011;300:66–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.09.007>.
122. Singh M, Spoelstra NS, Jean A, et al. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers : a marker of aggressive disease. *Mod Pathol* 2008;21:912–923.
123. Graham TR, Zhau HE, Odero-marah VA, et al. Insulin-like Growth Factor-I – Dependent Up-regulation of ZEB1 Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 2008;68:2479–2488.
124. Wellner U, Schubert J, Burk UC, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009;11:1487–1495. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1998>.
125. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, et al. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett* 2012;325:42–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.024>.
126. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, et al. NF- κ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: Potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2007;26:711–724.
127. Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, et al. TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through dEF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* 2012;31:3190–3201.
128. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res* 2006;66:2725–2731.
129. Wang Z, Li Y, Kong D, et al. Acquisition of Epithelial-Mesenchymal Transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the Notch signaling pathway. *Cancer Res* 2010;69:2400–2407.
130. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009;69:5820–8.
131. Haddad Y, Choi W, McConkey D. The transcriptional repressor Delta EF1 controls the EMT phenotype and resistance to the EGFR inhibitor erlotinib in human head & neck squamous cell. *Clin Cancer Res* 2009;15:532–542. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2729136/>.

132. Bronsert P, Kohler I, Timme S, et al. Prognostic significance of Zinc finger expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery* 2014;156:97–108.
133. Galvan JA, Zlobec I, Wartenberg M. Expression of E-cadherin repressors SNAIL , ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2015;112:1944–1950.
134. Kurahara H, Takao S, Maemura K. Epithelial – Mesenchymal Transition and Mesenchymal – Epithelial Transition Via Regulation of ZEB-1 and ZEB-2 Expression in Pancreatic Cancer. *J Surg Oncol* 2012;105:655–661.
135. Wellner U, Brabletz T, Keck T. ZEB1 in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 2010;2:1617–28.
136. Krebs AM, Mitschke J, Losada ML, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol* 2017;19:518–529.
137. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72:2457–2467.
138. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: Split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:517–531.
139. Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2008;1786:178–187. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.05.001>.
140. Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in ras superfamily function. *Curr Biol* 2005;15:563–574.
141. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL. Ras superfamily GEFs and GAPs-validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 2010;10:842–857.
142. Maertens O, Cichowski K. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Adv Biol Regul* 2014;55:1–14. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2014.04.002>.
143. Osterop A, Medema R, Zon G vd, et al. Epidermal-growth-factor receptors generate Ras-GTP more efficiently than insulin receptors. *Eur J Biochem* 1993;212:477–482.
144. Logsdon CD, Lu W. The Significance of Ras Activity in Pancreatic Cancer Initiation. *Int J Biol Sci* 2016;12:338–346.
145. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 2011;11:761–774. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3106>.
146. Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 2015;6:1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7744>.

147. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* (80-) 2008;321:1801–1806. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772397><http://www.sciencemag.org/content/321/5897/1801><http://www.sciencemag.org/content/321/5897/1801.full.pdf>.
148. Lemstrova R, Brynychova V, Hughes DJ, et al. Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome. *Oncol Lett* 2017;14:5980–5988.
149. Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, et al. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Mol Cancer Res* 2015;13:1325–1335. Available at: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>.
150. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:228–239.
151. Yan L, McFaul C, Howes N, et al. Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups. *Gastroenterology* 2005;128:2124–2130.
152. Parsons BL, Meng F. KRAS mutation in the screening, prognosis and treatment of cancer. *Biomark Med* 2009;3:757–769. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20477713><http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/bmm.09.95>.
153. Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, et al. Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 1996;110:227–231.
154. Yakubovskaya MS, Spiegelman V, Luo FC, et al. High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 1995;63:810–814. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8847139>.
155. Hermann PC, Sancho P, Cañamero M, et al. Nicotine promotes initiation and progression of KRAS-induced pancreatic cancer via gata6-dependent dedifferentiation of acinar cells in mice. *Gastroenterology* 2014;147:1119–1133.e4.
156. Carrière C, Young AL, Gunn JR, et al. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382:561–565. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.068>.
157. Nicke B, Tseng MJ, Fenrich M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of RasN17 inhibits specific CCK actions on pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1999;276:G499-506. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950825>.

158. Holtz BJ, Lodewyk KB, Sebolt-Leopold JS, et al. ERK activation is required for CCK-mediated pancreatic adaptive growth in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G700-10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104499>.
159. Kopnin PB, Agapova LS, Kopnin BP, et al. Repression of Sestrin Family Genes Contributes to Oncogenic Ras-Induced ROS Up- Regulation and Genetic Instability. *Cancer Res* 2009;67:4671–4678.
160. Castellano E, Downward J. Ras interaction with PI3K: More than just another effector pathway. *Genes and Cancer* 2011;2:261–274.
161. Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, et al. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell* 2005;7:533–545.
162. Eser S, Reiff N, Messer M, et al. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell* 2013;23:406–420.
163. Collisson EA, Trejo CL, Silva JM, et al. A Central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2012;2:685–693.
164. Baer R, Planque L, Lulka H, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 a. 2014:2621–2635.
165. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, et al. Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 2012;149:656–670. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>.
166. Collins MA, Brisset JC, Zhang Y, et al. Metastatic Pancreatic Cancer Is Dependent on Oncogenic Kras in Mice. *PLoS One* 2012;7.
167. Muzumdar MD, Chen P-Y, Dorans KJ, et al. Survival of pancreatic cancer cells lacking KRAS function. *Nat Commun* 2017;8:1090. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00942-5>.
168. Sun Q, Burke JP, Phan J, et al. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew Chemie - Int Ed* 2012;51:6140–6143.
169. Appels NMGM, Beijnen JH, Schellens JHM. Development of Farnesyl Transferase Inhibitors: A Review. *Oncologist* 2005;10:565–578. Available at: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.10-8-565>.
170. Nickerson S, Joy ST, Arora PS, et al. An Orthosteric Inhibitor of the RAS-SOS Interaction. *Nat Chem Biol* 2011;7:585–587. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.612>.
171. Chandra A, Grecco HE, Pisupati V, et al. The GDI-like solubilizing factor PDEδ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol* 2012;14:148–158. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2394>.

172. Weisz B, Giehl K, Gana-Weisz M, et al. A new functional Ras antagonist inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice. *Oncogene* 1999;18:2579–2588.
173. Collins MA, Pasca M. Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer. 2014;4:1–8.
174. Chuang HC, Huang PH, Kulp SK, et al. Pharmacological strategies to target oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer. *Pharmacol Res* 2017;117:370–376. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.006>.
175. Zeitouni D, Pylayeva-gupta Y, Der CJ, et al. KRAS Mutant Pancreatic Cancer : No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers (Basel)* 2016;8:1–22.
176. Charo C, Holla V, Arumugam T, et al. Prostaglandin E2 regulates pancreatic stellate cell activity via the EP4 receptor. *Pancreas* 2013;42:467–474.
177. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, et al. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res* 2007;67:9518–9527.
178. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, et al. Oncogenic Kras-Induced GM-CSF Production Promotes the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell* 2012;21:836–847. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.024>.
179. Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, et al. Tumor-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Regulates Myeloid Inflammation and T Cell Immunity in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 2012;21:822–835. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.025>.
180. Tape CJ, Ling S, Dimitriadi M, et al. Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. *Cell* 2016;165:1–11.
181. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79–89.
182. Shin S, Dimitri CA, Yoon S-O. ERK2 but Not ERK1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transformation via DEF Motif-Dependent Signaling Events. *Mol Cell* 2010;38:114–127. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.020>.
183. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop-a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 2010;11:670–677.
184. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:178–196. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3758>.
185. Liu Y, Lu X, Huang L, et al. Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat Commun* 2014;5:1–9.

186. Liu Y, Sánchez-tilló E, Lu X, et al. Sequential Inductions of the ZEB1 Transcription Factor Caused by Mutation of Rb and Then Ras Proteins Are Required for Tumor Initiation and Progression. *J Biol Chem* 2013;288:11572–11580.
187. Liu Y, Sánchez-Tilló E, Lu X, et al. Rb1 family mutation is sufficient for sarcoma initiation. *Nat Commun* 2013;4.
188. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, et al. Progression Model for Pancreatic Cancer Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2969–2972.
189. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 2000;156:1821–1825.
190. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor- β signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* 2006;20:3147–3160.
191. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 2011;17:500–503. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2344>.
192. Pérez-Mancera PA, Guerra C, Barbacid M, et al. What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology* 2012;142:1079–1092. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.002>.
193. Lebleu VS, Taduri G, Teng Y, et al. Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis Valerie. *Nat Med* 2014;19:1047–1053.
194. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, et al. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. *Cancer Res* 2013;73:2345–2356.
195. Huch M, Bonfanti P, Boj SF, et al. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J* 2013;32:2708–2721. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.204>.
196. Boj SF, Hwang C II, Baker LA, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015;160:324–338.
197. Hou S, Tiriach H, Sridharan BP, et al. Advanced Development of Primary Pancreatic Organoid Tumor Models for High-Throughput Phenotypic Drug Screening. *SLAS Discov* 2018.
198. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, et al. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1984;44:717–726.
199. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47.

200. Strobel O, Rosow DE, Rakhlin EY, et al. Pancreatic Duct Glands are Distinct Ductal Compartments that React to Chronic Injury and Mediate Shh-induced Metaplasia. *Gastroenterology* 2010;138:1166–1177.
201. Finn RS, Press MF, Dering J, et al. Estrogen Receptor , Progesterone Receptor , Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2), and Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Benefit From Lapatinib in a Randomized Trial of Paclitaxel With Lapatinib or Placebo As First-Line Treatment i. *J Clin Oncol* 2009;27.
202. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2017;214:579–596.
203. Erkan M, Michalski CW, Rieder S, et al. The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1155–1161.
204. Rickmann M, Vaquero EC, Malagelada JR, et al. Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology* 2007;132:2518–32.
205. Huang H, Daniluk J, Liu Y, et al. Oncogenic K-Ras requires activation for enhanced activity. *Oncogene* 2014;33:532–535.
206. Zhang Y, Iv JPM, Yan W, et al. Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic Carcinogenesis. 2013:4909–4923.
207. Hu Y, Wan R, Yu G, et al. Imbalance of Wnt / Dkk Negative Feedback Promotes Persistent Activation of Pancreatic Stellate Cells in Chronic Pancreatitis. *PLoS One* 2014;9:1–13.
208. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Prognostic Significance of Activated Akt Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 2004;10:2846–2850.
209. Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, et al. Incidence , mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. 2003:2110–2115.
210. Apte M, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cell : physiologic role , role in fibrosis and cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:416–423.
211. Hakam A, Fang Q, Karl R, et al. Coexpression of IGF-1R and c-Src proteins in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2003;48:1972–1978. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627343>.
212. Valsecchi ME, McDonald M, Brody JR, et al. Epidermal growth factor receptor and insulinlike growth factor 1 receptor expression predict poor survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer* 2012;118:3484–3493.
213. Yang J, Waldron RT, Su H, et al. Insulin promotes proliferation and fibrosing responses in activated pancreatic stellate cells. 2016:675–687.

214. Ueda S, Ogata S, Tsuda H, et al. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;29:e1-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15211117>.
215. Ardito CM, Gru BM, Takeuchi KK, et al. EGF Receptor Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis. *2012*:304–317.
216. Zeller E, Hammer K, Kirschnick M, et al. Mechanisms of RAS / b -catenin interactions. *Arch Toxicol* 2013;87:611–632.
217. Gnatenko DA, Kopantsev EP, Sverdlov ED. The Role of the Signaling Pathway FGF / FGFR in Pancreatic Cancer. *Biochem (Moscow), Suppl Ser B Biomed Chem* 2017;11:101–110.
218. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. α -Smooth Muscle Actin Expressing Stroma Promotes an Aggressive Tumor Biology in Pancreatic. *Pancreas* 2010;39:1254–1262.
219. Chang Y, Tsai C-H, Lai Y-L, et al. Arecoline-induced myofibroblast transdifferentiation from human buccal mucosal fibroblasts is mediated by ZEB1. *J Cell molecular Med* 2014;18:698–708.
220. Carapu??a EF, Gemenetzidis E, Feig C, et al. Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol* 2016;239:286–296.

ANEXO

Zeb1 in Stromal Myofibroblasts Promotes *Kras*-Driven Development of Pancreatic Cancer

Irene Sangrador¹, Xavier Molero², Fiona Campbell³, Sebastià Franch-Expósito⁴, Maria Rovira-Rigau⁵, Esther Samper¹, Manuel Domínguez-Fraile¹, Cristina Fillat⁵, Antoni Castells^{1,6}, and Eva C. Vaquero^{1,6}



Abstract

The transcription factor Zeb1 has been identified as a crucial player in *Kras*-dependent oncogenesis. In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), Zeb1 is highly expressed in myofibroblasts and correlates with poor prognosis. As *Kras* mutations are key drivers in PDAC, we aimed here to assess the necessity of Zeb1 for *Kras*-driven PDAC and to define the role of Zeb1-expressing myofibroblasts in PDAC development. Genetically engineered mice with conditional pancreatic *Kras*^{G12D} and *Trp53* mutations (KPC) were crossed with *Zeb1* haploinsufficient mice (*Z*^{+/-}). Extensive PDAC was prominent in all 20-week-old KPC;*Z*^{+/-} mice, whereas only low-grade precursor lesions were detected in age-matched KPC;*Z*^{+/-} littermates, with PDAC developing eventually in KPC;*Z*^{+/-} aged animals. Zeb1 expression in myofibroblasts occurred early in tumorigenesis and *Zeb1* haploinsufficiency retarded native expansion of stromal myofibroblasts during precursor-to-cancer progression. *Zeb1* downregu-

lation in mPSC repressed their activated gene profile, impaired their migratory and proliferative activity, and attenuated their tumor-supporting features. Conditioned media from *Z*^{+/-} mouse-activated (myofibroblast-like) pancreatic stellate cells (mPSC) boosted Ras activity in pancreatic cancer cells carrying mutant *Kras*; this effect was not observed when using conditioned media from *Z*^{+/-} mPSC, revealing a paracrine cooperative axis between Zeb1-expressing PSC and oncogenic *Kras*-bearing tumor cells. We conclude that Zeb1-expressing stromal myofibroblasts enable a heterotypic collaboration with the *Kras*-fated epithelial compartment, thus supporting pancreatic malignancy.

Significance: Zeb1 expression in stromal myofibroblasts supports PDAC development via collaboration with the epithelial compartment bearing oncogenic *Kras* mutations. *Cancer Res*; 78(10); 1–14. ©2018 AACR.

Introduction

Pancreatic cancer development is no longer viewed as a successful crusade of a clone of cells endowed with oncogenic supplies. Instead, tissue microenvironment surrounding neoplastic cells has emerged as a critical collaborator with a proven influence on neighboring tumor cell (1). The stromal tumor compartment, also known as desmoplastic reaction, provides a permissive territory that enables an advantageous cross-talk between stromal and cancer cells. Myofibroblasts are the most abundant cell type in pancreatic desmoplasia. They emerge from resident quiescent pancreatic stellate cells (PSC) that differentiate into highly proliferating α -smooth muscle

actin (α SMA) expressing cells and prolific producers of extracellular matrix (ECM) proteins and active soluble factors (2, 3). Desmoplastic PSCs count on a rich secretome associated with proliferation, fibrosis and cell survival (4) that provides tumor-supporting effects through paracrine communication with cancer cells, favoring tumor growth and metastatic dissemination (3, 5–7). In mouse models, transcriptional reprogramming of active mouse PSCs (mPSC) into quiescence slows tumor progression and improves the efficacy of chemotherapy by disrupting mPSC–tumor cell cross-talk (8). These pieces of evidence undermine the need to identify stromal targets aimed to interrupt the cooperation of non-cancer cell–autonomous mechanisms with the oncogenic machinery of cancer cells.

Activating mutations in the *Kras* proto-oncogene are virtually universal and a hallmark in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). They arise early in human pancreatic low-grade precursor lesions [pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN); refs. 9, 10]. Genetically engineered mouse PDAC models, which fully mimic the human disease, have demonstrated that *Kras* oncogene is crucial for both initiation and maintenance of the disease (11). Endogenous expression of oncogenic *Kras*^{G12D} (12) in developing mouse pancreas or inducible oncogenic *Kras* (11) in adult pancreas recapitulates the full spectrum of human pancreatic precursor lesions, from acinar-to-ductal metaplasia (ADM), to low- and high-grade PanINs, with >80% penetrance by 7 to 10 months. However, these lesions rarely progress to PDAC in aging animals (12). Noteworthy, concurrent genetic inactivation of tumor suppressor genes, such as *Trp53* (13), substantially accelerates the progression to PDAC in the context of *Kras* mutation.

¹Gastrointestinal and pancreatic oncology research group, Hospital Clinic, Barcelona, CiberEHD, Spain. ²Exocrine Pancreas Research Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Autonomous University of Barcelona, CiberEHD, Barcelona, Spain. ³Department of Pathology, Royal Liverpool and Broadgreen University Hospitals NHS Trust, Liverpool, United Kingdom. ⁴Gastroenterology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, CiberEHD, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵Gene Therapy and Cancer, IDIBAPS, CiberER, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Eva C. Vaquero, Hospital Clinic of Barcelona, CiberEHD, IDIBAPS, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. Phone: 932-27-54-00 (2675); E-mail: evaquero@comb.cat

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1882

©2018 American Association for Cancer Research.

Importantly, additional studies in genetic mouse models have revealed that it is not the mere presence of *Kras* but the magnitude of Ras enzymatic activity that dictates the success of pancreatic tumor progression (14). Mutant *Kras* is not constitutively active and it becomes hyperactivated upon external stimuli (15). In this regard, a variety of *Kras* activators, such as EGF, TGF α , CCK, PGE $_2$, and lipopolysaccharide, have been demonstrated to initiate carcinogenesis in the setting of pancreatic *Kras* mutation (15–19). On this basis, it can be predicted that tumor microenvironment, which is extremely rich in inflammatory stromal cues, supports malignancy in a non-cell-autonomous way by eliciting Ras enzymatic hyperactivation in epithelial cells bearing mutated *Kras*.

The transcriptional repressor Zeb1 (Zinc finger E-box binding homebox 1) is widely recognized as inducer of tumor invasion, metastasis, and resistance to chemotherapy and radiotherapy, in large part by mediating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells (20). In human PDAC, Zeb1 becomes aberrantly expressed, mostly in stromal myofibroblasts (21, 22), and in a lower proportion in undifferentiated cancer cells at the tumor invasive front (23, 24) and scattered in the stromal compartment (25). Of note, its expression in both stromal (21) and tumor (24, 26) cells has been linked to early recurrence and poor prognosis of human PDAC. Mechanistic *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that Zeb1 is a target of the Ras pathway and that Zeb1 induction is necessary for the tumorigenic effect of *Ras*-transformed mouse embryo fibroblasts (27). On this basis, it has been shown that genetic monoallelic *Zeb1* deletion in mice is sufficient to prevent the progression of adenoma to adenocarcinoma in an oncogenic *Kras*-driven lung cancer model (28). As PDAC is a *Kras*-driven tumor, we reasoned that Zeb1 is necessary for PDAC development. We report that monoallelic genetic *Zeb1* reduction hinders the development of *Kras*-driven PDAC in mouse. Mechanistically, we describe a new oncogenic Zeb1 pathway beyond EMT, which consists in enhancement of tumor promoting properties of activated mPSCs to foster cancer progression. We provide *in vitro* insights showing that Zeb1 in mPSCs supports their activating phenotype and protumoral-supporting features while enables paracrine cooperation with cancer cell-autonomous properties by boosting oncogenic *Kras* activity.

Materials and Methods

Mice

Kras^{LSL-G12D}, *p53*^{LSL-R172H} (Dr. J. Tylers, Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD), and *Pdx1-Cre* (Dr. Tuveson, University of Cincinnati) strains, in a C57BL/6 background, were interbred to generate *KRas*^{LSL-G12D}; *p53*^{LSL-R172H}; *Pdx1-Cre* mutant mice (KPC), as previously described (13). These mice were backcrossed with C57BL/6 mice with full expression (*Zeb1*^{+/+}) or monoallelic inactivation (*Zeb1*^{+/-}) of *Zeb1* to yield KPC;*Z*^{+/+} and KPC;*Z*^{+/-} mice. PanIN lesions were categorized following the Classification System and Recommendations from the Baltimore Consensus Meeting. Animal studies were approved by the UB Animal Experimental Ethical Committee (CEEA) and by the local authorities of the Generalitat de Catalunya.

Mouse

Mouse PSCs (mPSC) were isolated from pancreata of adult *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mice as previously described by Rickmann and colleagues (29).

Mouse pancreatic adenocarcinoma cell lines

Emyc-3 cells were generated and provided by C. Fillat (30); Panc02 cells were generated by Corbett and colleagues (31) and provided by Dr. M. Gironella. Cells were not authenticated by the authors. KPC cells were generated in our laboratory from pancreatic tumors of 20-week-old KPC;*Z*^{+/+} mice with the Cancer Cell Isolation Kit (Panomics) following the manufacturer's instructions. Interspecies contamination was tested by PCR routinely and only *Mycoplasma*-negative cultures were used. Cell lines did not surpass 10 passages between thawing and use.

Subcutaneous coinjection of tumor cells and mPSCs

Six eight-week-old immunocompetent female mice (C57BL/6) were subcutaneously injected on both flanks with KPC cells (2×10^5), with KPC cells + *Zeb1*^{+/+} mPSC and with KPC cells + *Zeb1*^{+/-} mPSC (2×10^5 KPC cells; 8×10^5 mPSC). Cells for tumor injection were resuspended in DMEM/F-12 solution + 50% Matrigel in a final volume of 100 μ L. Tumor formation was monitored by taking two-dimensional measurements of each tumor in the course of the following 20 days. Then mice were sacrificed and the tumors were removed, measured, and weighed.

Immunohistochemistry

Antigen retrieval was done with citrated buffer (10 mmol/L, pH = 6). Blockade was done using 3% normal goat serum (NGS) in blocking solution (Dako). Primary antibodies were incubated as detailed in Supplementary Table S1. After incubation with secondary antibody (Dako), DAB (3, 3'-diaminobenzidine, Dako) was added. Finally, hematoxylin counterstaining was performed.

Immunofluorescence

Antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer and Tween-20 (0.1 μ L/mL). Slices were incubated in blocking solution followed by primary antibody as detailed in Supplementary Table S1. Images were obtained with a fluorescence microscope (NIKON Eclipse E50i) and analyzed using the software Isis Fluorescence Imaging System (Metasystems).

Migration wound closure assay

Cells were seeded at confluence and cultured in complete media for 24 hours. The day after seeding, cells were incubated in FBS-free medium during 24 hours for cell synchronization. The experiment started with medium replacement by the corresponding treatment and a line scratch within the confluent monolayer. Gap closure was calculated with images taken at 0 and 24 hours.

Matrigel invasion assay

Invasion was assessed using BioCoat Matrigel Invasion Chambers of 8- μ m pore size membranes (Corning). Neoplastic cells were seeded into each insert and incubated in 0.3% FBS-supplemented control medium or mPSC conditioned media (CM) for 24 hours. Differential Quick Stain Kit (Polysciences) was used to stain invading cells.

Proliferation assay

Proliferation was assessed after 1, 3, and 5 days by measuring total cell DNA with the CyQUANT cell proliferation assay kit (Molecular Probes) following manufacturer's instructions. Fluorescence was measured in a Fluostar Optima microplate reader at Ex/Em 485/520 nm.

RNA interference

mPSCs were incubated with 0.3 $\mu\text{mol/L}$ Zeb1 siRNA duplex (3'-AAUUUGUACCUUGUCACAAGACCAG-5') or with 10 nmol/L *Kras* siRNA duplex (3'-AAUUUGUUCUCUAUAAU-GGtg-5'; Integrated DNA Technologies). Low GC siRNA (Integrated DNA Technologies) was used as a negative control. Transfection media were prepared with lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) and Opti-Mem reduced serum media (Life Technologies) according to manufacturer's instructions.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was prepared using RNeasy Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qRT-PCR was performed using the TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) and detected by the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). All primers were provided by Applied Biosystems.

Western blotting

Protein lysates were separated using standard methods and incubated with primary antibodies as detailed in Supplementary Table S2. Proteins were detected using HRP-conjugated antibodies and visualized in the image reader LAS4000 (Fujifilm).

DNA fragmentation assay

Apoptosis was determined using the Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche) following the manufacturer's instructions. DNA fragmentation values were normalized to total DNA from each sample as measured with the CyQUANT cell proliferation assay kit.

Ras pull down assay

Ras activity was determined using the Pan-Ras Activation Assay Kit (Cell Biolabs) following manufacturer's instructions. Equal amounts of protein lysates were incubated with agarose beads coated with Raf1 Ras-binding domain and active Ras was then analyzed by immunoblotting using anti-pan-Ras antibody. Five percent of total lysates were used to assess total Ras protein.

Gene expression microarray

Transcriptomic analysis was performed using the SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray G4852B (Agilent). Microarray data are deposited in GEO (GSE110814). Raw data were analyzed with the Limma statistical package. We used Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems) to analyze the functional networks and canonical pathways enriched with genes of PSCs samples.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Student *t* test was used for paired data. ANOVA with Newman-Keuls *posthoc* test was used for multiple *t* test comparisons of the same dataset. Significance was accepted at $P < 0.05$.

Supplemental information

It includes Supplementary Tables and Figs. S1, S2, and S3.

Results

Zeb1 haploinsufficiency delays the development of *Kras*-driven pancreatic adenocarcinoma

Because mice with homozygous *Zeb1* deletion are not viable, we used *Zeb1* haploinsufficient mice (*Zeb1*^{+/-} mice). We gener-

ated *KPC;Z*^{+/-} and *KPC;Z*^{+/+} strains and analyzed their pancreata at 20 weeks of age. *Zeb1*^{+/-} mice exhibited normal gross pancreatic appearance and no morphologic abnormalities at microscopic examination. Histologic analysis revealed that pancreata of all *KPC;Z*^{+/+} mice were completely replaced by diffuse ductal invasive adenocarcinoma, predominantly with well- and moderately well differentiation, intermixed with abundant desmoplastic stroma. In sharp contrast, pancreata from *KPC;Z*^{+/-} animals showed large areas of parenchyma replaced by ADM and low-grade PanIN lesions embedded in an expanded stromal reaction (Fig. 1A). Importantly, *KPC;Z*^{+/-} mice did not harbor any high-grade PanIN or adenocarcinoma lesion (Fig. 1B). Alcian blue staining (used to identify intracellular mucin accumulating in PanIN cells) showed widespread PanIN lesions in *KPC;Z*^{+/-} pancreata, in contrast to sparse mucin staining in *KPC* mice carrying wild-type *Zeb1* alleles (Fig. 1C), demonstrating a less advanced oncogenic transformation when *Zeb1* expression is restricted. CK19 staining (Fig. 1C, middle) confirmed the ductal nature of precursor lesions in *KPC;Z*^{+/-} and adenocarcinoma in *KPC;Z*^{+/+} pancreata, proving that *Zeb1* haploinsufficiency does not modify the ductal phenotype of the lesions. Of note, the area of CK19-positive ductal structures was smaller in *KPC;Z*^{+/-} pancreata than in littermate *KPC;Z*^{+/+} mice, again corroborating a less extensive neoplastic transformation in *Zeb1* haploinsufficient mice (Fig. 1C).

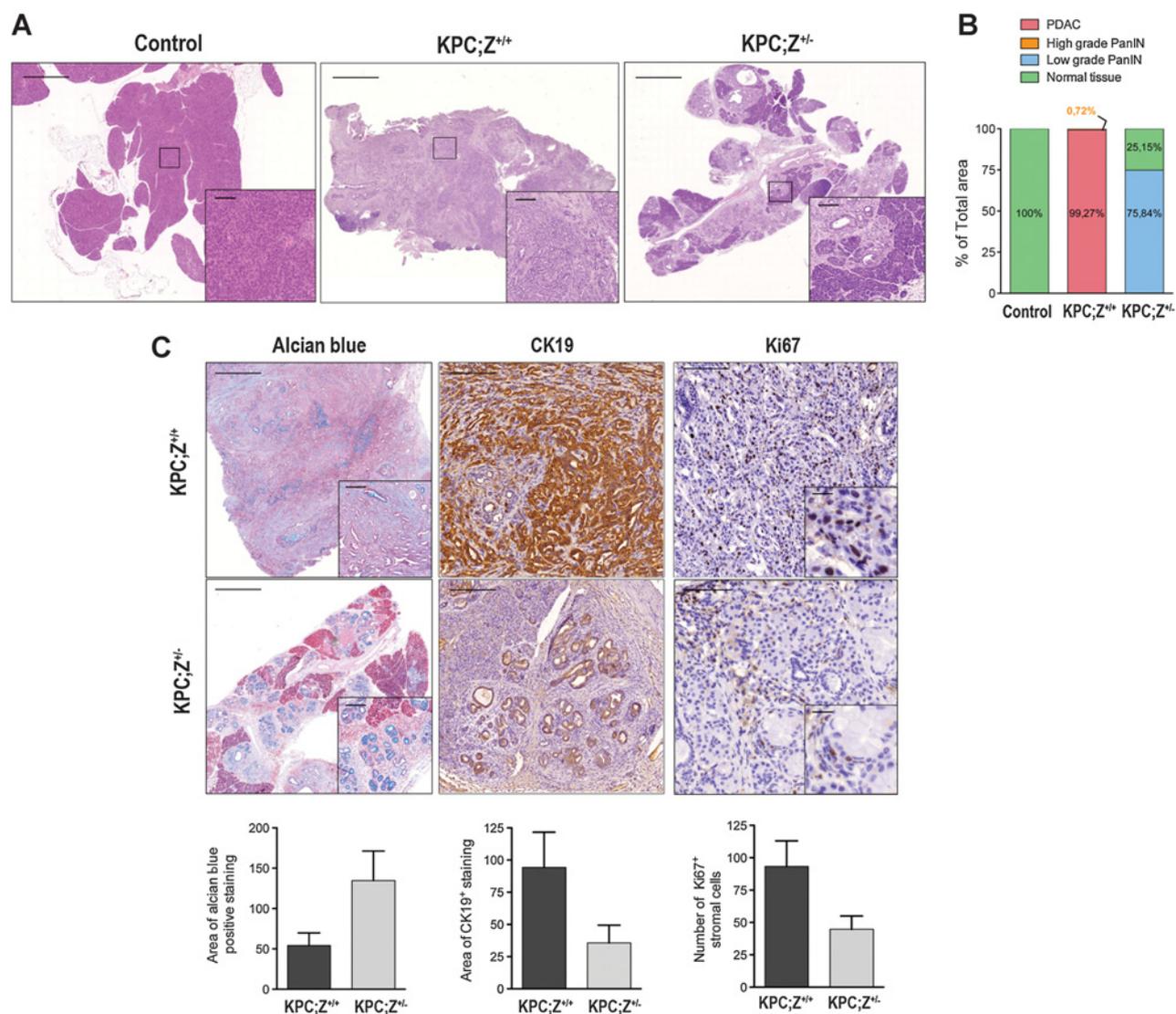
Pancreatic cell proliferation assessed by Ki-67 immunostaining was 4-fold lower in *KPC;Z*^{+/-} mice than in *KPC;Z*^{+/+} (Fig. 1C). Ki-67 staining was distributed in cancer and stromal cells in *KPC;Z*^{+/+} pancreata, whereas in *KPC;Z*^{+/-} mice Ki-67 was mostly restricted to stromal cells and scarcely evident in low-grade PanIN cells.

In order to evaluate the long-term effects of *Zeb1* haploinsufficiency in *Kras*-driven cancer, pancreata were harvested from 30-week-old *KPC;Z*^{+/-} mice. Pancreatic tumors also developed in aged animals, showing similar histopathological features to tumors formed in 20-week-old *KPC;Z*^{+/+} animals (Supplementary Fig. S1).

Overall, these observations indicate that, in the setting of *Kras* mutation, *Zeb1* haploinsufficiency delays PDAC development, suggesting that *Zeb1* is a key mediator of *Kras*-driven oncogenesis.

Zeb1 is predominantly expressed in stromal myofibroblasts associated with preneoplastic and cancer lesions

We next aimed to characterize *Zeb1* expression in pancreata from *KPC* mice with and without monoallelic *Zeb1* inactivation. *Zeb1* immunopositivity was abundant in 20-week-old *KPC;Z*^{+/+} pancreata and it was also present, but in a lower proportion, in aged-matched *KPC;Z*^{+/-} littermates (Fig. 2A). *Zeb1* immunopositivity was mostly concentrated in the stromal compartment surrounding precursor and cancer lesions regardless the genetic *Zeb1* background. Nuclear *Zeb1* was occasionally identified in cancer cells of *KPC;Z*^{+/+} pancreata and within the PanIN epithelium of *KPC;Z*^{+/-} tissues (Supplementary Fig. S2A). Quantitation of stromal *Zeb1*-positive cells (Fig. 2B) revealed half reduction in *KPC;Z*^{+/-} pancreata compared with *KPC;Z*^{+/+} counterparts. We additionally scored the staining intensity of *Zeb1*-positive nuclei and found that it was markedly dimmed in *KPC;Z*^{+/-} animals, revealing that *Zeb1* monoallelic deletion also resulted in a lower *Zeb1* nuclear load (Fig. 2C). A large proportion of stromal *Zeb1*-positive cells in both *KPC;Z*^{+/+} and *KPC;Z*^{+/-} pancreata were

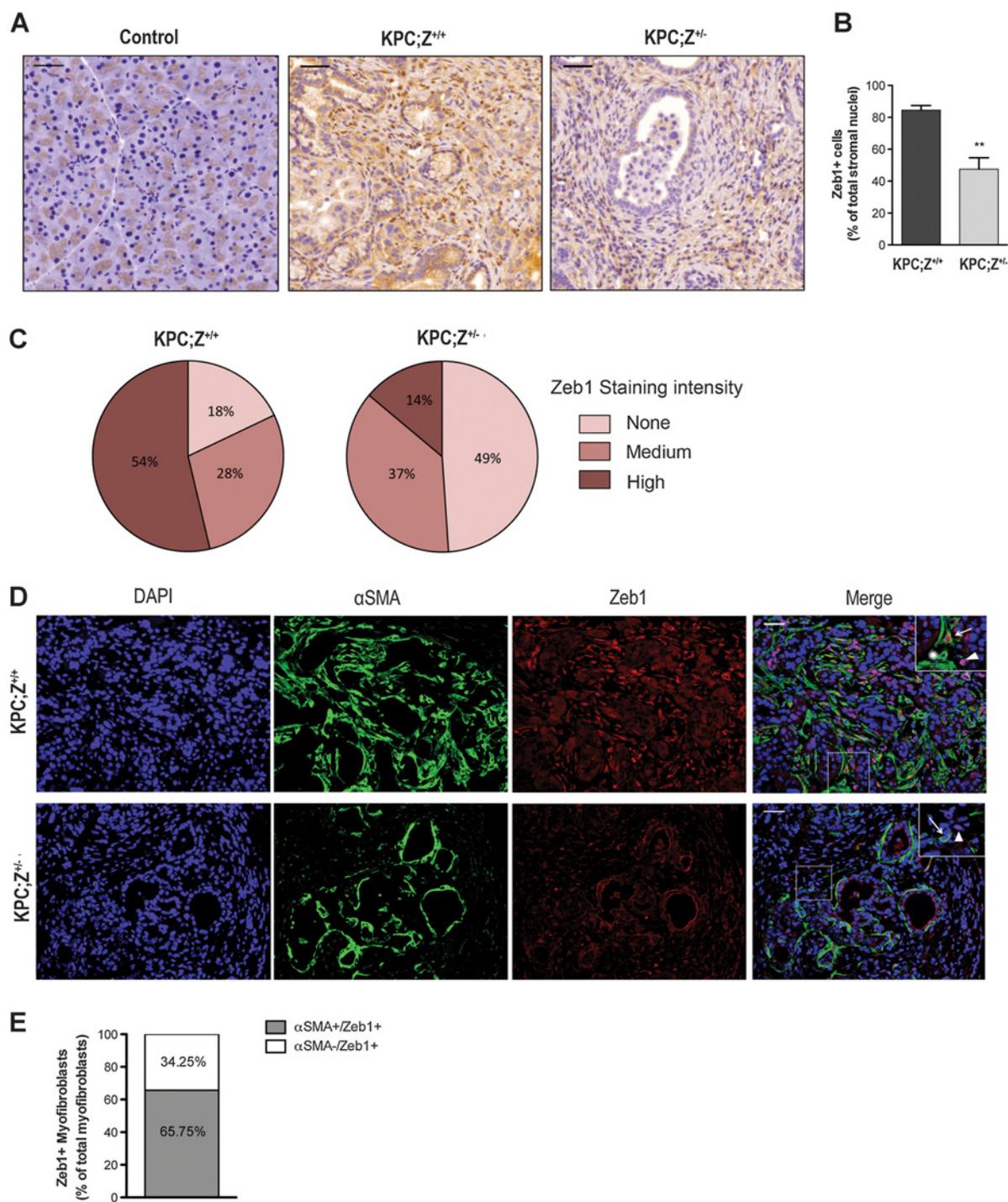
**Figure 1.**

Monoallelic *Zeb1* deletion slows the development of PDAC in *Pdx1-Cre;LSL-KRas^{G12D};p53^{R172H}/+* mice. **A** and **B**, Representative images of hematoxylin and eosin staining of pancreata from 20-week-old control, KPC;*Z*^{+/+} (*n* = 5), and KPC;*Z*^{+/-} mice (*n* = 4; **A**) and corresponding quantification of the mean percentage of histologically normal, PDAC, and PanIN areas (**B**). Insets show a high magnification view of sections marked by the box. Scale bars, 2,000 μ m for main panels and 200 μ m for insets. Bars show mean \pm SEM of five randomly selected fields from the pancreatic section of each mouse. **C**, Representative images of Alcian blue (scale bars, 1,000 μ m for main panels and 200 μ m for insets), CK19 (scale bar, 200 μ m), and Ki-67 (scale bars, 100 μ m for main panels and 50 μ m for insets) staining in KPC;*Z*^{+/+} (*n* = 5) and KPC;*Z*^{+/-} (*n* = 4) pancreata of 20-week-old mice. Insets show a high-magnification image of Alcian blue and Ki-67-positive cells. Relative quantification of each staining is shown in bottom panels. Sections were scanned and the digital images analyzed for the relative stained surface area (in pixels) using ImageJ. For Alcian blue and CK19, quantification bars represent the mean \pm SEM of stained area in at least 5 fields from the pancreatic sections of 4 to 5 different mice. Quantitation of Ki-67 positive cells represents total number of positive nuclei per field ($\times 20$).

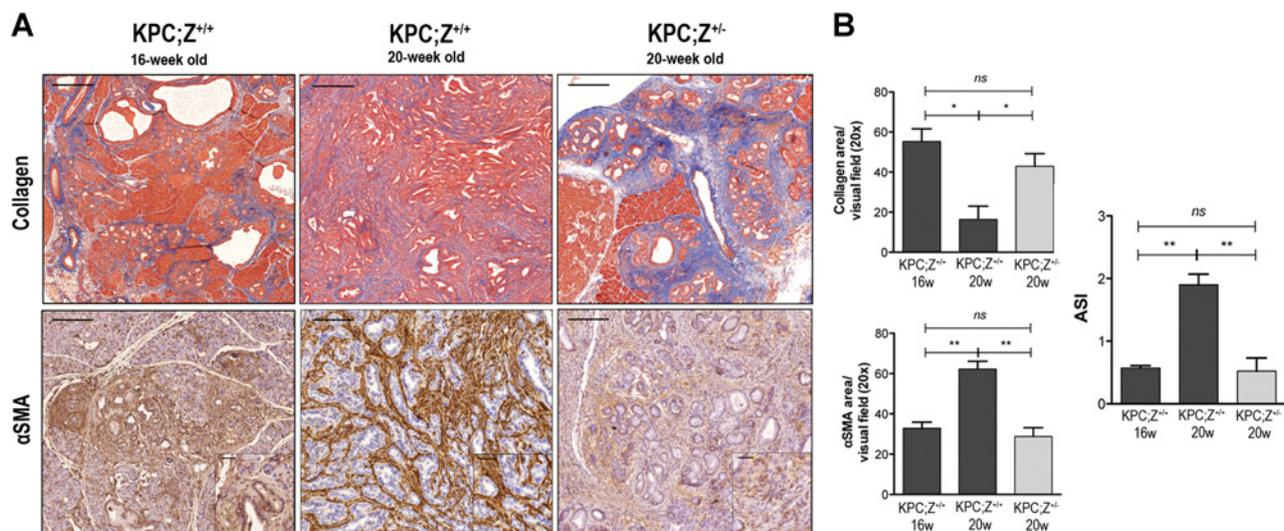
phenotypically consistent with fibroblasts (spindle shape cells with oval nuclei), whereas a few cells were recognized as macrophages, endothelial cells, and lymphocytes (Supplementary Fig. S2B–S2E).

To better identify myfibroblasts expressing *Zeb1*, we performed coimmunolabeling of α SMA (a characteristic myfibroblast marker) and *Zeb1* (Fig. 2D). In the stroma of KPC;*Z*^{+/+} pancreatic tumors, α SMA⁺/*Zeb1*⁺ colocalized in around 66% of stromal cells whereas the remaining *Zeb1*⁺ nuclei corresponded to nonmyfibroblastic α SMA⁻/*Zeb1*⁺

cells (Fig. 2E). This staining composition reveals the assorted cellularity of the tumor stroma (α SMA⁺ myfibroblasts, α SMA⁻ fibroblasts, immune cells, delaminated neoplastic cells) and it evidences that stromal *Zeb1* is largely, although not exclusively, expressed in stromal myfibroblasts. Overall, these data demonstrate that pancreatic lesion developed in KPC;*Z*^{+/-} contain a conspicuous lower density of the overall myfibroblast population as compared with those generated in KPC;*Z*^{+/+} mice, most of them showing no or dimmed *Zeb1* nuclear immunostaining.

**Figure 2.**

Zeb1 is mainly expressed in stromal myofibroblasts associated with precursor and cancer lesions and its abundance is reduced in *Zeb1* haploinsufficient mice. **A** and **B**, Representative images of Zeb1 immunostaining in pancreatic sections (scale bar, 100 μ m) from 20-week-old control, KPC;Z^{+/+} ($n = 5$), and KPC;Z^{+/-} mice ($n = 4$; **A**) and corresponding quantification of Zeb1-positive stromal nuclei as a percentage of all stromal nuclei per field (**B**). Bars represent the mean \pm SEM of five randomly selected fields from the pancreatic section for each mouse. **C**, Pie chart depicting the distribution of relative nuclear Zeb1-staining intensity in stromal nuclei in pancreatic sections from 20-week-old KPC;Z^{+/+} ($n = 5$) and KPC;Z^{+/-} ($n = 4$) mice. For each pancreas, at least 5 randomly selected fields were evaluated. **D**, Representative images of α SMA (green) and Zeb1 (red) dual-immunofluorescence in pancreatic sections from 20-week-old KPC;Z^{+/+} ($n = 3$) and KPC;Z^{+/-} ($n = 2$) mice. Counterstain with DAPI (blue) for nuclei. Insets show high-magnification images (scale bars, 100 μ m for main panels and 50 μ m for insets). Arrows, Zeb1-expressing myofibroblasts; asterisk, non-Zeb1-expressing myofibroblasts; arrowhead, Zeb1-expressing nonmyofibroblast cells. Notice the absence or low nuclear Zeb1 intensity in KPC;Z^{+/-} pancreata. **E**, Relative percentage of Zeb1-expressing and non-Zeb1-expressing stromal myofibroblasts from α SMA and Zeb1 coimmunofluorescence staining of KPC;Z^{+/+} tumors ($n = 3$).

**Figure 3.**

Zeb1 haploinsufficiency results in a differed stromal activation in KPC mice. **A**, Representative images of Mallory Trichrome staining (top, scale bar, 500 μ m) for collagen connective tissue deposition and α SMA immunostaining (bottom; scale bar, 200 μ m) for myofibroblast identification in pancreatic sections from 16-week-old KPC;Z^{+/+} ($n = 5$), 20-week-old KPC;Z^{+/+} ($n = 5$), and 20-week-old KPC;Z^{+/-} ($n = 4$) mice. **B**, Relative quantification of collagen-stained area, α SMA immunopositive area, and ASI in KPC;Z^{+/+} and KPC;Z^{+/-} mice at the indicated times of sacrifice. ASI is calculated as the area of α SMA staining divided by the area of collagen staining measured in consecutive sections. Bars represent the mean \pm SEM of five randomly selected fields from the pancreatic section of each mouse. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, nonsignificant, one-way ANOVA.

Zeb1 haploinsufficiency delays stromal activation during *Kras*-induced pancreatic carcinogenesis

On the basis of *Zeb1* upregulation in myofibroblasts of KPC;Z^{+/+} tumours and the drop of stromal myofibroblasts associated with a slowdown of cancer development by genetic *Zeb1* downregulation, we hypothesized that *Zeb1*-expressing myofibroblasts play important roles in the generation of a tumor-supporting microenvironment. In human PDAC, the abundance of stromal myofibroblasts has been associated with a worse prognosis (32, 33), and the ratio of α SMA area to the collagen area (ASI, activation stromal index) has been established as an independent prognostic marker of the disease (32), predicting a poorest evolution for myofibroblast-rich desmoplastic tumors. Hence, we determined the impact of *Zeb1* hemizyosity on stromal activation in pancreatic lesions by ASI analysis. Trichrome staining revealed more than 2-fold increase in collagen deposition throughout the pancreas in 20-week-old KPC;Z^{+/-} mice (Fig. 3A, top right) compared with age-matched KPC;Z^{+/+} mice (Fig. 3A, top middle). Conversely, the number of α SMA-positive myofibroblasts was markedly lower in KPC;Z^{+/-} than in KPC;Z^{+/+} pancreata (Fig. 3A, bottom right and bottom middle, respectively). As a result, pancreatic ASI was 4-fold lower in KPC;Z^{+/-} in comparison with KPC;Z^{+/+} pancreata (Fig. 3B), suggesting that limited *Zeb1* expression alters the fibrocellular balance of the stroma emerged during pancreatic *Kras*-driven oncogenesis. However, considering the evolving stroma remodeling during pancreatic carcinogenesis (34), the observed stromal differences could be due to the delayed carcinogenesis occurred in KPC;Z^{+/-} mice. To evaluate this possibility, we compared 16-week-old KPC;Z^{+/+} (Fig. 3A, left) and 20-week-old KPC;Z^{+/-} (Fig. 3A, right) mice, when pancreata are similarly affected by ADM and low-grade PanIN lesions without evidence of high-grade lesions. We observed

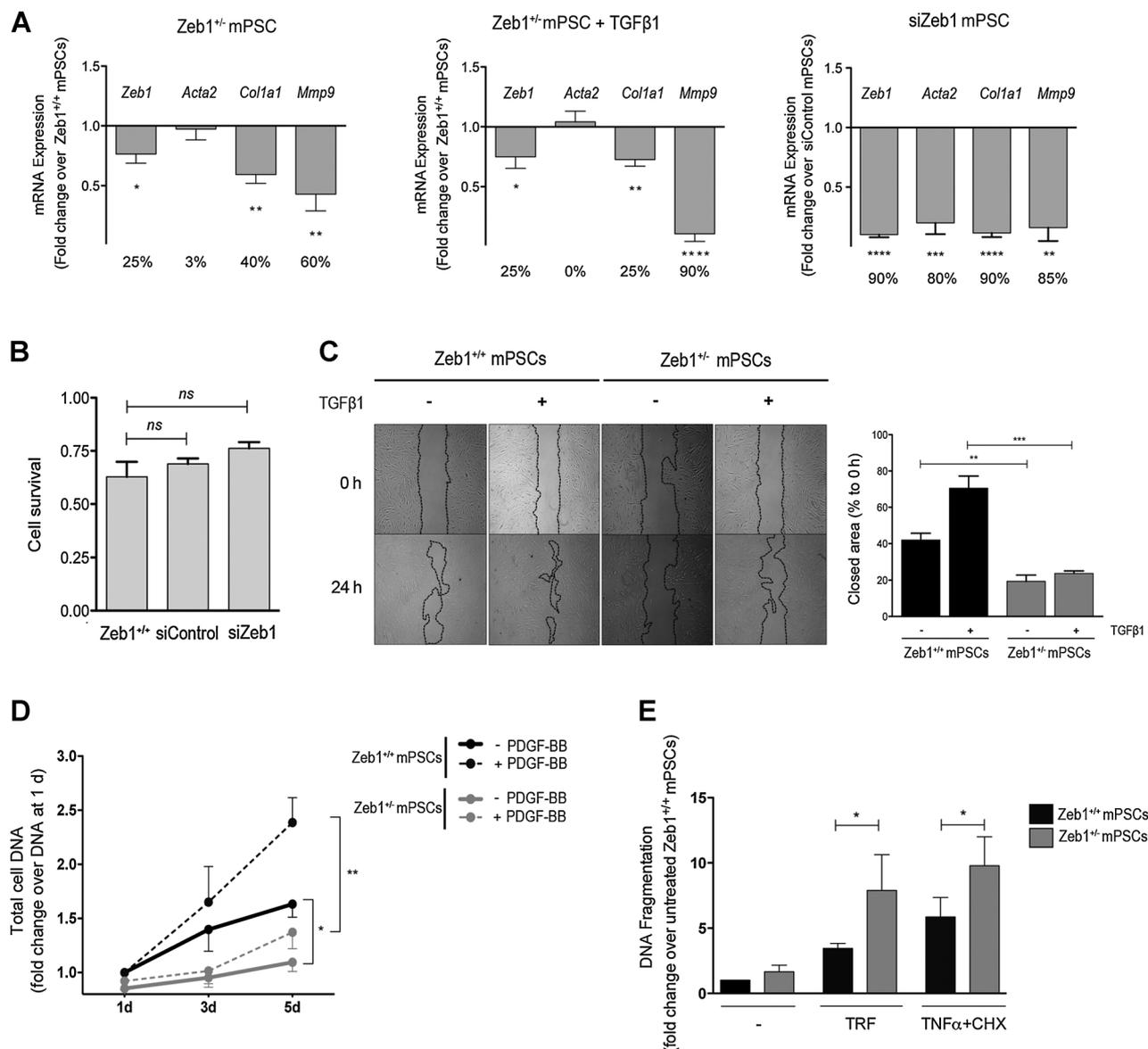
that, regardless the genetic *Zeb1* background, the stroma associated with early precursor lesions was richer in collagen and less abundant in myofibroblasts than the desmoplasia-accompanying pancreatic cancer. These data indicate that *Zeb1* restriction does not lead to myofibroblasts depletion but it rather slows down the inherent spawning of myofibroblasts during the oncogenic stroma transformation.

Zeb1 haploinsufficient mPSCs do not foster pancreatic tumor growth

To evaluate that the delayed tumor development observed in KPC;Z^{+/-} mice was mostly due to *Zeb1* haploinsufficiency in mPSCs rather than in the pancreatic epithelial compartment, we established murine subcutaneous tumors by coinjecting KPC cells with *Zeb1*^{+/+} or with *Zeb1*^{+/-} mPSCs. Tumors derived from KPC cells/*Zeb1*^{+/+} mPSC showed a clear advantage in growth compared with those generated with KPC cells alone, while growth of KPC cells/*Zeb1*^{+/-} mPSCs and KPC cells generated tumors was fairly comparable (Supplementary Fig. S3A–S3C). These results provide strong evidence that *Zeb1* hemizyosity in mPSC critically contribute to the delayed tumour growth in KPC;Z^{+/-} mice.

Zeb1-deficient mPSCs show attenuated active phenotype and limited protumoral attributes

To investigate if *Zeb1* expression provides myofibroblasts with activating and tumor-supporting properties, we established primary cultures of mPSCs from *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mice. Using qRT-PCR, we analyzed changes in transcript levels of α SMA (*Acta2*), matrix metalloproteinase-9 (*Mmp9*) and type I collagen (*Col1a1*) as markers of mPSC activation. To ensure full activation of culture-activated mPSCs (myofibroblastic phenotype), a set of cells were additionally treated with recombinant TGF β 1 for 24 hours before analysis. mRNA quantification showed a 25%

**Figure 4.**

Zeb1 promotes an activating phenotype in culture-activated mPSCs. **A**, *Zeb1*, *Acta2*, *Col1a1*, and *Mmp9* mRNA levels were determined by qRT-PCR in haploinsufficient *Zeb1* mPSCs (*Zeb1*^{+/-} mPSC, left and middle) and in mPSCs transfected with siRNA *Zeb1* (*siZeb1* mPSC, right). Values were normalized to the housekeeping gene β 2-microglobulin. Middle, cells were treated with recombinant TGF β 1, 10 ng/mL for 48 hours before mRNA analysis. Bars represent the mean \pm SEM ($n = 4$) and numbers on the bottom express the percentual reduction of each gene over the correspondent gene in mPSCs with full *Zeb1* expression. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$, one-way ANOVA. **B**, MTS assay showing no effect on mPSC viability after 48 hours of siRNA transfection. ns, nonsignificant. **C**, Cell migration of *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{-/-} mPSCs following TGF β 1 (10 ng/mL) exposure for 24 hours. Representative images taken with phase contrast microscopy and corresponding quantification of gap closure (right) are shown. Bars, mean \pm SEM ($n = 4$). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, Student *t* test. **D**, Proliferation curves of *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{-/-} mPSCs upon PDGF-BB (2 ng/mL) exposure at different time points. Data show mean \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, one-way ANOVA. **E**, Apoptotic death of *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{-/-} mPSCs in response to tocotrienol-rich fraction (TRF, 20 μ mol/L) or TNF α (20 ng/mL) + cycloheximide (CHX, 10 μ g/mL) for 48 hours. Bars, mean \pm SEM of four independent experiments. *, $P < 0.05$, one-way ANOVA.

Zeb1 reduction in *Zeb1*^{+/-} mPSCs as compared with *Zeb1*^{+/+} mPSCs, both in nontreated (Fig. 4A, left) and in TGF β 1-treated conditions (Fig. 4A, middle). *Zeb1* haploinsufficiency did not affect *Acta2* expression but it caused a manifest reduction in *Col1a1* and *Mmp9*, indicating that partial *Zeb1* restriction in mPSCs is sufficient to impair their fibrogenic phenotype but not

enough to switch off their myofibroblastic nature. In search for a more drastic reduction of *Zeb1*, we silenced its expression with *Zeb1* siRNA. In *siZeb1*-transfected mPSCs, *Zeb1* expression dropped down to 10% of mRNA levels detected in *siControl*-transfected cells (Fig. 4A, right). *Zeb1* deprivation caused a striking downregulation of *Acta2*, *Mmp9*, and *Col1a1* (Fig. 4A, right),

indicating that *Zeb1* is required for full mPSCs phenotypic activation. Of note, transcript downregulation in si*Zeb1*-transfected cells was not due to cell viability loss (Fig. 4B).

We then investigated the impact of *Zeb1* deficit on mPSCs migration, proliferation, and resistance to apoptosis, which are characteristic features of the activated mPSC phenotype. Migration analysis showed that *Zeb1*^{+/+} mPSCs reduced more efficiently the distance between wound edges (in basal conditions and upon TGFβ1 stimulation) than *Zeb1*^{+/-} mPSCs (Fig. 4C), demonstrating that *Zeb1* haploinsufficient mPSCs have limited competence to migrate. Proliferation, both basal and upon exposure to the mitogenic PDGF-BB, was also significantly reduced in *Zeb1* haploinsufficient mPSCs as compared with wild-type mPSCs (Fig. 4D). Regarding apoptosis, *Zeb1* haploinsufficient mPSCs were more vulnerable than their wild-type counterparts (Fig. 4E). In summary, these *in vitro* experiments indicate that *Zeb1* regulates mPSC activity and that *Zeb1* haploinsufficient mPSCs tend toward a more quiescent condition.

Lastly, we evaluated whether *Zeb1* restriction in mPSCs compromises their protumoral properties by analyzing their ability to promote migration, invasion, and proliferation on pancreatic cancer cells with high (Emyc-3) and low (Panc02) *Zeb1* expression (Fig. 5A). Migration analysis showed that CM from *Zeb1*^{+/+} mPSCs enhanced Emyc-3 and Panc02 migration and that this effect was negligible when cells were exposed to CM from *Zeb1*^{+/-} mPSCs (Fig. 5B). Using a similar approach, we examined if *Zeb1* deprivation in mPSCs impaired their proinvading effect on cancer cells. Emyc-3 and Panc02 cells were cultured with CM from mPSCs expressing high, medium and low levels of *Zeb1* (*Zeb1*^{+/+}, *Zeb1*^{+/-}, and si*Zeb1* mPSCs, respectively). CM from *Zeb1*^{+/+} mPSC clearly stimulated invasion of Emyc-3 cells, whereas this proinvading effect was null with *Zeb1*^{+/-} and si*Zeb1* mPSCs CM (Fig. 5C, left). Similar results were observed in Panc02 cells (Fig. 5C, right). Recombinant TGFβ1 was clearly effective in Panc02 cells but exerted null effect on Emyc-3 cells, likely due to some defect in the TGFβ1-signaling pathway in this cell line. Regarding proliferation, Emyc-3 cells cultured in CM from *Zeb1*^{+/+} mPSCs were significantly more proliferative than when cultured in CM from *Zeb1*^{+/-} mPSC (Fig. 5D). Altogether, these results strongly support the notion that *Zeb1* in PSCs is an autonomous key regulator of their tumor-supporting properties regardless of *Zeb1* expression state in neoplastic cells.

***Zeb1*-expressing mPSCs stimulate Ras activity in pancreatic cancer cells**

Oncogenic *Kras* activity is critical for PDAC development (14, 15, 35). Importantly, *Kras* activity can be triggered by a variety of soluble cues that are abundant in inflammatory and tumor microenvironment (15). Given that PSCs are prolific producers of secreted factors with protumoral attributes (36), we hypothesized that *Zeb1* in mPSCs supports Ras activity in pancreatic cancer cells bearing oncogenic *Kras*. We generated two pancreatic cancer cell lines from KPC;Z^{+/+} pancreatic tumors, therefore expressing the activating mutation *Kras*^{G12D}. Neoplastic KPC cells were cultured for 48 hours in CM from *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mPSC and analyzed for protein levels of Ser473Akt, a target site of PI3K downstream the Ras pathway. Ser473Akt was highly upregulated in KPC cells exposed to CM from *Zeb1*^{+/+} mPSC and in a substantially lower extent when cultured with CM from *Zeb1*^{+/-} mPSC (Fig. 6A), suggesting that *Zeb1* in mPSCs exerts a paracrine regulation of *Kras* activity in cancer cells. We

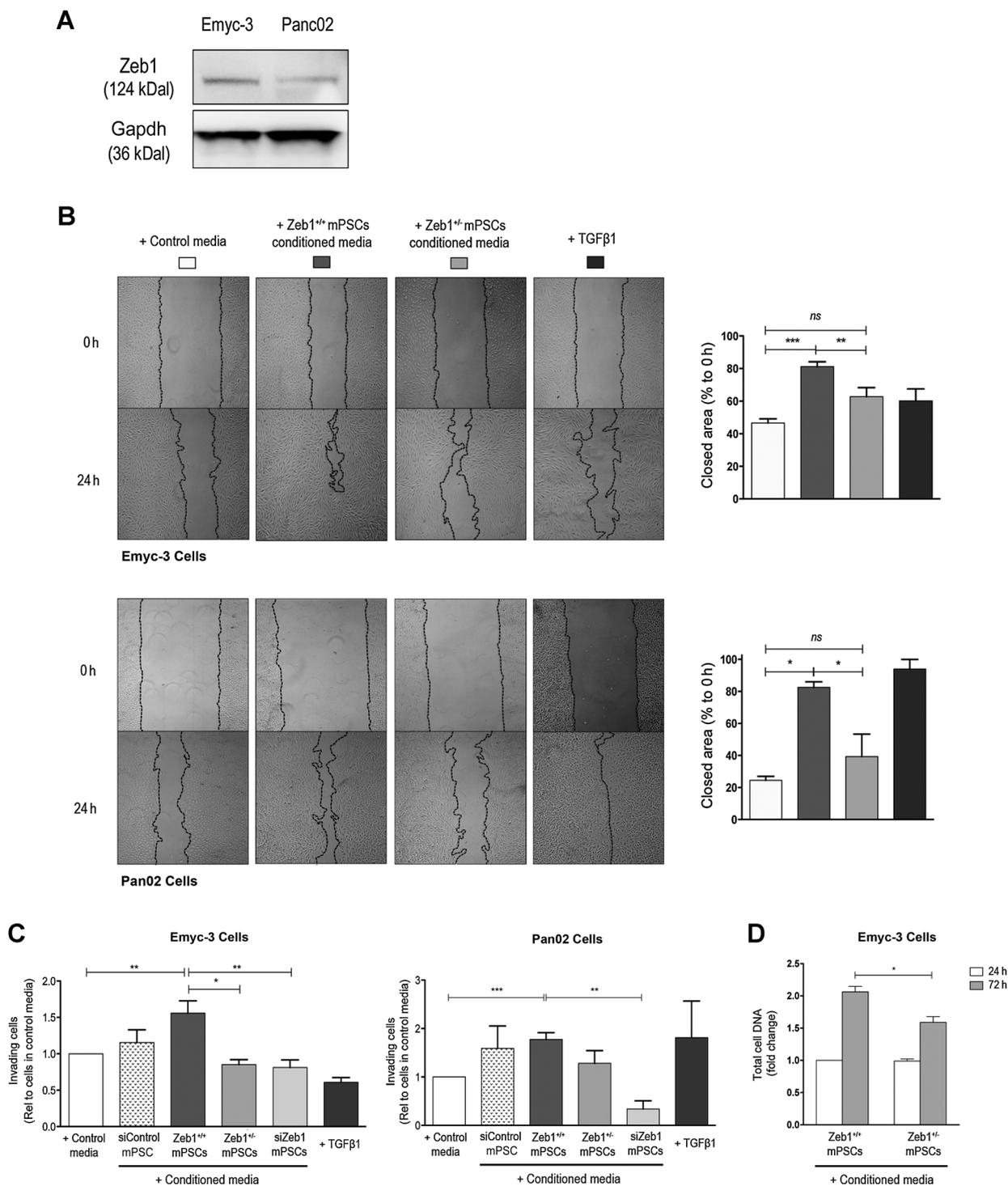
further confirmed that Akt phosphorylation was dependent on Ras activity, as siRNA *Kras* knockdown in KPC cells abrogated mPSC-induced Akt phosphorylation (Fig. 6A). Furthermore, we directly analyzed Ras activity (Ras-GTP levels). In agreement with pAkt results, active Ras was greatly increased in KPC cells exposed to CM from *Zeb1*^{+/+} mPSC whereas no increment was evident when exposed to CM from *Zeb1*^{+/-} mPSCs (Fig. 6B). These data unveil a novel and significant information demonstrating that *Zeb1* in PSCs supports oncogenic *Kras* activity in cancer cells in a non-cell-autonomous manner.

***Zeb1* expression in mPSCs regulates key signaling pathways involved in their activation and in pancreatic carcinogenesis**

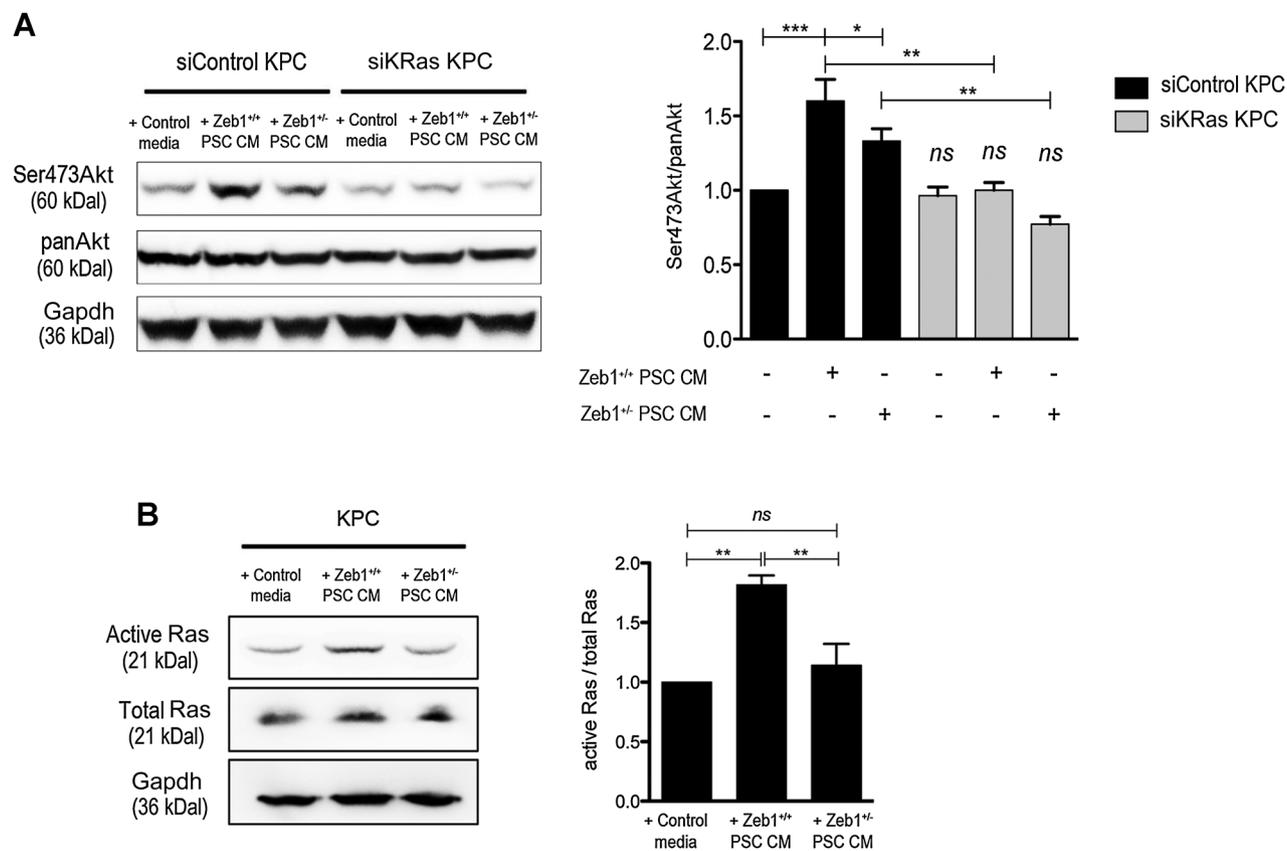
While *Zeb1* promotes tumor properties in cancer cells by reactivating EMT, its transcriptional function in stromal PSCs is unknown. To reinforce our findings showing the protumoral function of *Zeb1*-expressing mPSC, we aimed to analyze differences in transcriptome comparing *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mPSCs. More than 1,800 genes (adjusted *P* value < 0.05) were differentially expressed in *Zeb1* haploinsufficient mPSCs. Enrichment analysis of these genes identified the biological functions of the IPA-generated networks (Fig. 7A). The highest scored network associated with *Zeb1* deficiency (score = 38) corresponded to cellular development, cellular growth and proliferation, and cancer. The second network (score = 29) consisted in genes encoding proteins of cell death and survival and organism development and survival. Hence, these data reveal that *Zeb1* regulates pivotal biological functions in mPSCs governing their survival and function.

Canonical pathways enriched with deregulated genes were also analyzed using IPA (Fig. 7B). *Zeb1* deficiency led to a pronounced gene deregulation that resulted in the enrichment of 264 canonical pathways (*P* < 0.05). The most highly enriched was the molecular mechanisms of cancer pathway (*P* = 7.9E-15). Other enriched signaling pathways included those of Wnt/β-catenin (*P* = 4.7E-10), PI3K/AKT (*P* = 8.3E-7), IGF-1 (*P* = 2.2E-7), TGFβ (*P* = 8.9E-7), FGF (*P* = 2.3E-4), EGF (*P* = 7.9E-4), Integrin (*P* = 1.9E-3), and Apoptosis (*P* = 2.1E-3), which have influential contribution in PSC activation (37, 38) and pancreatic carcinogenesis. Heatmap on Fig. 7C displays the up- and downregulation of most differentially expressed genes in *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mPSCs. Those pathways include genes controlling the expression of soluble cues reportedly involved in the paracrine regulation of oncogenic Ras signaling in cancer cells, such as members belonging to Wnt (39, 40), IGF-1 (41), FGF (42), and EGF (43-45) signaling pathways. The manifest downregulation of these genes in *Zeb1*^{+/-} mPSCs supports our data showing the boosting effect of tumor Ras activity elicited by conditioned media of *Zeb1*-expressing mPSC and underscore the non-cell-autonomous control exerted by *Zeb1* on pancreatic tumor growth. It should also be noted a striking downregulation of genes encoding extracellular matrix proteins and upregulation of genes of the apoptotic signaling pathway in *Zeb1*^{+/-} mPSCs, what supports our *in vitro* data showing that restricted *Zeb1* expression in PSCs hinders their own activating phenotype.

In summary, these results unveil novel information about the role of *Zeb1* expression in PSCs in the regulation of a vast range of genes critically involved in the activating and protumoral phenotype of PSC.

**Figure 5.**

Zeb1 in mPSCs provides them with protumoral attributes. **A**, Western blot analysis of Zeb1 in Emyc-3 and Panc02 cancer cells. Gapdh served as a loading control. For **A**, **B**, and **C**, data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, nonsignificant, one-way ANOVA. **B**, Migration of Emyc-3 and Panc02 pancreatic cancer cells upon exposure to control culture media and to CM from Zeb1^{+/+} and Zeb1^{+/-} mPSCs. Representative images taken with phase contrast microscopy (left) and corresponding quantification of gap closure (right) are shown. **C**, Invasion of Emyc-3p and Panc02 cells across Matrigel-covered transwells following 48 hours exposure to control culture media and to CM from Zeb1^{+/+}, Zeb1^{+/-}, and siZeb1 mPSCs. Bars represent the number of invading cells expressed as relative to invading cells cultured in control media. TGFβ1 (10 ng/mL) was used as a positive control for cell migration (**B**) and invasion (**C**). **D**, Proliferation of Emyc-3 cancer cells upon 24- and 72-hour culture in CM from Zeb1^{+/+} and Zeb1^{+/-} mPSCs. Data are expressed as fold change over DNA values of Emyc-3 cells cultured in Zeb1^{+/+} mPSCs CM.

**Figure 6.**

Zeb1 in mPSCs stimulates *in vitro* *Kras* activity in pancreatic cancer cells. **A**, Western blot analysis and relative quantification of Ser473Akt in KPC cancer cells transfected with either siRNA control or siRNA *Kras* and then exposed to control culture media and to CM from *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mPSCs for 48 hours. Gapdh served as a loading control. Relative quantification of Ser473Akt normalized to panAkt (right). **B**, Representative GTP-pull down assay showing active Ras in KPC cells. The bound active Ras was measured by a Raf pull-down assay in KPC cells exposed to control culture media and to CM from *Zeb1*^{+/+} and *Zeb1*^{+/-} mPSCs for 48 hours. Relative quantification of active Ras normalized to total Ras and Gapdh (right). For **A** and **B**, data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, nonsignificant, one-way ANOVA.

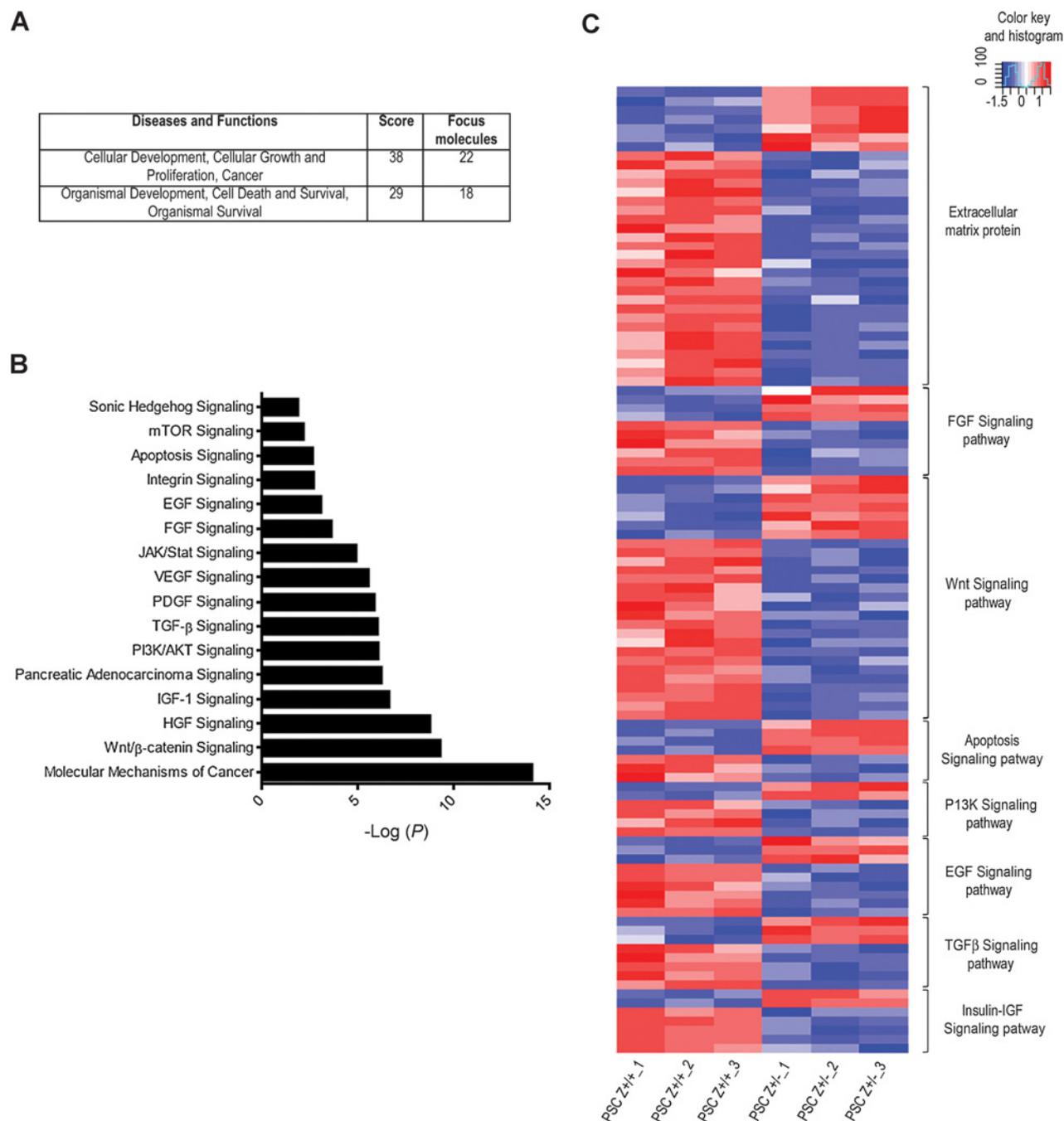
Discussion

Previous studies have shown an obligate role for *Zeb1* in *Kras*-driven progression from adenoma to carcinoma in the lung (28). As oncogenic *Kras* is a key driver of PDAC generation, we hypothesized that *Zeb1* can play a critical role in successful pancreatic *Kras*-mediated tumorigenesis. To test this hypothesis, we analyzed pancreata from *Kras*^{G12D};*p53*^{R172H/+};*Pdx1-Cre* (KPC) mice with or without heterozygous germline deletion of *Zeb1* (KPC;*Z*^{+/+} and KPC;*Z*^{+/-} mice). We used the KPC model because it consistently undergoes a stepwise progression from pancreatic precursor lesions to cancer with 100% penetrance closely resembling human PDAC. Our results demonstrate that *Zeb1* haploinsufficiency significantly delays the onset of pancreatic cancer in the setting of *Kras* mutation. This observation unveils *Zeb1* as a regulator in pancreatic *Kras*-driven carcinogenesis.

However, incomplete *Zeb1* deletion is not sufficient to impede the generation of PDAC in KPC mice in the long run. Indeed, this was not an anticipated finding, as previous evidence has shown that lung-targeted-*Kras* mice with monoallelic *Zeb1* deletion developed lung adenomas but failed to progress to lung cancer

(28). This difference might be explained by possible *Zeb1* tissue-specific requirements in mutant *Kras*-driven oncogenesis. It is also possible that full *Zeb1* deletion might be required to completely prevent the development of PDAC, which is not a feasible option because homozygous *Zeb1* knockout mice are not viable. But, it is remarkable that by reducing *Zeb1* expression no more than 50% there is a substantial slowdown in PDAC development. Additionally, it has to be considered that the genetic background of the *Kras* mouse model we have used to consistently generate pancreatic cancer (which adds mutated *p53*) might drive carcinogenesis with more determination than oncogenic *Kras* alone.

Similarly to previous findings obtained in human and mice (21, 22), we describe that *Zeb1* becomes highly expressed in stromal cells, most notably in myofibroblasts emerging around preneoplastic and cancer lesions. In contrast, *Zeb1* expression is scarce in the epithelial compartment of both precursor and cancer lesions, similarly to previous observations in human tissues where *Zeb1* is very rarely detected in epithelial cancer cells (21). Interestingly, the results obtained in heterotopic tumors strongly support the notion that the delayed oncogenesis in KPC;*Z*^{+/-} mice is mainly due to *Zeb1*

**Figure 7.**

Zeb1 haploinsufficiency in mPSCs deregulates signaling pathways involved in their activation and in pancreatic carcinogenesis. **A**, Biological functions of genes in the two most highly enriched networks generated in IPA. The "score" is the ratio of focus genes to the total genes in the network. **B**, Canonical pathways more highly enriched by significantly deregulated genes, generated by IPA. The probability of finding the genes of our data set in the IPA library for each canonical pathway is displayed as $-\log(P)$ value. **C**, Heatmap representing the gene expression microarray analysis of mRNAs from *Zeb1*^{+/+} (left; $n = 3$) and *Zeb1*^{+/-} (right; $n = 3$) mPSCs.

haploinsufficiency in stromal myofibroblasts rather than in the epithelial compartment.

The aberrant expression of stromal *Zeb1* led us to consider a new *Zeb1-Kras* liaison through a heterotypic cross-talk between *Zeb1*-expressing myofibroblasts and oncogene *Kras*-bearing epi-

thelial cells. Accumulating *in vitro* and *in vivo* evidence has demonstrated that activated resident PSCs populating pancreatic tumor stroma foster PDAC development, in part through paracrine communication with cancer cells (3). Activated PSCs are a rich source of active soluble factors that support cancer cells in a

non-cell-autonomous manner, enabling proliferation, migration, invasion, metabolic adaptation, and drug resistance (2, 5). Consistent with this notion, our work provides *in vitro* evidence that culture-activated mPSCs exert paracrine tumor supporting effects on pancreatic cancer cells.

Furthermore, we demonstrate that the activating and protumorigenic status of mPSCs is threatened by the need of attaining full *Zeb1* expression, as half reduction of *Zeb1* genomic load lessens mPSC proliferative and migrating activity, increases their susceptibility to apoptosis, and compromises their competence to promote migration, invasion, and proliferation in cancer cells. These functional consequences are paralleled by a curtailed fibrogenic profile, as *Zeb1* haploinsufficient mPSCs express lower *Coll1a1* and *Mmp9* transcript levels.

Notably, mPSCs myofibroblastic identity is destabilized when *Zeb1* content is further reduced, as shown by *Acta2* transcript extinction after subtotal *Zeb1* mRNA suppression by siRNA. In this regard, previous evidence has demonstrated that *Zeb1* is a transcriptional regulator of α SMA in human buccal mucosal fibroblasts (46) and a required mediator for fibroblasts transdifferentiation into myofibroblast (46). Indeed, null *Zeb1*-embryonic fibroblasts lack myofibroblast phenotype and display epithelial-like morphology (47). Therefore, *Zeb1* emerges as a transcriptional regulator of PSCs that directly controls their myofibroblastic phenotype and sustains their protumoral properties. This novel information adds a value beyond the widely recognized role of *Zeb1* as transcriptional inducer of EMT during pancreatic tumorigenesis (23). Hitherto, numerous evidence has linked *Zeb1* to initiation, invasion, metastasis, and drug resistance in pancreatic cancer (26, 48). Our *in vivo* data confirm and expand the key role of *Zeb1* on PDAC development. We describe an activating and protumorigenic program in mPSCs that is different, and possibly complementary, from the classic EMT program induced in cancer cells. Therefore, our work identifies an unknown oncogenic pathway controlled by *Zeb1* in mPSCs that cooperates with cell-autonomous mechanisms of epithelial tumor cells in driving pancreatic cancer progression. This demonstration opens new opportunities to redirect pancreatic cancer therapy toward the design of stromal strategies targeting *Zeb1* in myofibroblasts. In this sense, previous works have demonstrated the therapeutic benefits of reprogramming activated mPSCs toward a quiescent phenotype in mouse PDAC (8, 49).

In the light of the results presented in this work, we hypothesized that *Zeb1* in mPSCs acts as a partner to mutant *Kras* in the pancreatic epithelial compartment, eliciting a loop where mesenchymal *Zeb1* fosters epithelial oncogenic Ras activity. The research of Tape and colleagues endorses the basis of this hypothesis as they have demonstrated that oncogenic *Kras*^{G12D} regulates tumor cell signaling via stromal cells, meaning that tumor cells bearing *Kras*^{G12D} engage heterotypic fibroblasts, which incite reciprocal signaling in the tumor cells (41). We provide *in vitro* evidence that *Zeb1* in mPSCs acts in a paracrine fashion to enhance Ras activity in pancreatic cancer cells bearing oncogenic *Kras* as indicated by a lower Ras activity and decreased pAkt (Ras downstream target) in tumor cells exposed to conditioned media from *Zeb1* haploinsufficient mPSCs. These results suggest the existence of a *Zeb1*-controlled secretome that regulates *Kras* activity in neighboring cells. These data go in line with recent information describing that stromal cues from human and mice pancreatic myofibroblasts induce a stroma-inducible signature in pancreatic cancer cells (50). Of note, this stromal signature is enriched in

genes overlapping with those activated by *Kras* (8), suggesting that oncogenic *Kras* signaling is susceptible to be governed by micro-environmental outputs. Furthermore, our *in vitro* data override the limitation of the transgenic mouse model used in this study in which *Zeb1* deletion is not mPSC-specific but universally affects all body cells.

Finally, we provide transcriptomic analysis showing that *Zeb1* haploinsufficiency in mPSCs deregulates a vast number of genes critically involved in cancer, cellular growth and proliferation, cellular development, and *Kras* activation in cancer cells. This information unveils novel stromal attributes of *Zeb1* as a significant regulator of key signaling pathways involved in PSC activation and carcinogenesis.

In summary, this work uncovers new evidence showing the tumor supporting activity of *Zeb1* in stromal myofibroblasts during PDAC development. First, we describe that *Zeb1* haploinsufficiency retards the progression of *Kras*-driven pancreatic cancer. Second, we report that *Zeb1* protein is highly upregulated in activated stromal myofibroblasts surrounding precursor and cancer lesions in KPC mice. Third, we provide *in vitro* and transcriptomic evidence that *Zeb1* controls the activating and protumoral phenotype of mPSCs. Lastly, we demonstrate that *Zeb1* in mPSCs supports *Kras* activity in cancer cells in a non-cell-autonomous way. These data demonstrate that *Zeb1* plays a critical role in fostering pancreatic malignancy by subverting the fibroinflammatory stroma in collaboration with the *Kras*-fated epithelial compartment.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: I. Sangrador, X. Molero, A. Castells, E.C. Vaquero
Development of methodology: I. Sangrador, X. Molero, E. Samper, M. Domínguez-Fraile, E.C. Vaquero
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): I. Sangrador, M. Rovira-Rigau, E. Samper, C. Fillat, E.C. Vaquero
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): I. Sangrador, X. Molero, F. Campbell, S. Franch-Expósito, A. Castells, E.C. Vaquero
Writing, review, and/or revision of the manuscript: I. Sangrador, X. Molero, F. Campbell, S. Franch-Expósito, C. Fillat, A. Castells, E.C. Vaquero
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): I. Sangrador, X. Molero, E.C. Vaquero
Study supervision: X. Molero, A. Castells, E.C. Vaquero

Acknowledgments

This work was supported by grants of the Spanish Ministry of Health (PI12/01430 to E.C. Vaquero and PI11/01542 to X. Molero), by Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área Temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD), by a grant of Asociación Española de Gastroenterología (AEG) to E.C. Vaquero, and by a grant of Societat Catalana de Digestologia (SCD) to E.C. Vaquero.

We thank Bruno Sainz from Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM and the Bioinformatics and Genomics Units of CRG (Barcelona). We also thank Dr. F.X. Real from CNIO for helpful discussions.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 30, 2017; revised October 18, 2017; accepted February 23, 2018; published first February 28, 2018.

References

- Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1186–97.
- Apte M V, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 2004;29:179–87.
- Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, et al. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:2085–93.
- Wehr AY, Furth EE, Sangar V, Blair IA, Yu KH. Analysis of the human pancreatic stellate cell secreted proteome. *Pancreas* 2011;40:557–66.
- Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 2008;68:918–26.
- Feig C, Gopinathan A, Neeße A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012;18:4266–76.
- Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, et al. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;403:380–4.
- Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriac H, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* 2014;159:80–93.
- Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005;7:17–23.
- Murphy SJ, Hart SN, Lima JF, Kipp BR, Klebig M, Winters JL, et al. Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology* 2013;145:1098–1109.e1.
- Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset J, Galbán S, Galbán CJ, et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest* 2012;122:639–53.
- Hingorani SR, Ili EFP, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–50.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramandt TB, Hruban RH, et al. Trp53 R172H and Kras G12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469–83.
- Ji B, Tsou L, Wang H, Gaiser S, Chang DZ, Daniluk J, et al. TRACTras activity levels control the development of pancreatic diseases. *YGASt* 2009;137:1072–1082.e6.
- Huang H, Daniluk J, Liu Y, Chu J, Li Z, Ji B, et al. Oncogenic K-Ras requires activation for enhanced activity. *Oncogene* 2014;33:532–5.
- Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007;11:291–302.
- Daniluk J, Liu Y, Deng D, Chu J, Huang H, Gaiser S, et al. An NF- κ B pathway – mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J Clin Invest* 2012;122:1519–28.
- Carrière C, Young AL, Gunn JR, Longnecker DS, Korc M. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic Kras. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382:561–5.
- Phillip B, Roland CL, Daniluk J, Liu Y, Chatterjee D, Gomez SB, et al. A high-fat diet activates oncogenic Kras and COX2 to induce development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gastroenterology* 2013;145:1449–58.
- Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res* 2011;1:897–912.
- Bronsert P, Kohler I, Timme S, Kiefer S. Prognostic significance of Zinc finger expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery* 2014;156:97–108.
- Galvan JA, Zlobec I, Wartenberg M. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2015;112:1944–50.
- Wellner U, Brabletz T, Keck T. ZEB1 in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 2010;2:1617–28.
- Kurahara H, Takao S, Maemura K. Epithelial – mesenchymal transition and mesenchymal – epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2012;105:655–61.
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012;148:349–61.
- Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009;69:5820–8.
- Liu Y, Sánchez-tilló E, Lu X, Huang L, Clem B, Telang S, et al. Sequential inductions of the ZEB1 transcription factor caused by mutation of rb and then ras proteins are required for tumor initiation and progression. *J Biol Chem* 2013;288:11572–80.
- Liu Y, Lu X, Huang L, Wang W, Jiang G, Dean KC, et al. Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat Commun* 2014;5:1–9.
- Rickmann M, Vaquero EC, Malagelada JR, Molero X. Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology* 2007;132:2518–32.
- José A, Sobrevalls L, Miguel Camacho-Sánchez J, Huch M, Andreu N, Ayuso E, et al. Intraductal delivery of adenoviruses targets pancreatic tumors in transgenic Ela-myc mice and orthotopic xenografts. *Oncotarget* 2013;4:94–105.
- Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1984;44:717–26.
- Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Kolb A, Giese NA, Esposito I, et al. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1155–61.
- Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Nakata K. -Smooth muscle actin expressing stroma promotes an aggressive tumor biology in pancreatic. *Pancreas* 2010;39:1254–62.
- Shi G, Drenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF. Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* 2013;32:1950–8.
- Logsdon CD, Lu W. The significance of ras activity in pancreatic cancer initiation. *Int J Biol Sci* 2016;12:338–46.
- Apte M V, Wilson JS. Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:69–74.
- Apte M, Pirolo RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cell : physiologic role, role in fibrosis and cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:416–23.
- Pang TCY, Wilson JS, Apte M V. Pancreatic stellate cells: what's new? *Curr Opin Gastroenterol* 2017;33:366–73.
- Froeling FEM, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, et al. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-b-catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 2011;141:1486–1497.e14.
- Zeller E, Hammer K, Kirschnick M, Braeuning A. Mechanisms of RAS / b-catenin interactions. *Arch Toxicol* 2013;87:611–32.
- Tape CJ, Ling S, Dimitriadi M, Poulogiannis G, Lauffenburger DA, Tape CJ, et al. Oncogenic KRAS regulates tumor cell signaling via stromal reciprocation. *Cell. The Authors*; 2016;165:1–11.
- Gnatenko DA, Kopantsev EP, Sverdlov ED. The role of the signaling pathway FGF / FGFR in pancreatic cancer. *Biochem (Moscow), Suppl Ser B Biomed Chem* 2017;11:101–10.
- Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004;239:15–7.
- Ardito CM, Gru BM, Takeuchi KK, Lubeseder-martellato C, Teichmann N, Mazur PK, et al. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2012;304–17.

Sangrador et al.

45. Huang H, Daniluk J, Liu Y, Chu J, Li Z, Ji B, et al. Oncogenic K-Ras requires activation for enhanced activity. *Oncogene*. 2014; 532–5.
46. Chang Y, Tsai C-H, Lai Y-L, Yu C-C. Arecoline-induced myofibroblast transdifferentiation from human buccal mucosal fibroblasts is mediated by ZEB1. *J Cell Molecular Med* 2014;18: 698–708.
47. Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development* 2008; 135:579–88.
48. Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, Burk U, Niedermann C, Firat E, et al. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 2011;30:770–82.
49. Carapuça EF, Gemenetzidis E, Feig C, Bapiro TE, Williams MD, Wilson AS, et al. Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol* 2016; 239:286–96.
50. Sherman MH, Yu RT, Tseng TW, Sousa CM, Liu S, Truitt ML, et al. Stromal cues regulate the pancreatic cancer epigenome and metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:1129–34.

KPC;*Z*^{+/-}
30-week old

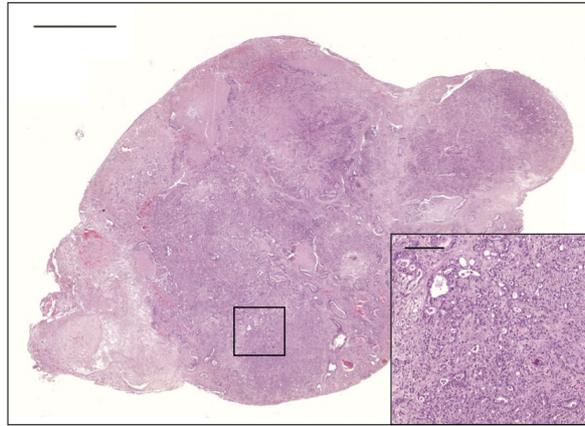


Figure S1. *Zeb1* hemizyosity doesn't prevent long term development of PDAC in 30-weeks old KPC;*Z*^{+/-}.

Representative image of H&E staining of pancreas from 30-weeks old KPC;*Z*^{+/-} mice (n=4). Inset shows a high magnification view of the section marked by the box. Scale bar: 2000 μ m for main panel and 200 μ m for inset.

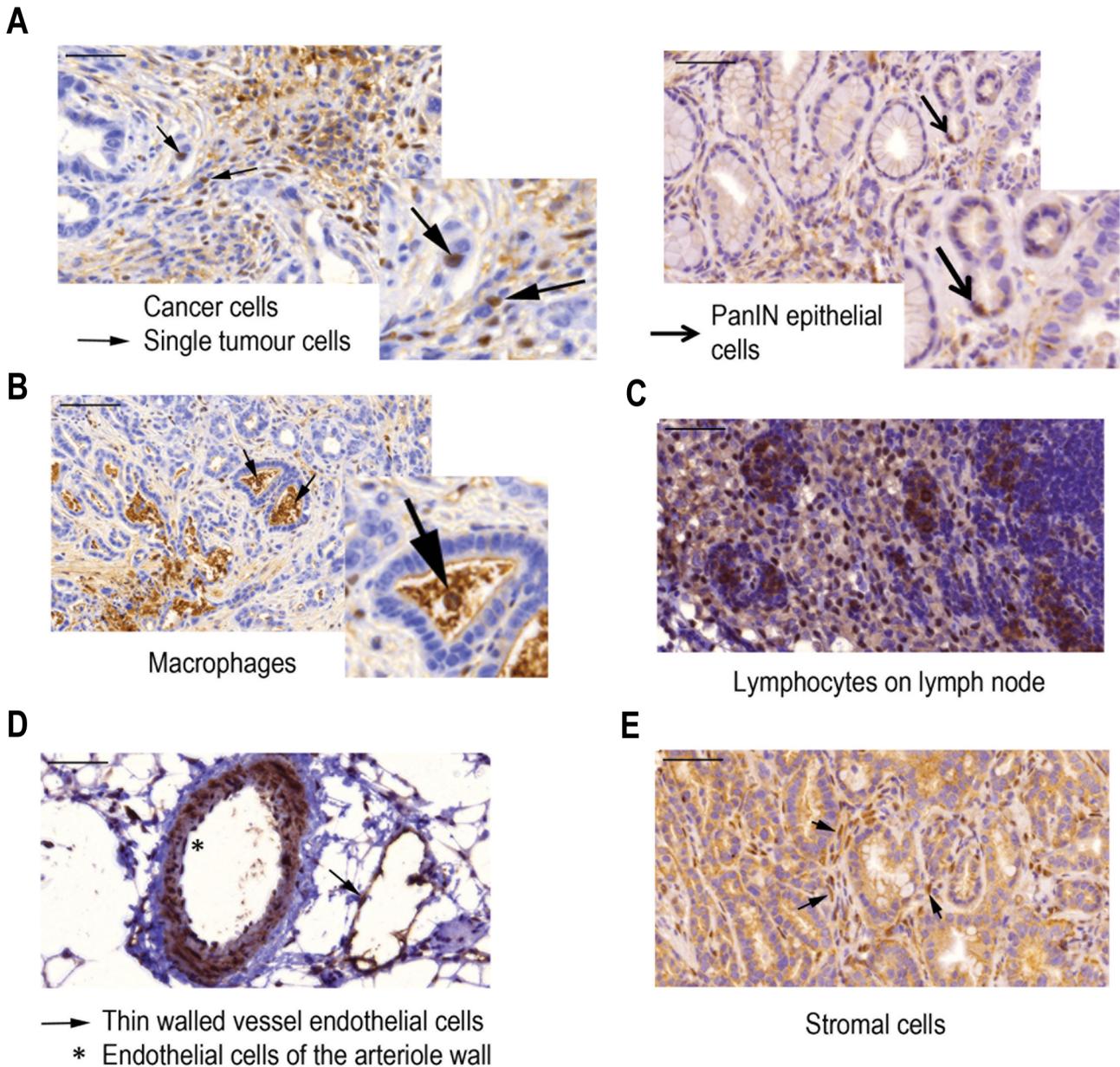


Figure S2. *Zeb1* expression in transformed pancreata of $KPC;Z^{+/+}$ and $KPC;Z^{+/-}$ mice. *Zeb1* immunohistochemical staining of 20-week old $KPC;Z^{+/+}$ and $KPC;Z^{+/-}$ pancreata. **(A)** Representative images showing *Zeb1* positive nuclei of cancer cells in $KPC;Z^{+/+}$ mice (left) and of PanIN epithelial cells in $KPC;Z^{+/-}$ mice (right). Scale bar 50 μ m. **(B-E)** Representative images showing *Zeb1* positive nuclei of macrophages (scale bar: 100 μ m), endothelial cells, lymphocytes and stromal cells in $KPC;Z^{+/+}$ and $KPC;Z^{+/-}$ pancreata (scale bar: 50 μ m)

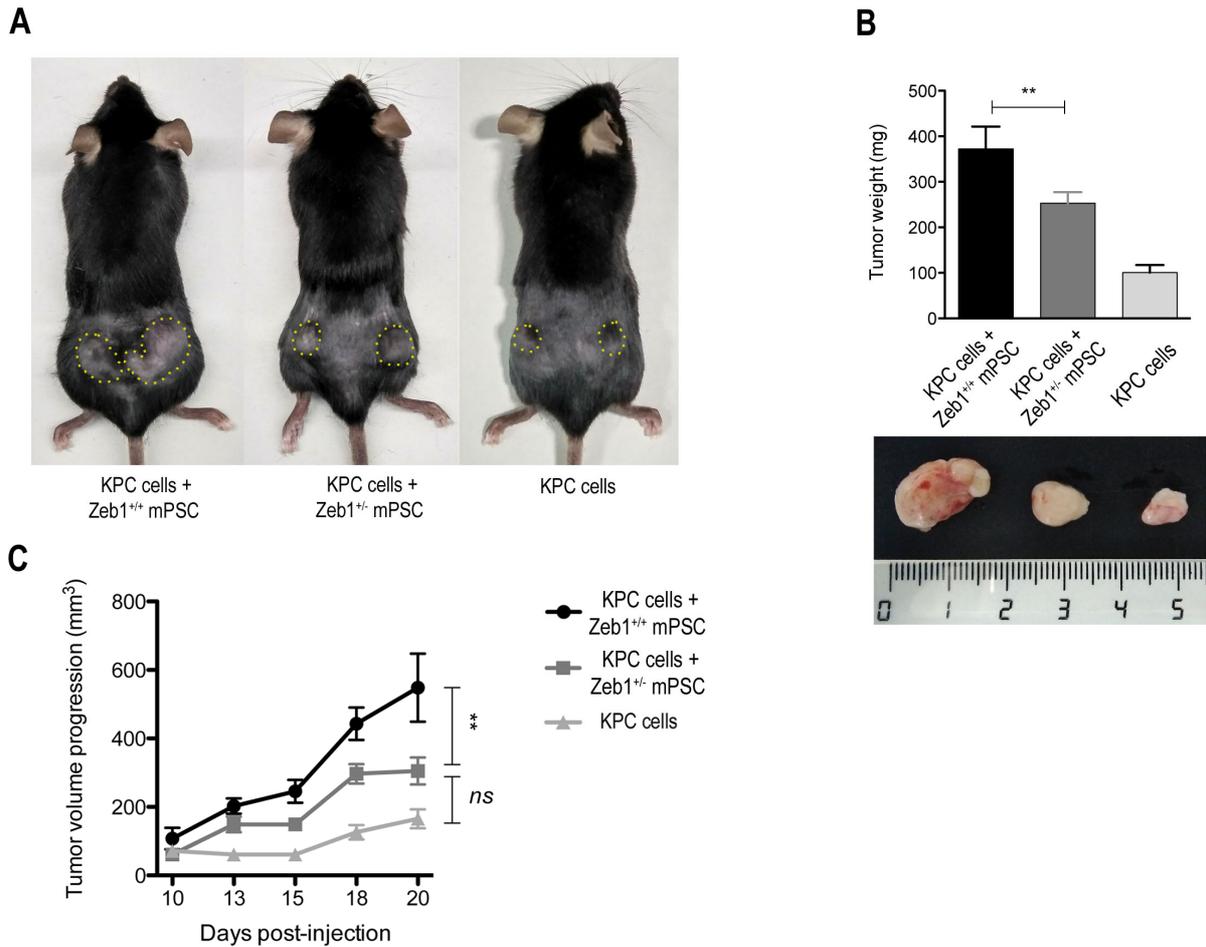


Figure S3. Zeb1 hemizyosity in PSC slows down tumor growth in a subcutaneous mice model.

A. Representative photographs of mice bearing heterotopic tumours generated with subcutaneous KPC cells, KPC cells + Zeb1^{+/+} mPSC and KPC cells + Zeb1^{+/-} mPSC. **B.** Bar graph of tumour weighs and representative photograph of resected tumors generated at day 20 after sc cell injection. **C.** Tumour growth curves based on volume calculation by two-dimensional measurements of each tumour in the course of the following 20 days of subcutaneous cell injection. For **B** and **C** data represent the mean \pm SEM of 12 (KPC group), 11 (KPC + Zeb1^{+/+} mPSC group) and 14 (KPC + Zeb1^{+/-} mPSC group) tumours. ** $p < 0.01$, *ns*: non significant, one way ANOVA.

Supplementary Table 1. Antibodies used for immunohistochemistry (IHQ) and immunofluorescence (IF) analysis and correspondent incubating conditions.

Antibody	Company (catalog reference)	Antibody concentrations IHQ // IF
Zeb1	Santa Cruz (25388)	1:50 // 1:250
αSMA	Cell Signalling (C67E7)	1:400 // 1:400
CK19	Cell Signalling (D9E)	1:400 // -
Ki67	Ambion (AM4300)	1:50 // -

Supplementary Table 2. Antibodies used for western blot analysis and correspondent incubating conditions (RT: room temperature; ON: overnight).

Antibody	Company (catalog reference)	Antibody concentration	Incubation time and temperature
Zeb1	Santa Cruz (25388)	1:250 in 5%BSA TBS-T	2 h, RT
Ser473AKT	Cell Signalling (C67E7)	1:2000 in 5%BSA TBS-T	ON, 4°C
panAKT	Cell Signalling (D9E)	1:1000 in 5%BSA TBS-T	ON, 4°C
GAPDH	Ambion (AM4300)	1:1000 in 5%BSA TBS-T	2 h, RT