



Efectos de la sobreexpresión de HIF-2 α en la homeostasis del páncreas exocrino

Álvaro Flores Martínez

Tesis Doctoral

Director: Dr. D. David Cano González
Tutor: Dr. D. Ricardo Pardal Redondo

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

A mi familia

Memoria presentada por Álvaro Flores Martínez para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, bajo la supervisión del Doctor David Cano González, gracias a las siguientes ayudas de financiación:

Proyecto de Investigación de Helmsley Charitable Trust USA, 2012-PG-T1D016, titulado: “*Investigating the role of c-Myc in pancreatic beta cell replication*”.

Proyecto de Investigación de Excelencia de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, CTS-7478, titulado: “Función del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) en la formación de tumores de páncreas”.

Contrato económico con Novartis Oncology Spain, FIS-ACR-2016-01, titulado: “*Retrospective study to identify predictive biomarkers for response to somatostatin analogs in acromegaly patients*”.

Proyecto de Investigación en Salud, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto en Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, PI16/00175. Titulado “Adenomas hipofisarios de comportamiento agresivo, del modelo animal al paciente”.



Dr. D. Ricardo Pardal Redondo, profesor titular de Fisiología Médica e investigador principal del grupo de investigación “Fisiopatología de Células Madre Neurales” del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “**Efectos de la sobreexpresión de HIF2a en la homeostasis del páncreas exocrino**” ha sido realizado bajo su tutela académica por Álvaro Flores Martínez, que presenta para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 22 de junio de 2021.

Fdo. Dr. D. Ricardo Pardal Redondo,
Tutor de la tesis doctoral



Dr. D. David Cano González, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e investigador principal del grupo de investigación “Enfermedades Endocrinas” del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “**Efectos de la sobreexpresión de HIF2a en la homeostasis del páncreas exocrino**” ha sido realizado bajo su dirección por Álvaro Flores Martínez, que presenta para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 22 de junio de 2021.

Fdo. Dr. D. David Cano González,
Director de la tesis doctoral

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
1. Anatomía del páncreas	13
1.1. Páncreas exocrino	13
1.1.1. Células acinares	13
1.1.2. Células ductales	14
1.1.3. Células centroacinares	15
1.2. Páncreas endocrino	15
1.3. Diferencias estructurales entre el páncreas de humano y el de ratón .	16
2. Organogénesis pancreática	19
2.1. Factores de transcripción reguladores de la organogénesis pancreática	22
3. Fisiopatología pancreática	23
3.1. Fisiopatología del páncreas endocrino.....	23
3.1.1. Diabetes Mellitus.....	23
3.1.1.1. Diabetes tipo 1 (DT1)	24
3.1.1.2. Diabetes tipo 2 (DT2)	24
3.1.1.3. Otros tipos de diabetes	25
3.2. Fisiopatología del páncreas exocrino	25
3.2.1. Pancreatitis aguda y crónica	26
3.3. Papel de la célula acinar en la patología exocrina: Plasticidad acinar	27
3.3.1. Metaplasia acino-ductal (ADM)	27
3.4. Cáncer de páncreas	28
3.4.1. Carcinoma adenoescamoso.....	29
3.4.2. Adenocarcinoma quístico seroso	30
3.4.3. Carcinoma de células acinares.....	30
3.4.4. Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)	31
3.5. Histopatología de los PDAC.....	32
3.5.1. Lesiones inducidas por inflamación.....	32
3.5.2. Lesiones preneoplásicas.....	33
3.5.2.1. Neoplasias pancreáticas intraepiteliales – PanIN.....	33
3.5.2.2. Neoplasias papilares intraductales mucinosas – IPMN	35

3.5.2.3.	Neoplasias quísticas mucinosas – MCN	35
3.5.2.4.	Lesiones aplanadas atípicas – AFL	36
3.5.3.	Progresión y desarrollo de PDAC	36
3.5.4.	Hipoxia y tumorigénesis	38
4.	Hipoxia y los factores inducibles por hipoxia (HIF)	40
4.1.	Respuestas adaptativas a cambios en los niveles de oxígeno	40
4.2.	Familia HIF y sus dominios estructurales	42
4.2.1.	Ruta de señalización de los factores HIF	43
4.2.2.	Isoformas de la familia HIF: HIF-2 α	45
4.2.3.	Genes diana de los factores HIF	46
4.2.4.	Síndrome de von Hippel-Lindau	47
4.3.	Modelos animales de modulación de la ruta HIF.....	51
5.	Factores HIF y su relación con el páncreas	53
5.1.	Factores HIF durante el desarrollo pancreático.....	53
5.2.	Factores HIF y su papel en patologías endocrinas	54
5.3.	Factores HIF en patologías exocrinas	57
5.3.1.	Influencia de los factores HIF en la progresión del cáncer de páncreas.....	59
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
	MATERIALES Y MÉTODOS	65
1.	Mantenimiento de las líneas de ratones transgénicos	66
2.	Líneas de ratones utilizadas	66
2.1.	Líneas de ratones con la recombinasa <i>Cre</i>	66
2.1.1.	<i>Pdx1</i> ⁺ / <i>Cre</i>	67
2.1.2.	<i>Ptf1a</i> ⁺ / <i>Cre</i>	67
2.2.	Líneas de ratones con sobreexpresión de HIF-2 α	68
2.3.	Líneas de ratones con sobreexpresión de <i>Kras</i>	68
3.	Genotipado de las líneas transgénicas	69
4.	Ensayo de escisión	70
5.	Extracción del ARN.....	70

6. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)	71
7. <i>Western blot</i>	72
8. Análisis histológicos	72
8.1. Preparación histológica de los tejidos	72
8.2. Tinciones histológicas	73
8.3. Tinciones inmunohistoquímicas	73
8.4. Tinciones inmunofluorescentes	74
9. Análisis de glucosa en sangre	75
10. Análisis cuantitativos y cuantificaciones.....	75
10.1. Compartimento endocrino	75
10.2. Compartimento exocrino.....	76
11. Análisis morfométricos	77
12. Análisis histopatológicos.....	78
13. Análisis estadísticos.....	78

RESULTADOS.....79

BLOQUE I. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE HIF-2 α EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO..... 80

1. Generación de un modelo animal con activación específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos.....	80
2. La activación ectópica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos causa defectos severos en el tejido exocrino adulto, pero no en el compartimento endocrino	81
3. La estabilización de HIF-2 α produce atrofia de las células exocrinas y metaplasia acino-ductal en páncreas de ratones adultos.....	88
4. La acumulación de HIF-2 α en el páncreas produce un fenotipo similar a la pancreatitis en ratones adultos.....	90
5. Incremento de apoptosis y de proliferación en células acinares en ratones <i>Pdx1-Cre;HIF2dPA</i> adultos.....	93
6. La acumulación de HIF-2 α induce la activación postranscripcional de c-Myc y promueve cambios en la expresión de controladores del ciclo celular .	97
7. Remodelación de la morfología de los acinos pancreáticos tras la sobreexpresión de HIF-2 α	99

8. Los páncreas con sobreexpresión de HIF-2 α muestran alteraciones en el endotelio vascular y activación de genes relacionados con angiogénesis..... 105
9. Caracterización de las lesiones encontradas en el tejido exocrino de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos.....108
10. La estabilización de HIF-2 α afecta a la identidad de las células acinares adulta induciendo un proceso de desdiferenciación hacia un estado progenitor 109
11. Rutas moleculares alteradas en el tejido exocrino y en las lesiones ADM en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos.....112

BLOQUE II. EFECTO DE LA SOBREATIVACIÓN DE HIF-2 α EN UN CONTEXTO ONCOGÉNICO Y SU PAPEL EN LA PROGRESIÓN TUMORAL 118

12. Generación de un modelo animal con activación específica de HIF-2 α en progenitores específicos del linaje exocrino..... 118
13. La estabilización ectópica de HIF-2 α en progenitores específicos de células exocrinas no altera severamente la homeostasis del tejido exocrino adulto119
14. Eficiente estabilización de HIF-2 α en el tejido acinar adulto de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* 123
15. Caracterización de las lesiones focales encontradas en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* adultos 125
16. Generación de un modelo animal con activación específica de HIF-2 α simultánea a la activación oncogénica del gen *Kras* en progenitores acinares 127
17. La sobreactivación de HIF-2 α en el tejido exocrino en un contexto oncogénico no altera la formación de lesiones preneoplásicas en ratones adultos ni induce su expansión..... 128
18. Caracterización histológica de las lesiones preneoplásicas detectadas en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* adultos..... 137
19. Rutas moleculares alteradas en las lesiones preneoplásicas tras la estabilización de HIF-2 α en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* 142

DISCUSIÓN	147
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	166
ANEXOS	182
1. Anexo I: Tabla MM4.....	183
2. Anexo II: Publicación relacionada con la tesis doctoral	186
3. Anexo III: Otras publicaciones realizadas durante la tesis doctoral.....	199
ABREVIATURAS	203

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía del páncreas

El páncreas es un órgano glandular mixto que está constituido por dos compartimentos bien diferenciados como son el epitelio exocrino y el epitelio endocrino¹.

1.1. Páncreas exocrino

El páncreas exocrino comprende aproximadamente un 98% de la masa pancreática y está compuesto principalmente por células acinares y células ductales². La función principal del tejido exocrino es secretar las enzimas digestivas responsables de una normal digestión y absorción de los alimentos ingeridos, facilitando así la asimilación de nutrientes en el organismo.

1.1.1. Células acinares

Las células acinares son el subtipo celular más representado en el páncreas exocrino y son las responsables de producir y secretar las enzimas digestivas a través de una compleja red de ductos, formados por células ductales, que desembocan en el duodeno. Las células acinares tienen forma piramidal y se organizan alrededor de una luz central formando los denominados acinos pancreáticos. En estas estructuras se producen y almacenan diferentes zimógenos, la forma inactiva de las enzimas digestivas. El jugo pancreático está constituido por enzimas proteolíticas, como tripsina y quimotripsina, carboxipeptidasas, nucleasas, amilasas y lipasas, las cuales se secretan en formas inactivas, como proenzimas, y se activan en el duodeno tras atravesar el conducto pancreático principal, evitando así dañar el propio tejido pancreático³.

Trabajos recientes han sugerido que no todas las células acinares son idénticas y que existe heterogeneidad en su expresión génica⁴. Se han diferenciado morfológicamente y funcionalmente las células acinares que

rodean los islotes de Langerhans (células acinares “peri-islotes”) y las células acinares más alejadas (células acinares “tele-islotes”)⁵. La mayoría de células acinares se pueden identificar histológicamente por las enzimas que sintetizan como, por ejemplo, amilasas, carboxipeptidasas, elastasas o tripsinas. También expresan factores de transcripción específicos de este tipo celular, como Ptf1a o Mist-1, que pueden ser usados para su identificación y clasificación^{6,7}.

1.1.2. Células ductales

El segundo mayor compartimento del páncreas exocrino lo constituyen las células ductales, que conforman una compleja red de ductos donde drenan todas las secreciones acinares. Estos ductos ven aumentada su complejidad y diámetro. Los ductos intercalados en los que secretan las células acinares convergen en los ductos excretores intralobulares, los cuales convergen a su vez en ductos interlobulares cuando traspasan el parénquima lobular. Además, estos ductos interlobulares se fusionan y aumentan de diámetro, para finalmente dar lugar al ducto pancreático principal^{8,9}.

Tanto los ductos intercalados como los ductos intralobulares están formados por un epitelio simple formado por células ductales aplanadas o cuboidales. Este epitelio incrementa su tamaño y adopta una morfología columnar en los ductos interlobulares, el cual se encuentra rodeado de tejido conectivo. Históricamente, la ausencia de marcadores fiables de células ductales ha ralentizado las investigaciones en profundidad en este tipo celular. La identificación de marcadores ductales pancreáticos como la lectina DBA (aglutinina *Dolichos biflorus*)¹⁰, la citoqueratina 19 (CTK19)¹¹, la anhidrasa carbónica II (CAII)¹², la mucina-1 y algunos factores de transcripción como Hnf1 β , HNF6 o Sox9 (revisado en ¹³), ha contribuido a caracterizar mejor este compartimento y en particular, en respuesta a diversas situaciones patológicas como pancreatitis.

1.1.3. Células centroacinares

En el páncreas exocrino también está presente las denominadas células centroacinares. Se corresponden a las células localizadas en la punta proximal de los ductos intercalados que penetran y contactan con el centro del acino. Estas células presentan morfología cuboidal y son ricas en mitocondrias³. Se ha descrito que, en mamíferos, tienen un papel importante en funciones exocrinas de regulación del contenido de la luz distal del ducto. Estudios en peces cebras adultos han demostrado que las células centroacinares contribuyen a la regeneración de células β ^{14,15}. Sin embargo, sigue siendo motivo de debate si este tipo celular juega algún papel en la regeneración pancreática en mamíferos (revisado en ¹⁶).

1.2. Páncreas endocrino

El tejido endocrino comprende un escaso 2% de la masa pancreática total, pero tiene una gran importancia biológica y médica. El páncreas endocrino se compone de 5 subtipos de células productoras de hormonas, que se organizan en pequeños grupos de células denominados islotes de Langerhans. Estos islotes se encuentran repartidos de forma dispersa por todo el páncreas.

El subtipo celular predominante en los islotes de Langerhans son las células β , que producen insulina, representando el 65-80% del total de células. Hasta ahora, se había considerado a la célula β como un único tipo celular homogéneo, pero estudios recientes en humanos han identificado 4 subtipos de células β (células β 1-4) que se distinguen por tener diferente perfil de expresión génica y diferencias en la secreción insulina basal y en la estimulada por glucosa¹⁷. En menor medida se encuentran las células α productoras de glucagón, (15-30% del total de células endocrinas), las células δ productoras de somatostatina (3-10% del total de células endocrinas), las células ϵ productoras de ghrelina (1%) y las células γ productoras de polipéptidos pancreáticos (PP) (3-5%)^{18,19}. Todos los subtipos celulares son necesarios y actúan de manera coordinada con el tejido vascular para mantener la homeostasis de la glucosa en

el organismo, regulando de forma precisa la concentración de glucosa circulante en el torrente sanguíneo y en los tejidos²⁰.

Aunque las células endocrinas adultas se identifican por la hormona que expresan, también expresan factores de transcripción y otros marcadores necesarios para su función que son específicos y, por tanto, útiles para la identificación de los diferentes subtipos celulares en el islote. Las células β , por ejemplo, expresan específicamente marcadores como Glut-2, Nkx6.1, MafA o Pdx1, siendo este último también expresado en células δ . Además, hay ciertos factores que se expresan en el linaje completo de célula endocrina adulta como Isl-1, Pax-6 o Nkx2.2 (a excepción de las células δ)²¹⁻²⁴.

1.3. Diferencias estructurales entre el páncreas de humano y el de ratón

Gran parte de nuestro conocimiento sobre la estructura y función del páncreas procede de modelos animales, en concreto, de modelos murinos. Los hallazgos descritos en modelos de ratón son generalmente extrapolados a humanos, pero es importante tener en consideración que existen algunas diferencias entre el páncreas de ambas especies²⁵.

Macroscópicamente, el páncreas humano presenta 3 lóbulos, cabeza, cuerpo y cola²⁶. Sin embargo, el páncreas de ratón consta de 3 lóbulos con separaciones más difusas como son el lóbulo duodenal, el gástrico y el esplénico (Fig. I1). Los lóbulos principales del páncreas en ambas especies están separados por tejido adiposo, conectivo y linfático.

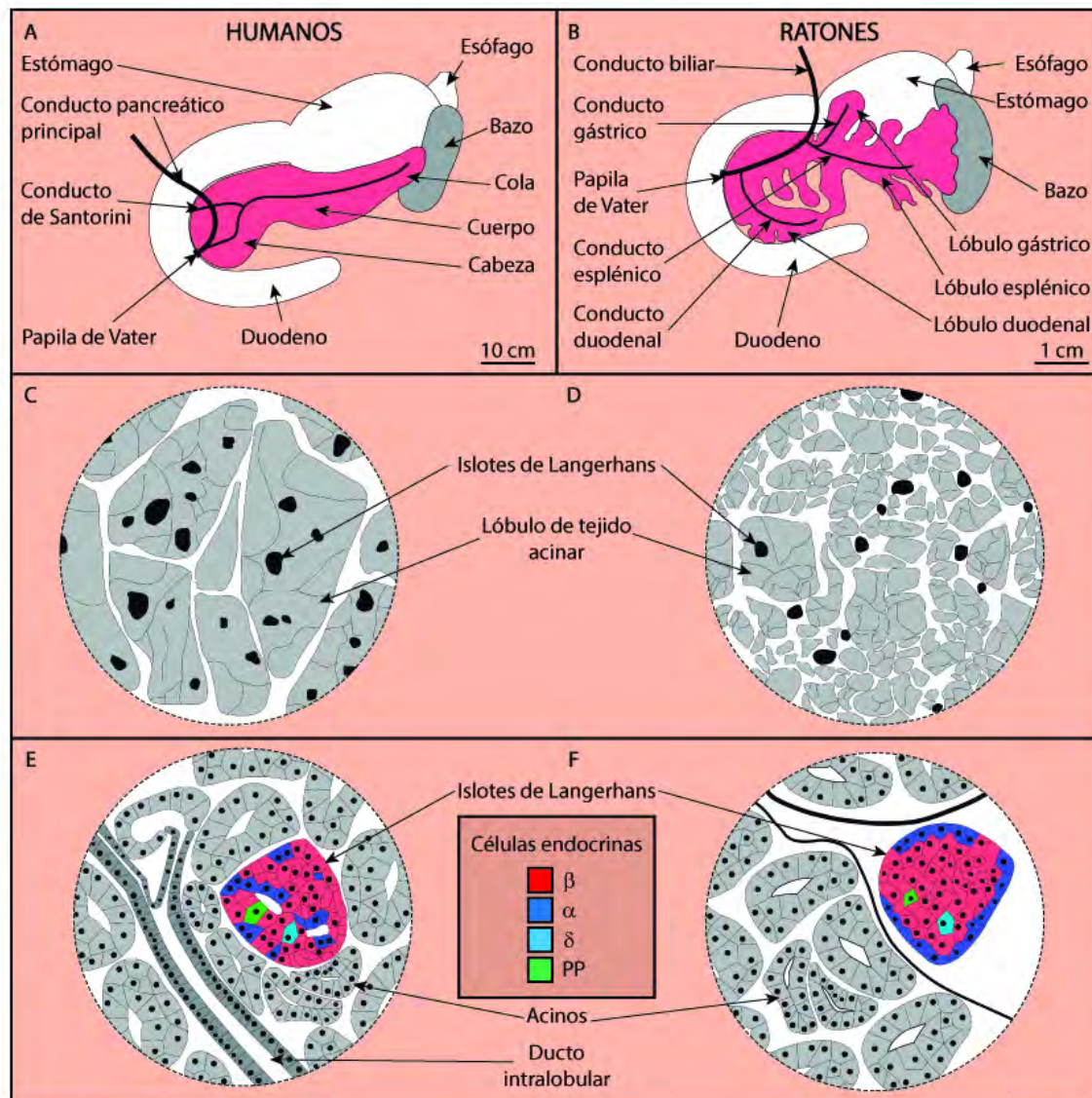


Figura 11. Diferencias anatómicas e histológicas entre el páncreas de ratón y el de humanos. (A, B) Esquema de la anatomía del páncreas de humano (A) y de ratón (B). Nótese la diferencia significativa en la barra de la escala. (C-D) Estructuras microscópicas de la anatomía del páncreas de humano (C, E) y de ratón (D, F). (C, D) Representación magnificada de una porción de páncreas donde se observa la localización de los islotes de Langerhans respecto a los lóbulos de tejido acinar en humanos (C) y en ratones (D). (E-F) Composición celular y localización de los diferentes subtipos celulares que conforman el islote de Langerhans. Adaptado de ²⁵.

A nivel microscópico destacan múltiples diferencias a nivel de la anatomía ductal. En humanos, los acinos canalizan sus secreciones de los polos apicales de las células acinares al lumen de lo que se denomina ducto intercalado. Los ductos intercalados, a su vez, drenan a los ductos intralobulares

que, a su vez, al salir de los lóbulos principales, drenan a los ductos interlobulares. Estos últimos convergen en el ducto pancreático principal (también denominado ducto de Wirsung) que se extiende a través de todo el páncreas. El ducto pancreático principal desemboca en el duodeno adyacente a la entrada del conducto biliar común (colédoco), a través del ámpula de Váter. Excepcionalmente, el páncreas humano puede tener un conducto accesorio, también llamado conducto de Santorini, que es un remanente de la parte distal del ducto pancreático principal presente durante el desarrollo del órgano y que desemboca en el duodeno de manera independiente al ducto principal²⁶.

En el páncreas de ratón, a diferencia del humano, existe un único gran ducto interlobular que conecta cada uno de los 3 lóbulos descritos. El ducto esplénico y el ducto gástrico se fusionan y se unen con el colédoco antes de que el conducto pancreático principal o ducto biliar atraviese la pared del duodeno²⁷.

Respecto al páncreas endocrino, ambas especies muestran tamaños de islotes similares y están compuestos por los mismos 5 subtipos celulares productores de hormonas antes señalados. Existen diferencias entre especies en el porcentaje de cada subtipo celular que componen el islote²⁸. Cabe destacar que, en ratones, la proporción entre células β y células α es mayor que en humanos²⁹. Otro rasgo diferencial entre especies es la disposición espacial o microarquitectura del islote. En ratones, podemos observar un núcleo compuesto en su mayoría por células β , mientras que en la periferia del islote se localizan mayoritariamente las células no β ¹⁹. Sin embargo, en humanos, se han descrito diferentes conformaciones espaciales de los diferentes subtipos celulares en el islote pancreático³⁰. Generalmente, las células β , se organizan en acúmulos por todo el islote y el resto de subtipos celulares aparecen intercalados entre ellas¹⁹.

El sistema macrovascular del páncreas de ratón es altamente homólogo al de humano, mostrando ambos una anatomía bastante similar de arterias y venas mayores irrigando el páncreas³¹. Sin embargo, en el sistema microvascular existen diferencias destacables debido a la diferente localización de los islotes en ratones y humanos. En ratones, debido a la localización

interlobular de los islotes de Langerhans, la sangre venosa es recogida por las venas interlobulillares que forman el llamado sistema insulovenoso. Por otro lado, en humanos, los islotes se ubican predominantemente dentro de los lóbulos, por lo que los capilares que conducen la sangre venosa a los islotes se localizan rodeando los acinos, denominado sistema portal insuloacinar^{32,33}.

2. Organogénesis pancreática

Como se ha definido anteriormente, el páncreas es un órgano con dos compartimentos principales: exocrino y endocrino. Defectos en las células productoras de hormonas que componen el tejido endocrino, puede derivar en patologías tan extendidas como la diabetes mellitus. Por ello, profundizar en el conocimiento del desarrollo embrionario de este tipo celular endocrino en sus primeros estadios, puede ayudar a identificar dianas terapéuticas que permitan desentrañar la patogenia de la diabetes. Además, alteraciones del compartimento exocrino están relacionados con patologías como la pancreatitis o el cáncer de páncreas. Por lo tanto, definir los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del tejido exocrino puede favorecer la identificación de dianas moleculares que permitan tratar estas enfermedades³⁴.

Nuestro conocimiento del desarrollo embrionario del páncreas proviene principalmente de trabajos realizados en modelos murinos y, en general, parece que recapitulan los principales eventos de la embriogénesis pancreática humana³⁵. El páncreas en ratones se genera a partir del tubo intestinal primitivo endodérmico, a los 8.5 días del desarrollo embrionario (E8.5, considerando E0.5 el día en el que se observa el tapón mucoso en la hembra). Durante la primera etapa del desarrollo pancreático, denominada transición primaria, se forman dos primordios pancreáticos independientes, uno dorsal y otro ventral. Cada primordio pancreático requiere, para su desarrollo, múltiples señales exógenas procedentes de diferentes tejidos mesodérmicos adyacentes. El primordio dorsal recibe señales de la placa del mesodermo lateral (ácido retinoico) y de la notocorda (FGF2, factor de crecimiento de fibroblastos 2), mientras que el primordio ventral recibe señales del mesodermo cardiaco (FGF y BMP, proteína morfogénica ósea)³⁶. Estos primordios pancreáticos están

formados principalmente por células positivas para los factores de transcripción Pdx1, Ptf1a y Nkx6.1 y se consideran células progenitoras pancreáticas (MPC, de sus siglas en inglés *Multipotent Pancreatic Cells*), es decir, dan lugar a todos los tipos celulares pancreáticos³⁷. Entorno a E11.5, estas evaginaciones dorsales y ventrales se expanden y se adaptan a la rotación del tracto digestivo primitivo, fusionándose y formando un solo órgano²⁰. Además, estructuralmente, el ducto ventral se fusiona con la parte distal del ducto dorsal para formar el conducto pancreático principal o conducto de Wirsung³⁸.

Durante esta etapa del desarrollo, se especifican los diferentes tipos celulares pancreáticos³⁹ y el epitelio pancreático se va expandiendo y ramificando hasta formar un epitelio complejo y estratificado (Fig. I2). Estas reorganizaciones del epitelio pancreático consiguen definir dos dominios bien definidos, un dominio apical (“*tips*”) que abarca los extremos del epitelio ramificado y un dominio central o troncal (“*trunk*”). El epitelio del dominio apical contiene MPC, mientras que el dominio troncal alberga células que darán lugar a los islotes pancreáticos y a las células ductales⁴⁰. La denominada transición secundaria da comienzo alrededor de E13.5, cuando las MPC localizadas en los dominios apicales comienzan a perder su multipotencialidad y se diferencian a progenitores de células acinares. Durante esta etapa comienzan los procesos de diferenciación de células exocrinas y endocrinas. En este proceso es clave que en las regiones centrales *trunk*, las células expresan el factor de transcripción Nkx6.1, mientras que en las regiones más apicales *tips*, comienzan a predominar células que expresan factores de transcripción como Ptf1a y Cpa1^{37,40}. La expresión de estos factores de transcripción específicos pone en marcha la diferenciación exocrina y endocrina. Es a partir de E14.5, cuando se comienzan a definir los diferentes subtipos celulares pancreáticos los cuales siguen circuitos moleculares exclusivos en cada dominio.

Las células proacinares presentes en las *tips* expresan Ptf1a, cuya expresión queda restringida a estas células³. Por otro lado, las células centrales *trunk* que expresan Nkx6.1, comienzan a coexpresar Hnf1 β y Sox9, formando así las células ductales. Sin embargo, cuando se intenta definir la formación de las células endocrinas, algunos estudios proponen que los progenitores endocrinos surgen a partir de las células epiteliales Hnf1 β ⁺ y Sox9⁺ mediante un

proceso progresivo que comienza en esta etapa del desarrollo y concluye al final de la embriogénesis^{41,42}. Otros estudios proponen que en estos estadios del desarrollo los linajes ductal y endocrino ya se encuentran separados⁴³. En cualquier caso, los progenitores endocrinos requieren la presencia de un factor de transcripción clave, neurogenin 3 (Ngn3)⁴³, cuya expresión alcanza su máximo nivel en un subtipo celular del tronco sobre E15.5 y decrece posteriormente.

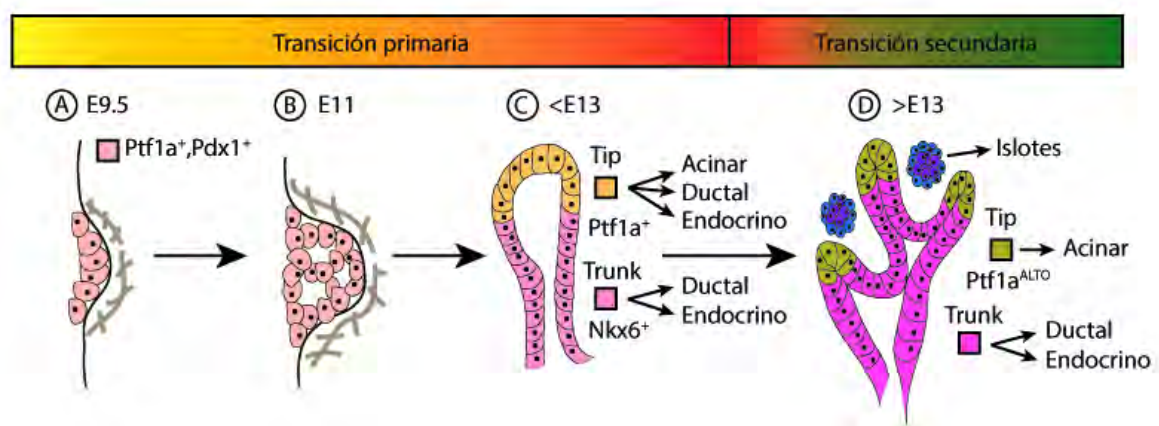


Figura I2. Etapas del desarrollo embrionario del páncreas. (A) Formación del primordio pancreático y expansión de su epitelio. (B) Formación de los microlúmenes. (C) Reorganización del epitelio pancreático conformando los dominios apicales *tips* y troncales *trunks*. (D) Morfogénesis pancreática, ramificación, diferenciación celular y formación de los islotes pancreáticos. Se indica en la imagen los factores de transcripción principales de cada estadio en cada tipo celular. Adaptado de 44.

En las últimas etapas del periodo gestacional (>E16.5), una vez acabada la transición secundaria, da comienzo la transición terciaria, donde el páncreas sigue expandiéndose y creciendo mediante mecanismos de proliferación, tanto en el compartimento exocrino como en el compartimento endocrino. Durante esta etapa, el tejido pancreático sufre remodelaciones estructurales y las células sufren procesos de maduración adicionales. Las células endocrinas van madurando y migran del tejido exocrino adyacente para organizarse en pequeños agregados que darán lugar a los islotes pancreáticos⁴⁵.

2.1. Factores de transcripción reguladores de la organogénesis pancreática

En las últimas décadas, se han definido los factores de transcripción críticos en la formación, especificación y maduración del páncreas. Es llamativo que, la expresión de muchos de estos genes embrionarios se reactiva en patologías pancreáticas en la fase adulta como en el cáncer de páncreas⁴⁶. Por esta razón, un estudio pormenorizado de los factores de transcripción presentes en los primeros estadios del desarrollo, entre otros motivos, puede ayudar a profundizar en el conocimiento de la fisiopatología pancreática. Hay dos factores de transcripción que tienen una relevancia especial en esta tesis doctoral y que, además, son probablemente los más relevantes de la morfogénesis pancreática y están implicados en la especificación y en otros pasos posteriores del desarrollo embrionario: Pdx1 (del inglés, *Pancreas and duodenal homeobox gene-1*) y Ptf1a/p48 (del inglés, *Pancreatic transcription factor-1*, en adelante *Ptf1a*)⁴⁵.

Pdx1 es un factor de transcripción que se expresa en el endodermo prepancreático murino desde E8.5, antes de la formación del primordio pancreático. Posteriormente, a partir de E10.5, la expresión de Pdx1 se extiende a duodeno, conducto biliar y el segmento posterior del estómago⁴⁷. En las etapas finales del desarrollo y en etapas posnatales, la expresión de Pdx1 queda restringida a célula β y célula δ ⁴⁷, siendo inapreciable su expresión en el tejido exocrino. La importancia de este factor de transcripción en la formación del páncreas queda de manifiesto ya que su inactivación en línea germinal causa una agenesia pancreática⁴⁸. Además, diferentes estudios de trazado de linaje han demostrado que todos los tipos celulares pancreáticos adultos proceden de un precursor común que expresa Pdx1. Pdx1 también es imprescindible para el mantenimiento de la identidad y para la correcta funcionalidad de la célula β pancreática adulta y, de hecho, su inactivación en este tipo celular produce diabetes⁴⁹.

Por otra parte, Ptf1a se expresa en el epitelio pancreático desde E9.5, restringiéndose su expresión a las células precursoras acinares a E13.5. Al igual que Pdx1, la inactivación de su expresión conduce a una agenesia pancreática.

Estos estudios describen la formación de un primordio pancreático, por lo que el papel de ambos factores de transcripción queda restringido a la expansión y determinación del tejido pancreático, pero no es esencial para su especificación. Ptf1a es imprescindible para determinar la identidad y para promover la expansión de los progenitores pancreáticos (Pdx1⁺), puesto que se ha descrito que las células deficientes para Ptf1a adoptan una identidad intestinal o ductal⁵⁰.

3. Fisiopatología pancreática

3.1. Fisiopatología del páncreas endocrino

Se han descrito múltiples patologías que afectan directamente al componente endocrino del páncreas. Entre ellas, destacan las definidas como neoplasias endocrinas, que representan alrededor de un 2% de todas las neoplasias pancreáticas y tienen diferente naturaleza y consideraciones clínicas según el subtipo de célula endocrina que afecte. Sin embargo, la patología endocrina con mayor relevancia clínica dada su prevalencia y que está alcanzando niveles de epidemia mundial, es la diabetes mellitus (DM).

3.1.1. Diabetes Mellitus

La DM es la patología asociada al páncreas más frecuente, con una prevalencia mundial en adultos de un 8.5%, afectando a más de 422 millones de personas⁵¹. La DM es un desorden metabólico que se caracteriza por una hiperglucemia descontrolada y cronificada, provocada por una disfunción en el mecanismo de secreción de insulina o por la existencia de una resistencia periférica a su acción o una combinación de ambas. En cualquier caso, la consecuencia metabólica de este desorden es una alteración de la homeostasis de la glucosa con las correspondientes complicaciones sistémicas que puede conllevar. Dependiendo de las causas que subyazcan, se pueden definir diferentes tipos de DM.

3.1.1.1. Diabetes tipo 1 (DT1)

La DT1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por una destrucción selectiva de las células β productoras de insulina, no viéndose afectados otros subtipos celulares del islote de Langerhans⁵². Como en la mayoría de las patologías de este tipo, se desconoce el mecanismo que desencadena la reacción autoinmune⁵³, aunque se han señalado algunos factores ambientales (infecciones, nutrición, químicos, etc.) como posibles desencadenantes. Los diabéticos tipo 1 son dependientes del tratamiento con insulina⁵⁴ y requieren un control de su glucosa circulante para reducir el riesgo de complicaciones⁵⁵.

Durante las fases iniciales de la enfermedad, los pacientes diabéticos no muestran alteración en los niveles basales de glucosa, aun detectándose destrucción progresiva de célula β y positividad serológica, puesto que la reserva pancreática funcional es suficiente para mantener la normoglucemia. En etapas posteriores de la patología, la destrucción masiva de células β conlleva el aumento de la concentración de glucosa en sangre⁵⁶.

3.1.1.2. Diabetes tipo 2 (DT2)

La DT2 se caracteriza por una disfunción de la célula β existente, por la incapacidad de responder a un incremento en la demanda metabólica, a una resistencia periférica a la acción de la insulina o la combinación de estos factores. Es el subtipo de diabetes más común y en España muestra una prevalencia aproximada del 13.8%⁵⁷. Esta patología tiene una fuerte influencia ambiental, estando asociada a malos hábitos de salud, alteraciones nutricionales y otros tipos de factores relacionadas con estilos de vida sedentarios (obesidad, hipertensión, etc.)⁵⁸.

Además de factores ambientales, la DT2 también muestra cierta predisposición genética⁵⁹ como se ha demostrado en estudios de asociación familiares⁶⁰. En los pacientes con DT2, las células β , como respuesta compensatoria temporal, pueden mejorar su capacidad funcional y aumentar la

producción de insulina y gránulos secretores. Sin embargo, el estrés celular al que están sometidas puede desembocar en una sobrecarga y una disfuncionalidad de la célula β .

3.1.1.3. Otros tipos de diabetes

Existen otros tipos de diabetes menos prevalentes que no encajan completamente en las categorías establecidas tipo 1 o 2 como son, por ejemplo, la denominada diabetes gestacional, definida como la diabetes que se logra diagnosticar en una paciente sin antecedentes diabéticos que se encuentra en las primeras fases del embarazo⁶¹. También existen las denominadas diabetes tipo MODY (del acrónimo en inglés, *Maturity Onset Diabetes of the Young*) que conglobera diferentes tipos de diabetes que están causadas por mutaciones monogénicas en heterocigosis⁶². Además, las diabetes asociadas a mutaciones del ADN mitocondrial y, por lo tanto, de herencia materna, se denominan diabetes mitocondriales⁶³.

La DM se puede desarrollar como consecuencia directa de otras patologías, incluyendo enfermedades del páncreas exocrino. En la actualidad, se está considerando una nueva clasificación, denominada diabetes tipo 3c (DT3c), a las condiciones diabéticas hiperglucémicas que son consecuencia directa de una patología exocrina. Entre estas afecciones exocrinas encontramos pancreatitis crónica, adenocarcinomas ductales, fibrosis quísticas, etc⁶⁴.

3.2. Fisiopatología del páncreas exocrino

Existen múltiples patologías asociadas a alteraciones de alguno de los componentes del tejido exocrino del páncreas. Estas disfunciones del tejido exocrino tienen una gran prevalencia dentro de las patologías pancreáticas y pueden estar producidas por eventos de inflamación, neoplasias u obstrucción de los conductos.

3.2.1. Pancreatitis aguda y crónica

La pancreatitis es una enfermedad necroinflamatoria que afecta al compartimento exocrino del páncreas y que es, además de una enfermedad con alta prevalencia, uno de los factores de riesgos de cáncer de páncreas más relevantes⁶⁵.

La pancreatitis aguda es la patología gastrointestinal y hepática que produce el mayor número de ingresos hospitalarios en la actualidad⁶⁵. Tiene diferentes causas como la obstrucción de los conductos pancreáticos debido a cálculos biliares, el consumo de alcohol, los traumatismos abdominales, el estrés metabólico, entre otros⁶⁶. Estos factores pueden producir en el tejido pancreático una respuesta inflamatoria aguda de carácter transitorio. El daño acinar producto de la respuesta inflamatoria puede ser de carácter reversible si se trata adecuadamente, pero pueden darse complicaciones que cronifiquen la patología y que derive en una pancreatitis crónica.

Por otra parte, la pancreatitis crónica (PC) se define como una enfermedad fibroinflamatoria, producida por repetidos episodios inflamatorios en el tejido exocrino del páncreas que desembocan en un daño tisular irreversible⁶⁷. La PC se caracteriza por calcificaciones parenquimales o intraductales, fibrosis extendida, necrosis e insuficiencia endocrina y exocrina. Esta enfermedad reduce de manera drástica la calidad de vida de los pacientes puesto que pueden desarrollar dolor abdominal agudo, diabetes asociada y, además, incrementa el riesgo de padecer cáncer de páncreas⁶⁸.

Histológicamente, la pancreatitis se caracteriza por una pérdida masiva de tejido acinar, fibrosis del parénquima pancreático, presencia de infiltrados inflamatorios y por la aparición de unas estructuras aberrantes de morfología tubular muy características⁶⁹.

3.3. Papel de la célula acinar en la patología exocrina: Plasticidad acinar

De todos los linajes de células pancreáticas adultas, las células acinares son las que parecen mostrar una mayor plasticidad celular⁷⁰. Se ha descrito que las células acinares adultas pueden desdiferenciarse o transdiferenciarse a diferentes tipos celulares pancreáticos e incluso en algún otro subtipo de origen endodermal. Así, las células acinares pueden diferenciarse a diferentes células endocrinas, como células β ⁷¹ o incluso adquirir un fenotipo similar a las células α y δ ⁷². También se ha descrito su capacidad de transdiferenciarse a hepatocitos⁷³ y adipocitos⁷⁴. Sin embargo, el proceso metaplásico de las células acinares más estudiado es la desdiferenciación a un tipo celular con un fenotipo de progenitor embrionario, que expresa marcadores ductales y embrionarios. Este proceso se denomina metaplasia acino-ductal (ADM, por su acrónimo en inglés)⁷⁵. La ADM tiene lugar en el páncreas en situaciones de daño o estrés, jugando un papel fundamental en la regeneración del tejido pancreático durante patologías inflamatorias como la pancreatitis o el cáncer de páncreas. Aunque la plasticidad acinar contribuye a la capacidad para expandir y regenerar el tejido exocrino, también participa en las transformaciones neoplásicas.

3.3.1. Metaplasia acino-ductal (ADM)

En condiciones patológicas, las células acinares del páncreas adulto pueden ser transformadas en células con características morfológicas similares a las ductales. Disminuye la expresión de genes de identidad acinar (*PTF1A*, *CPA1*, *BHLHA15* (*MIST1*), *AMY2*, etc.) y se induce la expresión de genes típicos de células ductales como *SOX9*, *KRT19* o *HNF1B*¹³. En este contexto, como consecuencia de los eventos de la ADM, las células acinares son reemplazadas por lesiones ductales metaplásicas, las cuales son muy comunes en modelos de pancreatitis y cáncer de páncreas (revisado en ⁷⁶).

La ADM se considera un proceso reversible donde las células, tras contribuir a la regeneración de las estructuras acinares y la repoblación del páncreas, son capaces de rediferenciarse. Sin embargo, en un contexto

oncogénico, como en el descrito en modelos animales con mutaciones en el gen *KRAS*, la ADM puede transformarse en un proceso irreversible y las lesiones ductales metaplásicas producidas pueden progresar a estadios más avanzados formando diferentes lesiones neoplásicas intraepiteliales precancerosas⁷⁷ (PanIN), que pueden desembocar en el desarrollo de un adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Por todo esto, se considera la ADM como un posible evento desencadenante de las lesiones precursoras de estadios cancerosos avanzados⁷⁸, lo que daría una plausibilidad biológica a los estudios epidemiológicos que demuestran una relación entre la pancreatitis crónica y el cáncer de páncreas.

3.4. Cáncer de páncreas

En las últimas décadas, se han descubierto los principales mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del cáncer de páncreas. Esto ha ayudado a una identificación y clasificación más precisa de los distintos tipos de cáncer pancreáticos que muestran unas características genéticas y clínicas diferenciales.

En la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se establecieron unos parámetros histológicos para la caracterización y clasificación de las lesiones malignas del páncreas exocrino⁷⁹. En la Tabla I1, se recogen todos los subtipos de patologías cancerosas recogidas en la clasificación de la OMS. Más del 90% de los carcinomas exocrinos diagnosticados se corresponden al subtipo adenocarcinoma ductal pancreático. Sin embargo, existen otros subtipos histológicos que, aunque son menos prevalentes, deben ser considerados.

Tabla 11. Clasificación de la OMS de los tipos de tumores pancreáticos invasivos del compartimento exocrino.

Subtipos histológicos
Adenocarcinoma ductal
Carcinoma mucinoso no quístico
Carcinoma con células en anillo de sello (<i>Signet-ring cell carcinoma</i>)
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma indiferenciado
Carcinoma mixto ductal-endocrino
Tumor de células gigantes tipo osteoclasto
Adenocarcinoma quístico mucinoso
Adenocarcinoma quístico seroso
Carcinoma intraductal papilar mucinoso
Carcinoma invasivo papilar mucinoso
Carcinoma de células acinares
Pancreatoblastoma
Carcinoma sólido pseudopapilar
Carcinomas extremadamente raros
Adenocarcinoma de células claras
Adenocarcinoma oncocítico
Coriocarcinoma

3.4.1. Carcinoma adenoescamoso

Este subtipo histológico constituye el 1-4% de todos los carcinomas pancreáticos exocrinos. La principal característica histológica de este tipo tumoral es que contiene una mezcla de patrones, mezclando componentes de adenocarcinoma ductal y de carcinoma de células escamosas⁸⁰. El componente de adenocarcinoma ductal queda reflejado en estructuras similares a ductos revestidos por una capa de células columnares con núcleos vesiculosos. Más del 80% de los casos presentan infiltración perineural⁸¹. Se han descrito diferentes alteraciones genéticas somáticas en este tipo de lesiones que afectan a genes como *KRAS*, *CDKN2A* (p16) o *TP53* (p53)⁸².

3.4.2. Adenocarcinoma quístico seroso

Este subtipo de carcinoma pancreático es de naturaleza quística, representa menos del 1% de todas las lesiones primarias de páncreas y tiene mayor incidencia en mujeres (70%)⁸³. Son muy similares a las neoplasias quísticas serosas, que son pequeñas lesiones asintomáticas benignas pero, en este caso, pueden presentar un componente de malignidad elevado. Histológicamente, son indistinguibles de las lesiones neoplásicas, siendo determinante para su clasificación la presencia de invasión o metástasis en órganos adyacentes⁸⁴. Microscópicamente, son lesiones neoplásicas micro y macroquísticas, cuyo epitelio está constituido por células cuboidales ricas en glucógeno, sin atipia celular o producción de mucinas, que están separadas entre sí por tabiques fibrosos que contienen vasos. Las lesiones están pseudoencapsuladas en tejido fibrótico y rara vez presentan invasión perineural⁸⁵.

3.4.3. Carcinoma de células acinares

Los carcinomas pancreáticos de células acinares son raros, representando el 1-2% de los casos de tumores pancreáticos en adultos, incluyendo los carcinomas de células acinares, los pancreatoblastomas y otros carcinomas mixtos. Los pacientes diagnosticados con esta patología tienen un mal pronóstico, con una supervivencia media de entre 18 y 47 meses⁸⁶. Morfológicamente, estos carcinomas presentan diferentes patrones histológicos que dificultan su diagnóstico, ya que pueden aparecer con una distribución celular muy similar al tejido acinar normal, o pueden aparecer como tumores sólidos con conglomerados de células neoplásicas poco diferenciadas⁸⁷. Se han identificado alteraciones genéticas en los genes típicos de las neoplasias pancreáticas como son *KRAS*, *SMAD4*, *CDKN2A* o *TP53*, pero siempre en menor frecuencia que en PDACs. Además, se han descrito que este tipo de neoplasia maligna presenta fusiones génicas donde están involucrados los genes *BRAF* y *RAF1*⁸⁸.

3.4.4. Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)

El PDAC es el tipo de cáncer de páncreas más común, representando más del 90% de los casos. Es de tipos tumorales con mayor letalidad, de hecho, su incidencia y su tasa de mortalidad son prácticamente idénticas, siendo de un 8% la tasa de supervivencia a 5 años⁸⁹. Hay múltiples factores que contribuyen al mal pronóstico y la baja supervivencia de la enfermedad, siendo uno de los principales el diagnóstico tardío. La mayoría de los pacientes diagnosticados con un PDAC son asintomáticos hasta que la enfermedad se encuentra en un estado avanzado. Se ha estimado que se necesitan alrededor de unos 10 años de desarrollo de la enfermedad para que las células pancreáticas muten y progresen a un estado avanzado invasivo de la enfermedad. Por lo que, un diagnóstico temprano es uno de los factores más importantes que pueden mejorar el pronóstico del paciente⁹⁰. Otros de los factores relacionados con la baja supervivencia del PDAC son la alta probabilidad de metástasis en tejidos adyacentes o distantes y la alta resistencia a tratamientos de quimioterapia y radioterapia. En la última década, con la implementación de la secuenciación masiva, se ha avanzado mucho en la identificación y caracterización de los PDAC y, sobre todo, de sus lesiones precursoras, que se describen en el siguiente apartado⁹¹.

Existen varios factores de riesgos asociados al PDAC que se clasifican en factores modificables (relacionados con el ambiente y estilos de vida) y factores genéticos (revisados en ⁹²). Entre los factores de riesgo modificables se encuentran el tabaquismo, el alcoholismo, la obesidad y patologías previas como diabetes (tipo 1 y 2) o la pancreatitis crónica. Por otra parte, existen factores de riesgo genéticos, hereditarios o esporádicos, que predisponen a un paciente a desarrollar un PDAC. Aunque la mayoría de los PDAC aparecen de manera esporádica, se estima que un 10% de los casos se deban a predisposición genética familiar⁹³.

3.5. Histopatología de los PDAC

En etapas tempranas del desarrollo de los PDAC, se encuentran diferentes tipos de lesiones ductales metaplásicas, que dependiendo de diversas características morfológicas se pueden clasificar en tres grandes grupos: lesiones inducidas por inflamación, lesiones preinvasivas neoplásicas y lesiones invasivas neoplásicas.

3.5.1. Lesiones inducidas por inflamación

Dentro de esta categoría de lesiones inducidas por inflamación encontramos las lesiones de complejos tubulares I (TC, por su acrónimo en inglés, *tubular complexes*) y TC II, además de las lesiones metaplásicas mucinosas (MM, por su acrónimo en inglés, *mucinous metaplasia*). Las TC se definen como estructuras cilíndricas que un amplio lumen formado por una monocapa de células aplanadas similares a la observada en los ductos⁹⁴. Este tipo de lesiones han sido observadas en pacientes con pancreatitis aguda⁹⁵ y crónica⁹⁶. También se han descrito en modelos murinos de pancreatitis, tanto en modelos de cáncer de páncreas inducidos por carcinógenos⁹⁷, como en los genéticamente modificados⁹⁸. Morfológicamente, las lesiones TC I se caracterizan por presentar alrededor del lumen pocas células grandes y aplanadas, similares a células acinares. Por otro lado, las lesiones TC II, presentan un mayor número de estas células distribuidas con una disposición de complejas ramificaciones⁹⁵.

Aunque es un tema controvertido, algunos autores han propuesto que las lesiones TC puede ser un estadio previo a lesiones preneoplásicas y que incluso pueden progresar hasta desarrollar un PDAC^{99,100}.

3.5.2. Lesiones preneoplásicas

Las lesiones preneoplásicas más estudiadas (Fig. I3) son: las neoplasias pancreáticas intraepiteliales (PanIN), las neoplasias papilares intraductales mucinosas (IPMN), las neoplasias quísticas mucinosas (MCN) y lesiones aplanadas atípicas (AFL).

3.5.2.1. Neoplasias pancreáticas intraepiteliales – PanIN

Las lesiones PanIN son neoplasias microscópicas no invasivas con un epitelio papilar o aplanado con diferente grado de atipia. Las lesiones PanIN presentan desde células epiteliales cuboidales a columnares y contienen gran cantidad de mucinas en su citoplasma¹⁰¹. Históricamente, las lesiones PanIN se han clasificado en 3 grupos diferentes, PanIN-1, PanIN-2 y PanIN-3. Sin embargo, recientemente, se ha propuesto un sistema de clasificación que unifica la histopatología con la clínica, agrupando las lesiones PanIN en dos grupos: de bajo y de alto grado¹⁰².

Las lesiones PanIN de bajo grado, donde se incluyen los grupos anteriormente definidos como PanIN-1 y PanIN-2, muestran una naturaleza papilar o aplanada, con el núcleo celular localizado en la región basal y con un grado de atipia celular leve o moderado. Por otro lado, las lesiones PanIN de alto grado, del grupo PanIN-3, son lesiones generalmente papilares que se caracterizan por la pérdida de polaridad, estratificación irregular del epitelio, alto grado de atipia celular, mitosis y, ocasionalmente, con necrosis intraluminal¹⁰³. Las lesiones PanIN de bajo grado se encuentran de manera esporádica en la población adulta mayor de 50 años y, aunque se puedan considerar precursoras, su presencia no están necesariamente asociada a la presencia de PDAC¹⁰⁴. Sin embargo, cuando se detectan lesiones PanIN de alto grado, se requiere un minucioso examen histológico para descartar algún posible componente invasivo, puesto que son lesiones altamente asociadas a PDAC¹⁰⁵.

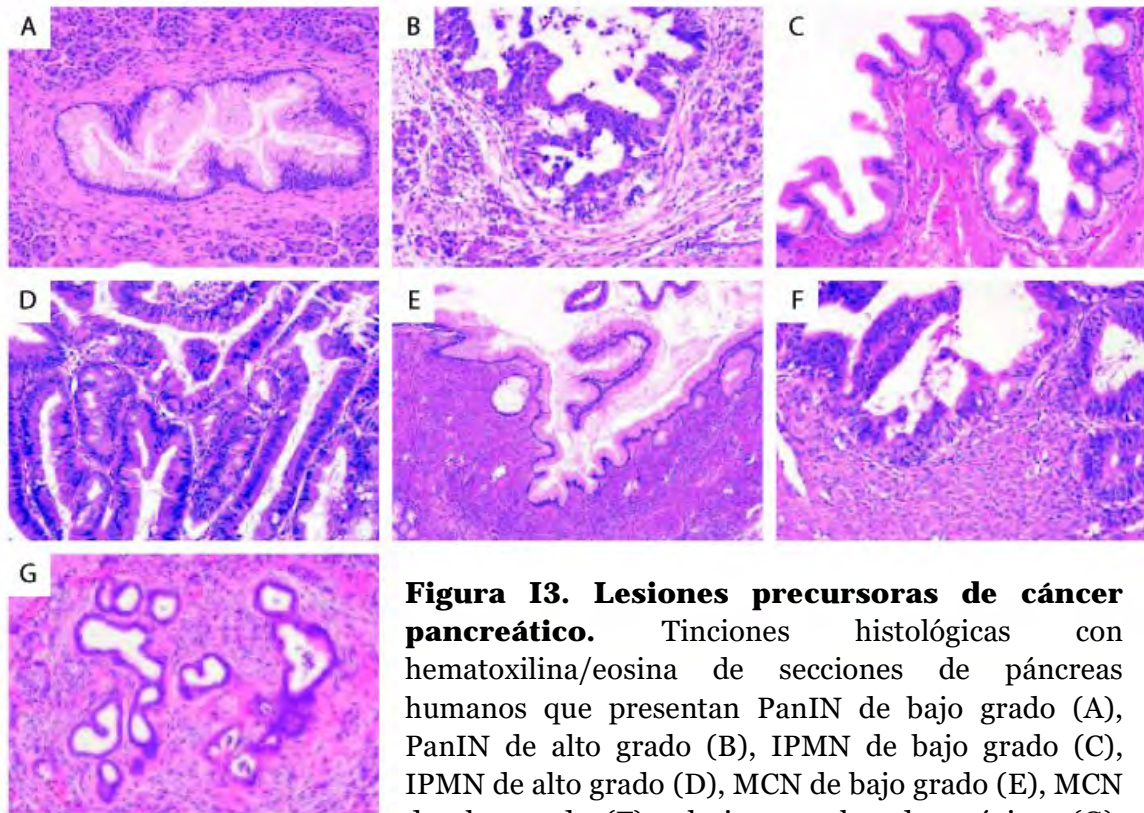


Figura 13. Lesiones precursoras de cáncer pancreático. Tinciones histológicas con hematoxilina/eosina de secciones de páncreas humanos que presentan PanIN de bajo grado (A), PanIN de alto grado (B), IPMN de bajo grado (C), IPMN de alto grado (D), MCN de bajo grado (E), MCN de alto grado (F) y lesiones aplanadas atípicas (G). Imágenes procedentes de ^{105,106}.

Histológicamente, todas las lesiones PanIN son positivas para tinciones histológicas como la tinción con azul alcian o la tinción de ácidos periódicos de Schiff (tinción PAS), utilizadas para detectar la presencia de un componente mucinoso citoplasmático. Además, las distintas lesiones muestran patrones diferenciales respecto a la expresión de mucinas. Las lesiones PanIN de bajo grado expresan diferentes mucinas como MUC5AC y MUC6, mientras que las lesiones de alto grado muestran expresión de MUC1. Cabe destacar que ninguna lesión PanIN, al contrario que otras lesiones preinvasivas, expresa MUC2¹⁰⁷.

3.5.2.2. Neoplasias papilares intraductales mucinosas – IPMN

Las lesiones IPMN son neoplasias quísticas epiteliales de gran tamaño (> 1 cm). Generalmente, se localizan en el conducto pancreático principal o en alguna de sus ramificaciones y se caracterizan por su alta producción de mucinas y sus proyecciones papilares¹⁰¹. El epitelio está compuesto por células columnares que poseen numerosos gránulos de mucinas en la región apical. Según la morfología del epitelio mucinoso de la lesión, se pueden clasificar en diferentes subtipos histológicos: gástrico, intestinal, pancreatobiliar y oncocítico. Aunque en una única IPMN podemos encontrar varios de estos subtipos histológicos, el subtipo más abundante es el que define su denominación histológica. La acumulación histológica de diferentes mucinas permite definir con exactitud el subtipo morfológico. Así, el subtipo IPMN-gástrico, el subtipo más común, expresa MUC5AC; el subtipo IPMN-intestinal expresa MUC2 y CDX2; el IPMN-pancreatobiliar expresa MUC1 y MUC6 focalmente y el subtipo IPMN-oncocítico, asociado a la presencia de carcinoma *in situ*, muestra expresión de MUC1, MUC6¹⁰⁸.

Según el grado de displasia, las IPMN son clasificadas, al igual que las lesiones PanIN, en bajo y alto grado. La atipia celular y estructural aumenta al progresar las lesiones de bajo a alto grado de displasia. Las lesiones IPMN de alto grado se caracterizan por una arquitectura estratificada compleja, con cierta pérdida de polaridad celular y núcleos irregulares e hipercromáticos¹⁰⁹.

3.5.2.3. Neoplasias quísticas mucinosas – MCN

Las MCN son neoplasias quísticas, cuyo epitelio está formado por células columnares productoras de mucinas y por células aplanadas no productoras de mucinas. Lo que caracteriza a estas lesiones, a diferencia de las lesiones PanIN e IPMN, es la presencia de un estroma subepitelial muy característico¹¹⁰. Es una lesión que, en más del 90% de las ocasiones, afecta a mujeres, y un tercio de ellas pueden ser invasivas. Las células columnares del epitelio de la lesión muestran diferentes grados de atipia nuclear y se clasifican según su grado de

displasia. A diferencia de las lesiones previamente descritas, son lesiones que no están conectadas a los ductos pancreáticos de pequeño o gran calibre¹¹¹.

3.5.2.4. Lesiones aplanadas atípicas – AFL

Recientemente se han descrito otras lesiones precursoras de PDAC, las AFL¹¹². Las lesiones AFL aparecen en regiones con alto grado de ADM y se caracterizan por la presencia de un estroma laxo altamente celularizado que rodea las estructuras tubulares. Su epitelio está formado por células cuboidales con atipia citológica, con núcleos hiperplásicos, alto número de mitosis y con un ratio núcleo-citoplasma muy elevado¹⁰⁶. Las AFL no suelen tener células epiteliales productoras de mucina y se localizan en pequeños agregados intralobulares que no superan los 0.5 cm, en el compartimento acinar-centroacinar. Cabe destacar que son lesiones hiperproliferativas, a diferencia de las lesiones PanIN, que muestran una baja tasa de proliferación. Quizás por ello, la presencia de estas lesiones está relacionada con PDAC esporádicos y con cáncer de páncreas familiar.

3.5.3. Progresión y desarrollo de PDAC

La progresión histológica que sufren las lesiones preneoplásicas hasta desarrollar una lesión invasiva cancerosa ha sido sujeto de debate en diferentes tipos de cáncer desde hace más de tres décadas ¹¹³. Aunque en apartados anteriores hemos descrito diferentes tipos de lesiones que pueden ser precursoras de PDAC, por facilitar la comprensión, nos centraremos en las lesiones PanIN que, además de ser las más comunes, tienen un papel relevante en el desarrollo de esta tesis.

Los primeros modelos generados para estudiar la progresión del cáncer pancreático ya propusieron que existían una serie de mutaciones que desencadenaban las transformaciones neoplásicas de las lesiones PanIN hasta un PDAC invasivo¹¹⁴. Está ampliamente aceptado que una de los eventos iniciales en la carcinogénesis pancreática más importantes es una mutación

puntual en el oncogén *KRAS*. El 94% de los PDAC tienen una mutación en este gen. Estas mutaciones también se encuentran en las lesiones precursoras PanIN, siendo mayor el porcentaje en lesiones con alto grado de displasia¹¹⁵. La activación del oncogén *KRAS* tiene un amplio efecto a nivel celular, puesto que afecta a múltiples funciones biológicamente relevantes como proliferación, supervivencia celular, alteración de la citoarquitectura o a la diferenciación celular. Las dianas de *KRAS* mejor establecidas son la ruta de las MAP quinasas (MAPK) y la ruta del fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) - AKT¹¹⁶.

Según los modelos clásicos de progresión cancerosa, además de mutaciones en el oncogén *KRAS*, las lesiones PanIN van acumulando alteraciones genéticas secuenciales de manera lineal en genes como *CDKN2A*, *INK4A*, *TP53* o *SMAD4*. Estas mutaciones serían las responsables de la progresión en el grado de displasia hasta alcanzar un alto grado (antes denominadas lesiones PanIN-2/3) y desarrollar finalmente un PDAC¹⁰⁹. En la actualidad, se han propuesto otros modelos que intentan explicar el desarrollo de las lesiones PanIN hasta PDAC, sin la aparición secuencial de mutaciones acumulativas. En estos modelos, se sugiere que las mutaciones en *KRAS* podrían favorecer la aparición de eventos displásicos, que conlleven una progresión tumoral, en aquellas células que presenten pérdida de heterocigosidad en diferentes supresores de tumores como *TP53* o *INK4A*¹¹⁷. Según estos modelos, solo las lesiones PanIN con alto grado de displasia (PanIN-2/3), que poseen estas mutaciones adicionales, podrían dar lugar a un PDAC, mientras que las lesiones con bajo grado de displasia (PanIN-1), que solo presentan mutaciones en *KRAS*, activan marcadores de senescencia o parada de ciclo celular¹¹⁸.

En este sentido, estudios recientes de secuenciación masiva de PDAC, han concluido que no existe una secuencia definida de alteraciones genéticas. También proponen que dichas alteraciones no se adquieren de manera independiente y que pueden verse afectados diferentes genes supresores de tumores en conjunto¹¹⁹. Otros estudios de secuenciación masiva en PDAC, han confirmado la existencia de mutaciones en los genes de conocida importancia en el cáncer de páncreas como *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4* o *ARID1A*, y han propuesto nuevas mutaciones candidatas implicadas en la carcinogénesis pancreática como *KDM6A* y *PREX2*¹²⁰.

3.5.4. Hipoxia y tumorigénesis

En humanos, la tumorigénesis siempre se ha entendido como un proceso multifactorial que implica la adquisición de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que producen defectos en los puntos de control del ciclo celular al aumentar la inestabilidad genómica de esas regiones¹²¹. Dichas alteraciones provocan que las células cancerosas adquieran una serie de características que las diferencian de las células normales. Estas características de las células cancerosas se conocen como “sellos distintivos” o *hallmarks* (Fig. I4) e incluyen: resistencia a los inhibidores de factores de crecimiento; proliferación en ausencia de factores de crecimiento exógenos; evasión de la apoptosis; reactivación de la telomerasa permitiendo un ilimitado potencial replicativo; angiogénesis anómala; evasión de la intervención del sistema inmunológico; invasividad y capacidad de metastatizar^{121,122}.

Estos conceptos han ido revisándose y ampliándose durante las últimas décadas, añadiéndose varias características más como la desregulación energética de la célula, la inestabilidad genómica y mutaciones, la evasión de la destrucción inmunológica y la inflamación inducida por el tumor¹²³. Durante las últimas décadas, se ha definido un tumor, de manera reduccionista, como un grupo relativamente homogéneo de células cancerosas donde el conocimiento del tumor se basaría en elucidar las propiedades individuales de ese tipo celular canceroso. Sin embargo, en los últimos tiempos, el conocimiento de la biología molecular del cáncer ha avanzado, entendiéndose como si de un órgano se tratara, donde para profundizar en su conocimiento hay que estudiar tanto los múltiples tipos celulares especializados encontrados, como el microambiente tumoral que se genera durante la iniciación y progresión tumoral¹²⁴.



Figura I4. Hallmarks o sellos distintivos del cáncer. Ilustración que conglomera las características distintivas propuestas para las células cancerosas, representando un principio de organización para racionalizar la diversidad y complejidad del común de enfermedades neoplásicas. Adaptado de ¹²³.

En este nuevo contexto del microambiente tumoral y en los mecanismos de adaptación al mismo, la hipoxia está tomando especial relevancia en esta área, destacando como uno de los factores fundamentales en la regulación del microambiente tumoral e interviniendo en procesos clave como la progresión y metástasis del tumor¹²⁵. Estudios recientes donde se han caracterizado los niveles de hipoxia de 19 tipos tumorales, incluyendo más de 8000 tumores diferentes, han establecido una relación consistente entre niveles bajos de oxígeno y elevada inestabilidad genómica, pérdida alélica de genes supresores de tumores y acortamiento de telómeros¹²⁶.

4. Hipoxia y los factores inducibles por hipoxia (HIF)

El oxígeno es esencial para la mayoría de los organismos, desde *protozoa* a mamíferos pero, a su vez, esta molécula puede ser altamente tóxica y letal. Por este motivo las células de mamíferos, incluyendo las células cancerosas, tienen mecanismos de respuesta adaptativa que aseguren un suministro adecuado de oxígeno y que permitan mantener una fuente de energía eficiente para realizar sus funciones fisiológicas. Sin embargo, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, se pueden desencadenar eventos que conduzcan a la muerte celular debido a un déficit energético. Para evitar estos eventos, las células disponen de mecanismos que les permiten adaptarse a fluctuaciones en los niveles de oxígeno como, por ejemplo, reducir el consumo energético e incrementar el metabolismo anaerobio¹²⁷.

4.1. Respuestas adaptativas a cambios en los niveles de oxígeno

La hipoxia se define como la reducción de la presión parcial de oxígeno (pO_2) normal producida por múltiples causas que conduce a una disminución en la disponibilidad de oxígeno¹²⁸. En mamíferos, los niveles de pO_2 oscilan desde los 150 mmHg en las vías respiratorias superiores (21% O_2) hasta unos 5 mmHg (1% O_2) en la retina¹²⁹. Los niveles de oxígeno que determinan si un tejido es hipóxico difieren entre órganos pero, en términos generales, se conoce que se desencadena una respuesta a hipoxia cuando hay niveles por debajo de 40 mmHg (6% O_2)¹³⁰. Considerando que se trata de eventos sensibles, no sorprende que un desequilibrio en los niveles de disponibilidad o en los factores que lo controlan provoquen situaciones patológicas donde la hipoxia ejerza un papel fundamental en el desarrollo de la patología.

Profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de la homeostasis del oxígeno y determinar las situaciones en las que esta homeostasis se pierde generando daño celular, es uno de los retos más apasionantes de la investigación biomédica moderna¹³¹. En mamíferos, existe una respuesta sistémica a hipoxia aguda, que promueve reflejos como la

hiperventilación o la activación simpática para incrementar y redistribuir el O₂ a todos los tejidos del organismo en pocos segundos. El O₂ global del organismo es detectado por unas células quimiorreceptoras especializadas localizadas en el cuerpo carotídeo y neuroepitelial¹³².

Cuando la hipoxia es mantenida durante largos periodos, horas o días, se activan diferentes mecanismos adaptativos de respuesta que implican multitud de cambios en la expresión génica de múltiples genes. En general, se han descrito dos mecanismos de adaptación frente a hipoxia: la reducción del consumo de oxígeno favoreciendo un tipo de metabolismo anaerobio, lo que disminuye el uso de energía y, por otro lado, el incremento de la disponibilidad de oxígeno de las células, estimulando la eritropoyesis y la formación de vasos sanguíneos¹³³. Además, hay eventos determinados que producen una reducción localizada de los niveles de O₂ en situaciones no patológicas como, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, en situaciones de crecimiento de tumores sólidos o en otros escenarios patológicos como la isquemia cerebral o el infarto de miocardio, donde se modulan diferentes genes relacionados con la angiogénesis y la vasculogénesis.

Los primeros avances en esta materia fueron descritos en los años 90 en un estudio donde se determinó que la regulación de la expresión génica de la eritropoyetina (EPO) depende de la hipoxia y que dicha respuesta es mediada por los denominados factores de transcripción inducibles por hipoxia: factores HIF (de sus siglas en inglés, *Hypoxia Inducible Factors*)¹³⁴. Más tarde, se describieron diferentes familias de proteínas sensibles a O₂ como las prolin- o asparaginilhidroxilasas (conocidas por sus siglas en inglés, PHDs/FIH) que eran las responsables de regular la estabilización y de modular la actividad transcripcional de los factores HIF¹³⁵. Debemos destacar que los investigadores que hicieron estos descubrimientos han sido galardonados con el premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 2019 (revisado en ¹³⁶).

4.2. Familia HIF y sus dominios estructurales

En el mantenimiento de la homeostasis de los niveles de O₂ en un organismo intervienen diferentes mecanismos moleculares de respuesta. Aunque los factores HIF son los efectores en el complejo mecanismo de respuesta a hipoxia, existen otros componentes que intervienen en la ruta de respuesta a hipoxia y son igualmente destacables.

Los factores de transcripción HIF tienen una estructura heterodimérica, constituida por las subunidades α y la subunidad β (también conocida como ARNT, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)¹³⁴. Ambas subunidades contienen dominios bHLH (*basic hélix-loop-helix*) y dos PAS (PAS-A y PAS-B, acrónimo de los primeros tres miembros descritos Per, ARNT y Sim), que son dominios conservados y están implicados en procesos de heterodimerización y juegan un papel fundamental en la unión a ADN^{134,137}.

Además, las subunidades α presentan dos dominios de transactivación (TADs) denominados CAD y NAD, según su localización (extremo C- o N-terminal, respectivamente). Entre estos dominios, se localiza el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) que controla la estabilidad de la proteína (Fig. I5).

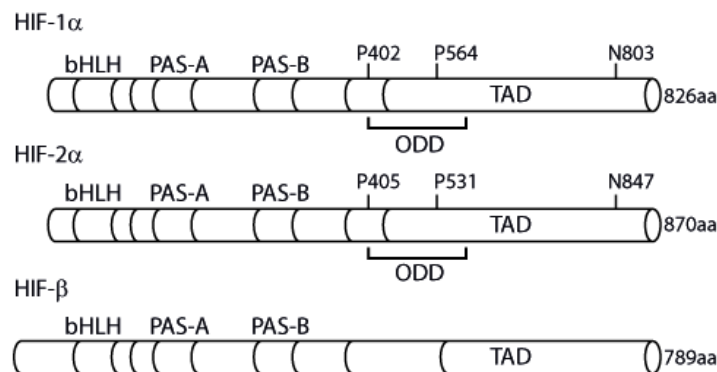


Figura I5. Estructura de las subunidades de los factores inducibles por hipoxia. Esquema simplificado de las regiones estructurales que componen los factores de transcripción HIF-1 α , HIF-2 α y HIF- β . P402/405, P564/531 y N803/847 son residuos de prolina hidroxilables altamente conservados que tienen una gran relevancia en el reconocimiento de la proteína por el complejo ubiquitín ligasa producto del gen *Vhl*. Adaptado de ¹³⁰.

Las subunidades α de los factores HIF (HIF- α) son únicas y son consideradas sensibles a oxígeno, puesto que son sustrato de una familia de prolil- y asparaginil-hidroxilasas que utilizan O_2 y otras moléculas, como Fe^{2+} y 2-oxoglutarato, para catalizar la hidroxilación de ciertos residuos de las subunidades HIF- α . Además, la subunidad HIF- β , que es común y estable, se encuentra expresada constitutivamente y es insensible a cambios en los niveles de O_2 . Tres genes diferentes, *HIF1A1*, *EPAS1* (en adelante *HIF2A*) y *HIF3A*, codifican para tres subunidades α diferentes¹³⁷: HIF-1 α , HIF-2 α (también denominado EPAS-1) y HIF-3 α , respectivamente. Aunque estructuralmente poseen los mismos dominios, se expresan de manera diferente en el organismo. *HIF1A1* se expresa de manera más o menos ubicua, mientras que *HIF2A* y *HIF3A* se restringen a tejidos más específicos. *HIF2A* se expresa mayoritariamente en el sistema vascular durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, en pulmones, en tejido intersticial renal, en el parénquima del hígado y en células de la cresta neural¹³⁸⁻¹⁴⁰. Por otra parte, *HIF3A* se expresa en timo, en riñón, en las células de Purkinje y en regiones específicas de la córnea¹⁴¹.

4.2.1. Ruta de señalización de los factores HIF

Los genes responsables de codificar para las subunidades α de los factores HIF son transcripcionalmente muy activos y sus niveles de expresión no se ven afectados por la disponibilidad de oxígeno. Sin embargo, la estabilización y actividad de las subunidades α sí están reguladas por el nivel de oxígeno disponible.

En condiciones de normoxia, HIF- α es rápidamente degradada debido a la hidroxilación de dos residuos de prolina específicos, P402 y P564, que se localizan en el dominio ODD de las subunidades α (Fig. I5), por parte de tres prolil-hidroxilasas específicas de la familia HIF: PHD1, PHD2, PHD3^{142,143}. La subunidad HIF- α , hidroxilada en dichos residuos, es inmediatamente reconocida por la proteína VHL (pVHL), componente de reconocimiento del complejo E3 ubiquitín ligasa, responsable de marcar covalentemente con

poliubiquitinasas para posteriormente ser degradada vía proteasoma^{144,145}. Esta degradación ocurre tanto en el núcleo como en el citoplasma¹⁴⁶. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, las hidroxilaciones de las prolinas del dominio ODD de las subunidades HIF- α por parte de las PHD no se llevan a cabo, puesto que esta permanece inactiva ante la falta de su cosustrato, el oxígeno. Esto inhibe el reconocimiento y la poliubiquitinación por parte de pVHL, evitando así la consecuente degradación. En estas condiciones de hipoxia, las subunidades HIF- α se acumulan en el citoplasma de la célula y se translocan al núcleo, donde dimerizan con la subunidad β o ARNT, a través de su dominio PAS. En el núcleo, el heterodímero HIF-1 α/β se une a los elementos de respuesta a HIF (HRE) que están localizados dentro de promotores, intrones y otras dianas de genes regulados por O₂¹⁴⁷ (Fig. I6).

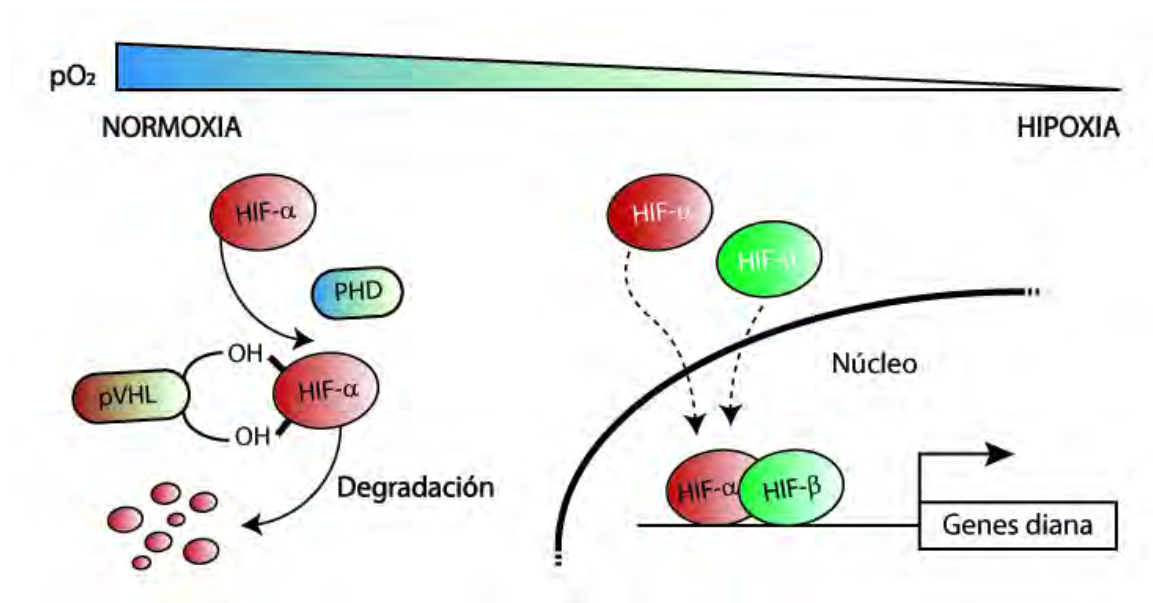


Figura I6. Esquema de la ruta de señalización de los factores HIF. Representación simplificada de la vía de señalización de los factores HIF y el efecto de la presión parcial de O₂ sobre su actividad. Adaptado de ¹⁴⁸.

Cabe destacar que las subunidades HIF- α pueden ser estabilizadas también en condiciones de normoxia mediado por la activación de oncogenes clásicos como *RAS* o *SRC*, la mutación de supresores de tumores como *PTEN* o la pérdida o inactivación del supresor de tumores *VHL*.

4.2.2. Isoformas de la familia HIF: HIF-2 α

La primera isoforma identificada fue HIF-1 α . Fue aislada por Semenza y colaboradores mediante purificación por afinidad usando oligonucleótidos a partir del locus EPO en 1995¹⁴⁹. La identificación de HIF-2 α data de 1997, cuando varios grupos independientes llegaron a la conclusión de que la regulación a través de la vía HIF era bastante más compleja y estaba compuesta por más componentes¹⁵⁰. La mayoría de los efectos relacionados al crecimiento y progresión tumoral descritos hasta la fecha han sido asociados a la acción de HIF-1 α o HIF-2 α , pero hay que destacar que también se ha descrito una tercera subunidad, HIF-3 α ¹⁴¹. El gen *HIF3A* codifica para múltiples variantes de la subunidad HIF-3 α debido a la utilización de diferentes promotores, sitios de iniciación de la transcripción o mecanismos de *splicing* alternativo¹⁵¹. Recientes estudios han otorgado a HIF-3 α funciones como activador transcripcional dependiente de oxígeno y se han podido describir múltiples dianas génicas, mostrando cada variante características diferentes e incluso opuestas. Mientras algunas variantes de HIF-3 α pueden inhibir a los reguladores de las subunidades HIF-1 α /2 α , otras variantes pueden inhibir la acción de HIF-1 α y HIF-2 α compitiendo por la subunidad común, HIF- β ¹⁵¹. De igual manera, se ha descrito una segunda subunidad β , ARNT2, implicada en el desarrollo neuronal¹⁵² y que también presenta funciones homólogas a ARNT¹⁵³.

A diferencia de HIF-1 α , la expresión de HIF-2 α está limitada a vertebrados¹⁵⁴ y su expresión está restringida a diferentes tejidos, siendo particularmente elevada su expresión en vasos sanguíneos. Es por este motivo que siempre se ha asociado a HIF-2 α un papel fundamental en la modulación funcional de las células endoteliales. Aun así, tanto HIF-1 α como HIF-2 α , se

coexpresan en múltiples tipos celulares como células del riñón y pulmón, así como en hepatocitos, macrófagos, astrocitos o células musculares¹⁴⁰. HIF-2 α comparte alrededor de un 48% de homología con HIF-1 α , sin embargo las regiones de unión al ADN están altamente conservadas¹³⁹. Por estos motivos, es importante profundizar en el análisis de los genes de dianas de cada subunidad α para entender así sus funciones individuales.

4.2.3. Genes diana de los factores HIF

Existen más de 1000 genes que se encuentran directamente regulados por los factores HIF en condiciones de hipoxia¹⁵⁵. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de los genes diana de HIF son activados para producir una respuesta celular específica ante situaciones de baja concentración de O₂ y depende del tipo celular. Los genes dianas de HIF se pueden agrupar en dos grandes categorías según su función: los responsables de incrementar la disponibilidad de O₂ y aquellos implicados en la disminución del consumo del mismo.

En la primera categoría podemos encontrar proteínas como EPO¹⁵⁶, encargada de aumentar la concentración de O₂ sanguíneo mejorando la oxigenación sistémica, y VEGF¹⁵⁷, responsable de producir modificaciones en la permeabilidad vascular, promover eventos angiogénicos e incrementar la oxigenación local de los tejidos. En la segunda categoría indicada podemos señalar diferentes enzimas glucolíticas, como la lactato deshidrogenasa A y la piruvato deshidrogenasa quinasa 1, implicadas en la adaptación a un metabolismo glucolítico¹⁵⁸. Los factores HIF, además de modificar rutas biológicas implicadas en el metabolismo del oxígeno, tienen dianas directas en rutas implicadas en otros procesos como la autofagia, apoptosis, homeostasis redox, inflamación e inmunidad, diferenciación de células madre y autorenovación, metástasis e invasión¹⁵⁹.

Un alto número de genes relacionados con la progresión cancerosa pueden ser afectados por desregulaciones de los factores HIF. Se han descrito múltiples asociaciones entre la sobreexpresión de HIF y una evolución desfavorable de los pacientes con diferentes neoplasias oncológica como el

cáncer de mama, de colon o de pulmón¹⁶⁰. También se ha demostrado que mutaciones en diversos oncogenes como *TP53*, *RB1*, *BCL2*, *MYC*, *ARF* y *RAS*, producen estabilizaciones de los factores HIF¹⁶¹ (Fig. I7). Es por ello de gran interés desgranar el papel de los factores HIF en la progresión tumoral y definir su implicación específica según el tipo de patología neoplásica.

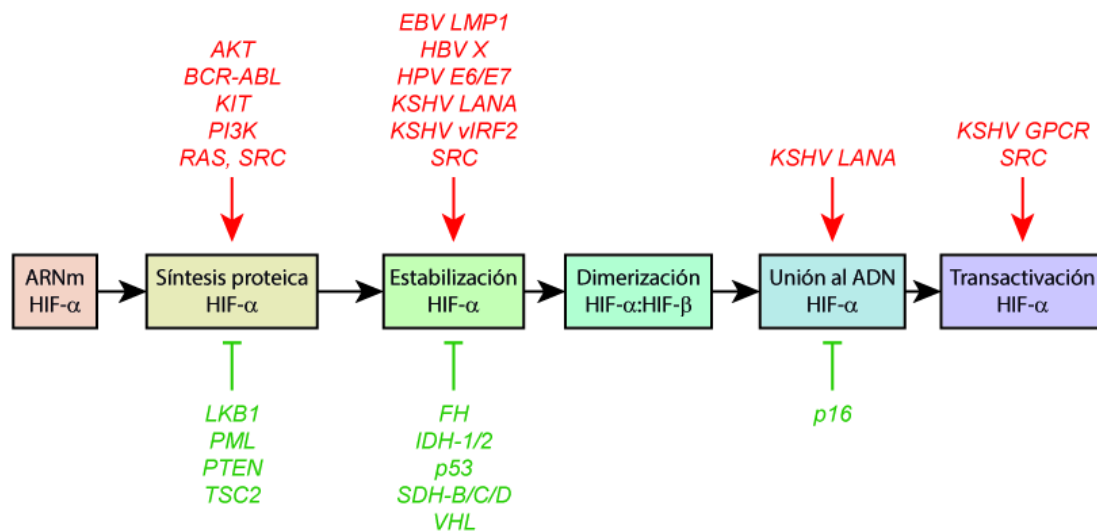


Figura I7. Regulación de la actividad de las subunidades HIF- α por oncogenes y genes supresores de tumores. La actividad de HIF- α es estimulada por la ganancia de función de diversos oncogenes (en rojo) y por la pérdida de función de diversos genes supresores de tumores (en verde). Adaptado de ¹⁵⁹.

4.2.4. Síndrome de von Hippel-Lindau

Las mutaciones que afectan a la funcionalidad de pVHL, provocan la estabilización de HIF- α , incluso en condiciones de normoxia. VHL contiene un único sitio de unión conservado para hidroxiprolina de HIF- α , reconociendo indistintamente la P402 y la P564, lo que constituye una redundancia funcional en el dominio ODD¹⁶². Se ha demostrado que HIF- α se estabiliza parcialmente cuando existe una mutación puntual en alguna de las dos prolinas implicadas, mientras que, cuando existen mutaciones en ambas prolinas, la estabilización de HIF- α aumenta drásticamente¹⁶³.

Aunque la degradación de HIF- α vía VHL ha sido la más estudiada y es la más representativa, se han descrito otras vías de degradación de HIF- α . Por ejemplo, existen evidencias que demuestran que p53 también está involucrado en la degradación de HIF-1 α , promoviendo su ubiquitinación a través de otro complejo E3 ubiquitín ligasa, MDM2¹⁶⁴.

Gran parte del conocimiento genético que existe acerca de los efectos que se producen al alterar la regulación de los factores HIF proviene de la observación de la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL). Clínicamente, la enfermedad de VHL es un síndrome autosómico dominante producida por una mutación en línea germinal en el gen supresor de tumores *VHL*^{165,166}. Dichas mutaciones en la línea germinal promueven el desarrollo de multitud de tumores, tanto benignos como malignos y quistes en distintos órganos. Los pacientes afectados pueden desarrollar lesiones altamente vascularizadas en el sistema nervioso central denominadas hemangiomas, en regiones como el cerebelo o espina dorsal, así como tumores en la retina y en el saco endolinfático¹⁶⁷. Este síndrome también se caracteriza por la presencia de afectaciones en órganos sólidos como quistes y carcinomas renales, feocromocitomas, quistes pancreáticos y tumores neuroendocrinos (Tabla I2).

Tabla I2: Frecuencia de las lesiones y la edad de debut de pacientes con Síndrome de VHL

	Edad al diagnóstico (media; rango)	Frecuencia en pacientes (%)
SNC		
Hemangioblastoma retiniano	25 (1-67)	25-60%
Tumores en saco endolinfático	22 (12-50)	10%
Hemangioblastoma craneoespinal		
Cerebelo	33 (9-78)	44-72%
Tronco encefálico	32 (12-46)	10-25%
Espina dorsal	33 (12-66)	13-50%
Raíces nerviosas lumbosacras	Desconocido	<1%
Supratentorial	Desconocido	<1%
Órganos sólidos viscerales		
Quiste o carcinoma en células renales	39 (16-67)	25-60%
Feocromocitomas	30 (5-58)	10-20%
Quistes o tumores pancreáticos	36 (5-70)	35-70%
Cistoadenoma de epidídimo	Desconocido	25-60%
Cistoadenoma del ligamento ancho	Desconocido	Desconocido

La principal causa de muerte de esta patología son complicaciones derivadas de los carcinomas de células renales y de los hemangioblastomas en el sistema nervioso central^{168,169}. La enfermedad de VHL se clasifica en 4 subtipos diferentes, tipo I, IIA, IIB y IIC, según el órgano afectado y el tipo de mutación que afecte al gen *VHL*¹⁷⁰. Las familias con VHL tipo I muestran muy baja predisposición al desarrollo de feocromocitomas pero, sin embargo, desarrollan otros tipos tumorales asociados a la enfermedad. Los pacientes con VHL que presentan feocromocitomas y, además, presentan bajo riesgo de padecer carcinomas de células renales son considerados del tipo IIA, mientras que si muestran alto riesgo de desarrollar dichos carcinomas renales son tipo IIB. Por último, los pacientes con feocromocitomas y sin ninguna otra lesión neoplásica, son considerados VHL tipo IIC (Tabla I3).

Tabla I3: Asociación genotipo-fenotipo en pacientes VHL

Subtipo Enfermedad VHL	Genotipo	Fenotipo
I	Deleción en zona exónica del gen VHL o gen VHL truncado	Incremento del riesgo de cualquier tipo tumoral; bajo riesgo de feocromocitomas
IIA	Mutación sin sentido en el codón 98 (exón 1) del gen VHL	Alto riesgo de feocromocitomas y hemangioblastomas en SNC y en retina.
IIB	Mutación sin sentido en zona exónica del gen VHL	IIA + RCC, PanNET y quistes pancreáticos
IIC	Mutación sin sentido en el codón 168 (exón 3) del gen VHL	Incremento de susceptibilidad a feocromocitomas exclusivamente

SNC, sistema nervioso central; PanNET, tumor neuroendocrino pancreático; RCC, carcinoma de células renales; VHL, von Hippel-Lindau.

Mediante el estudio de esta patología se han podido establecer varios vínculos entre la alteración de los mecanismos de degradación de los factores HIF, en este caso la disfuncionalidad de la proteína VHL, y su contribución a la iniciación y a la progresión tumoral a través de diferentes mecanismos.

Uno de estos mecanismos es el aumento de la angiogénesis. En este caso, la activación de los factores HIF provocada por una disfuncionalidad completa o parcial de la proteína VHL, produce un incremento en los niveles de expresión de factores como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) o PDGF (*platelet-derived growth factor*) que estimulan la proliferación de las células endoteliales y los pericitos, respectivamente¹⁷¹. Esta activación de la angiogénesis a través de la estabilización de HIF permite explicar la naturaleza altamente vascularizada de los tumores en el síndrome VHL, especialmente cuando se trata de hemangioblastomas y carcinomas de células renales¹⁷². Además, el aumento de la expresión de VEGF puede provocar el incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que puede conllevar la aparición de los quistes y de edemas peritumorales tan característicos en esta enfermedad.

Existen también mecanismos tumorigénicos en este síndrome asociados a defectos en la proteína VHL, pero independientes a la función de HIF. Así, las células sin la proteína VHL muestran defectos en la capacidad de salir del ciclo

celular¹⁷³. Mutaciones específicas en el gen que codifican para la proteína VHL incrementan los niveles de expresión de VEGF mediante unas desregulaciones transcripcionales y postranscripcionales¹⁷⁴. Estas modificaciones aumentan los efectos mediados por HIF. Las células sin proteína VHL muestran defectos en el ensamblaje de la matriz extracelular de fibronectina favoreciendo los eventos carcinogénicos¹⁷⁵.

4.3. Modelos animales de modulación de la ruta HIF

Durante décadas se han realizado muchos esfuerzos en generar modelos animales donde se modifique la ruta de respuesta a hipoxia con el fin de desentrañar su función en un contexto biológico. Las primeras aproximaciones se centraron en la generación de modelos *knockout* de delección de las subunidades HIF-1 α y HIF-2 α . Ambos modelos mostraban letalidad embrionaria por diferentes causas. Los embriones HIF-1 α ^{-/-} mueren alrededor de E11 debido a defectos cardiacos y vasculares¹⁷⁶. Por otro lado, los embriones HIF-2 α ^{-/-} no sobreviven más allá de E16 debido a defectos vasculares, bradicardia y a una incompleta maduración pulmonar¹⁷⁷.

Además, se han generado modelos animales para estudiar el papel de diferentes genes que están implicados en la modulación de la ruta HIF y el efecto de la sobreactivación de HIF mediante la escisión de genes responsables de su estabilización y degradación, como los genes *VHL* o la familia de genes *PHD*. Así, se generó una línea de ratón que contiene un alelo inactivado de *VHL* (*VHL*^{+/-}). Mientras que estos ratones heterocigotos no desarrollaban defectos aparentes, los ratones homocigotos (*VHL*^{-/-}) mostraban letalidad embrionaria entre E10.5 y E12.5 tras desarrollar defectos en la vasculogénesis placentaria¹⁷⁸. De igual manera, se han desarrollado modelos animales donde se han delecionado los genes *PHD* que codifica para las proteínas PHD1-3¹⁷⁹, implicadas en la regulación de la estabilidad de la subunidad HIF- α . Mientras que los ratones PHD1^{-/-} y PHD3^{-/-} completan un desarrollo aparentemente normal, los ratones PHD2^{-/-} muestran defectos placentarios y en el tejido cardíaco, cuya consecuencia es una letalidad embrionaria entre E12.5 y E14.5.

Aunque estos experimentos demostraron que tanto los factores HIF como los genes implicados en su regulación y estabilización eran fundamentales para la supervivencia de las células embrionarias y el correcto desarrollo vascular de los embriones, también quedaron en evidencia las profundas limitaciones que presentaban los modelos de inactivación sistémica en los genes de la ruta HIF, puesto que la letalidad demostrada no permitía el estudio de la ruta más allá de las primeras fases del desarrollo embrionario. El uso de líneas de ratones diseñadas con la tecnología *Cre-loxP* permitió modificar de forma específica un gen de interés en tipos celulares específicos, evitando los múltiples problemas de letalidad asociados a los modelos *knockout* convencionales. Así, por ejemplo, se han generado líneas de ratones con transgenes que expresan variantes de HIF-1 α y HIF-2 α que escapan al reconocimiento por parte de pVHL¹⁸⁰.

Para generar esta escisión de manera específica, el gen que codifica para la proteína recombinasa *Cre* se expresa bajo la regulación de promotores específicos. Por ejemplo, la inactivación de VHL en modelos de animales donde se expresaba la *Cre* recombinasa bajo los promotores de la albumina y β -actina provocaba la aparición de tumores vascularizados hepáticos¹⁸¹. En el mismo sentido, otros modelos transgénicos con la tecnología *Cre-loxP* demostraron que una sobreactivación directa simultánea de HIF-1 α y HIF-2 α en hepatocitos era suficiente para inducir los mismos cambios histológicos observados en los modelos de inactivación de VHL en el hígado¹⁸⁰. Por otra parte, los ratones con inactivación específica de VHL en células epiteliales renales desarrollan quistes tubulares muy similares morfológica y molecularmente a las lesiones descritas en pacientes VHL¹⁸².

Por todas estas razones, los modelos de animales transgénicos con escisión específica de los factores implicados en la modulación de la ruta HIF en diferentes tejidos han demostrado ser de gran utilidad para profundizar en el conocimiento de las patologías humanas relacionadas y destacan como una herramienta con un gran potencial para aumentar el conocimiento en su fisiopatología.

5. Factores HIF y su relación con el páncreas

5.1. Factores HIF durante el desarrollo pancreático

La hipoxia juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario en condiciones fisiológicas. Está implicada en multitud de eventos embrionarios como la placentación, la angiogénesis o la hematopoyesis¹⁸³. Durante la etapa intrauterina, los embriones tienen que soportar condiciones de pO_2 reducidas en comparación a las condiciones de pO_2 tras el nacimiento¹⁸⁴, variando del 2% al 9% en tejidos como el timo, la médula del riñón, la médula ósea e incluso menores, del 1% (7.2 mmHg), en tejidos como el páncreas¹⁸⁵. Se han descritos diferentes estrategias de adaptación a estas condiciones de baja disponibilidad de O_2 para garantizar una adecuada disponibilidad de O_2 en un microambiente hipóxico como el existente durante el desarrollo. Algunas de estas adaptaciones son el aumento de la frecuencia cardiaca, el aumento de la concentración de hemoglobina o el aumento de la superficie de intercambio gaseoso de la placenta¹⁸⁶. De hecho, se ha descrito que la hipoxia disminuye la diferenciación de distintos tipos celulares como son los adipocitos, las células precursoras neurales o las células endoteliales.

Definir las funciones específicas de los factores HIF en el desarrollo del páncreas embrionario ha sido tradicionalmente un campo difícil de abordar debido, principalmente, a las limitaciones que mostraban los mutantes y su letalidad asociada, como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, experimentos *in vitro* han demostrado que existe una relación entre la disponibilidad de O_2 y la diferenciación pancreática empleando para ello cultivos de rudimentos pancreáticos en diferentes condiciones de disponibilidad de O_2 . Así se demostró que, al aumentar la concentración de O_2 , se incrementa la expresión de marcadores específicos de células β endocrinas diferenciadas, mientras que los marcadores específicos de diferenciación acinar no se ven alterados¹⁸⁷. También, se demostró *in vivo* que el páncreas es un tejido hipóxico en etapas tempranas del desarrollo (E11.5-E12.5), puesto que se detectan niveles altos de HIF-1 α en el epitelio pancreático indiferenciado y en el tejido mesenquimal de rata. Aunque, al disminuir la pO_2 y reprimirse la

diferenciación de las células β , los niveles de expresión de la subunidad HIF-1 α aumentan, los niveles de expresión de HIF-2 α en estas condiciones no se alteran¹⁸⁷. Aunque esos experimentos indican que los factores HIF juegan un papel relevante en la formación del páncreas, no fue hasta el uso de ratones basados en la tecnología *Cre-loxP* que se pudo profundizar en el conocimiento de las funciones que llevan a cabo los factores HIF en el páncreas.

Estudios de expresión en ratones han revelado que la subunidad HIF-2 α se expresa en células precursoras pancreáticas. Al no disponer de anticuerpos comerciales fiables, se ha utilizado una línea de ratón *knockout* con un *reporter*. Para ello, el intrón 2 de *HIF2A* es sustituido por el gen *LacZ*. De esta manera, la expresión del gen *LacZ* queda bajo el control de los elementos regulatorios del gen *HIF2A* endógeno. Esto permite confirmar que *HIF2A* se expresa en las células precursoras pancreáticas entre E10.5-14.5 del desarrollo embrionario, colocalizando con el factor de transcripción Pdx1. Tras E15.5, las células precursoras endocrinas diferenciadas no muestran un nivel de expresión detectable de *HIF2A* hasta justo antes del nacimiento¹⁸⁸. En este mismo estudio examinaron el páncreas de ratones deficientes en *HIF2A*. Aunque estos ratones muestran letalidad embrionaria sobre E12.5, se pudo observar que la ausencia de HIF2A durante el desarrollo embrionario pancreático provoca una disminución de la ramificación pancreática y afecta a la diferenciación temprana del tejido endocrino embrionario¹⁸⁸.

5.2. Factores HIF y su papel en patologías endocrinas

Los islotes pancreáticos están expuestos a una baja tensión relativa de O₂ (20-37 mmHg)¹⁸⁹ y, como hemos mencionado anteriormente, son estructuras sensibles a la secreción de insulina local. Se ha descrito que en pacientes con DT2, los niveles de expresión de HIF-1 α se encuentran reducidos un 90% en islotes pancreáticos en comparación con pacientes sanos¹⁹⁰. Además, en modelos de ratones diabéticos no obesos, se ha determinado que la pérdida de HIF-1 α en las células β incrementa la sensibilidad de la célula β a eventos apoptóticos y, por lo tanto, aumenta el riesgo de desarrollar una DT1¹⁹¹. Esto

sugiere que podría existir un nexo de unión entre los mecanismos relacionados con ambos eventos biológicos: la hipoxia y la homeostasis de la glucosa.

Para determinar el efecto de la activación de los factores HIF en el desarrollo de los diferentes subtipos de células endocrinas y en la homeostasis de la glucosa, se han realizado diferentes estrategias experimentales. Una de ellas consiste en el uso de inhibidores de la subunidad HIF-1 α en condiciones de hipoxia *in vitro*. De este modo, se demostró que usando inhibidores de la actividad transcripcional de HIF-1 α en condiciones de hipoxia se disminuye la expresión de los genes dianas de HIF-1 α , a la vez que se observa una caída drástica de la expresión de Ngn3, marcador de progenitor de célula endocrina. Además, se demostró que HIF-1 α altera la diferenciación del tejido endocrino *in vitro*¹⁹². Estos mecanismos se encuentran conservados en diferentes especies de roedores y en humanos.

Para profundizar en esta hipótesis, algunos autores han desarrollado modelos murinos de delección de uno de los principales genes reguladores de HIF, el gen *VHL*, específicamente en el páncreas, provocando la activación indirecta de los factores HIF. En estos ratones se utiliza el sistema *Cre-loxP* descrito anteriormente, donde se provoca la recombinación de las regiones *loxP* situadas en el gen *Vhlh* (nombre del gen homólogo en ratones) gracias a la inyección directa en el epitelio pancreático de un adenovirus que porta la *Cre* recombinasa. Estos ratones transgénicos no presentan alteraciones en el desarrollo del tejido acinar, sin embargo, presentan una estabilización relevante de HIF-1 α y defectos en la diferenciación de las células β endocrinas¹⁹².

La inactivación del gen *Vhlh*, directa y específicamente, en diferentes poblaciones de células endocrinas, utilizando el sistema *Cre-loxP* bajo los promotores del gen del glucagón (células α) o insulina (células β), permite determinar que la pérdida de *Vhlh* (con la consiguiente activación de los factores HIFs) altera de manera significativa la función endocrina del páncreas. Mientras que la pérdida de *Vhlh* en las células α no provoca ninguna alteración histológica o fisiológica del compartimento endocrino del páncreas¹⁹³, la delección de *VHL* en células β provoca defectos en la homeostasis de la glucosa aunque no altera su masa, su tasa de proliferación celular ni su supervivencia¹⁹⁴.

Este modelo, que utiliza el promotor de la insulina de rata (ratón *RIPCre*), tiene algunas limitaciones como la de mostrar una pequeña expresión ectópica de la *Cre* recombinasa en el hipotálamo¹⁹⁵. Por ello, se utilizaron diferentes ratones *Cre* que utilizan el factor de transcripción *Pdx1* como promotor, determinando la activación de los factores HIF en las células precursoras pancreáticas en su totalidad. Curiosamente, se ha descrito una hipoglucemia muy severa en los ratones *Pdx1-Cre;Vhl^{loxP/loxP}*, lo que desemboca en una tasa de letalidad posnatal muy elevada¹⁹⁶. Los ratones que sobreviven muestran una acumulación de HIF-1 α robusta en todos los compartimentos pancreáticos, presentando niveles elevados de genes diana de HIF-1 α , mientras que la expresión de HIF-2 α se limita a ciertas zonas del tejido exocrino¹⁹⁶. La letalidad asociada a los eventos hipoglucémicos causada por la delección de *Vhlh* en células endocrinas, se recapitula mediante la utilización de otro modelo *Cre-loxP*, en este caso, bajo la regulación del factor de transcripción específico de progenitores endocrinos *Ngn3*¹⁹⁶. Aunque aproximadamente entre el 12 y el 17% de los pacientes VHL desarrollan tumores neuroendocrinos, en algunos casos con características de malignidad elevada¹⁹⁷, la delección de *Vhlh* en modelos murinos, en las células endocrinas diferenciadas, tanto α como β , no desemboca en ningún evento tumorogénico y no se detectan lesiones cancerosas en ratones¹⁹³.

Por otra parte, se han generado modelos animales condicionales con una activación directa de los factores HIF, es decir, sin alterar ninguno de los genes reguladores o responsables de su estabilización, como *Vhlh*. En estos casos, se han generado *in vivo* diferentes modelos condicionales de ratones, que tras cruzarse con ratones que poseen una *Cre* recombinasa, producen una sobreactivación de variantes de HIF-1 α y HIF-2 α que escapan al reconocimiento por parte de pVHL y su posterior degradación vía proteasoma¹⁸⁰. Aunque estos modelos de sobreactivación de variantes no degradables de las subunidades α de HIF se han utilizado con diferentes *Cre* recombinasas específicas de tejido, por ejemplo, en el estudio de las lesiones vasculares encontradas en el riñón o de las alteraciones cutáneas de pacientes VHL. Sin embargo, no han sido utilizadas para el estudio de las lesiones pancreáticas típicas de esta patología.

5.3. Factores HIF en patologías exocrinas

Como hemos comentado anteriormente, los pacientes con enfermedad de VHL pueden presentar afecciones en múltiples órganos. Es destacable que más del 75% de los pacientes VHL presentan lesiones en el páncreas. El 8-17% de los pacientes pueden presentar tumores neuroendocrinos pancreáticos (PanNET) originados, histológicamente, a partir de los islotes pancreáticos. Clínicamente, suelen ser no funcionales, con inmunohistoquímica positiva para múltiples hormonas pancreáticas y asintomáticos, puesto que no sufren los efectos de la hipersecreción hormonal¹⁹⁸. Sin embargo, las principales manifestaciones en el páncreas son los quistes serosos benignos (BC, de sus siglas en inglés) y los adenomas microquísticos serosos (MCA, de sus siglas en inglés), las cuales se presentan entre el 35 y el 75% de los pacientes VHL^{199,200}. Histológicamente, las lesiones MCA contienen gran cantidad de estroma y presentan tejido fibrótico alrededor que puede, en algunos casos, rodear algunos islotes adyacentes. Estructuralmente, estas lesiones están constituidas por una capa de células epiteliales serosas, cuboidales o aplanadas, que presentan un citoplasma anfófilo y un núcleo sin atipia, mitosis o necrosis. Esta capa de células epiteliales está rodeada e intercalada por una capa de células de naturaleza endotelial que forman estructuras capilares. Las células epiteliales son positivas para marcadores como citoqueratinas AE1/AE3 y MAK 6, además de poseer un citoplasma rico en glucógeno detectado con la tinción PAS. Por otro lado, las células endoteliales son positivas para el marcador CD31²⁰¹. Cabe destacar la presencia de un tercer subtipo celular en las lesiones MCA, células del músculo liso, las cuales son inmunohistológicamente positivas para vimentina y SMA (*Smooth Muscle Actin*) (Fig. I8).

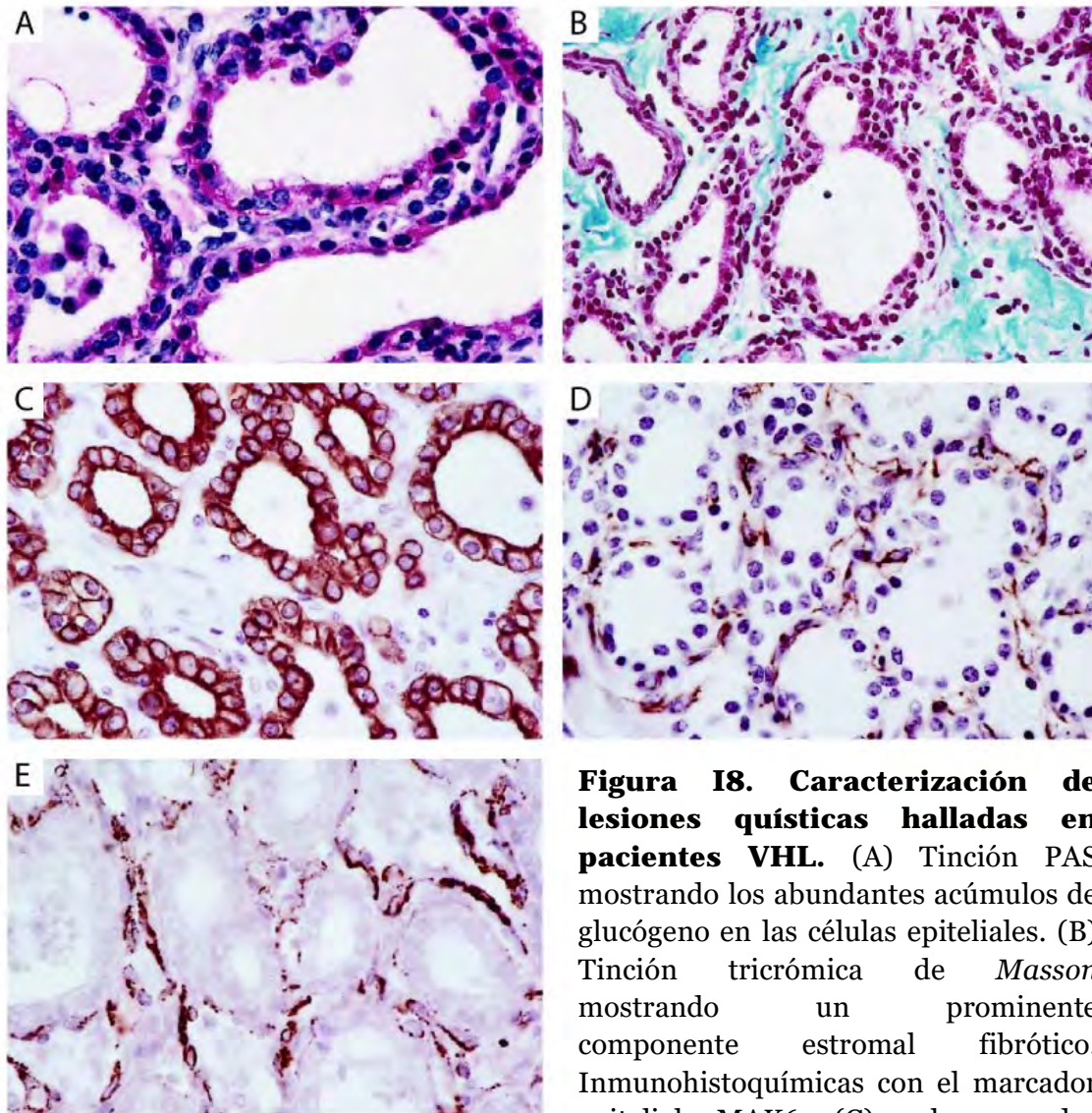


Figura 18. Caracterización de lesiones quísticas halladas en pacientes VHL. (A) Tinción PAS mostrando los abundantes acúmulos de glucógeno en las células epiteliales. (B) Tinción tricrómica de *Masson* mostrando un prominente componente estromal fibrótico. Inmunohistoquímicas con el marcador epitelial MA6 (C), el marcador endotelial CD31 (D) y el marcador específico de célula de músculo liso SMA (E). Adaptado de ²⁰¹.

Como se ha mencionado anteriormente, para estudiar el efecto de la activación de los factores HIF en el páncreas, se han utilizado modelos de ratones donde se inactiva *Vhlh* en los progenitores pancreáticos utilizando el promotor de *PDX1* (*Pdx1-Cre; Vhlh^{loxP/loxP}*), que se expresa durante el desarrollo embrionario tanto en células endocrinas como exocrinas. Estos ratones, además de los defectos en la homeostasis de la glucosa descritos en el apartado anterior, muestran una alta mortalidad postnatal, no asociada a defectos en el tejido exocrino¹⁹⁶. Los individuos estudiados que sobreviven alrededor de 16-18 meses

de vida, muestran pérdida de tejido exocrino, lipomatosis, lesiones quísticas y lesiones MCA muy similares a las encontradas en los pacientes VHL¹⁹³. Las lesiones que mostraban los ratones *Pdx1-Cre;Vhlh^{loxP/loxP}* contienen una capa células epiteliales (positivas para citoqueratinas) y una capa alrededor de células endoteliales (positivas para CD31) al igual que las lesiones de los pacientes VHL²⁰¹.

Estas aproximaciones experimentales muestran limitaciones funcionales, como es la alta letalidad postnatal de los ratones, y no permiten establecer una relación directa entre el fenotipo descrito y la activación específica HIF-1 α o HIF-2 α , uno de los objetivos que nos planteamos en esta tesis.

5.3.1. Influencia de los factores HIF en la progresión del cáncer de páncreas

El papel que desempeñan los factores HIF en la tumorigénesis está bien caracterizado en otras patologías malignas como el carcinoma de células renales (RCC, de sus siglas en inglés) o en cáncer de pulmón²⁰². En estas patologías cancerosas, HIF-2 α parece desempeñar un papel fundamental mientras que HIF-1 α no muestra un papel determinante en su desarrollo¹⁴⁵. En el RCC deficiente en VHL se detecta un aumento de HIF-2 α en lesiones preneoplásicas, lo que está asociado a un aumento de los eventos displásicos y de atipia celular²⁰³. Además, en otras patologías con un componente hipóxico intratumoral tan definido como es el cáncer de pulmón, se ha podido correlacionar el aumento de expresión a nivel de proteína de HIF-2 α con una disminución en la supervivencia, mientras que HIF-1 α no ha mostrado relación con mal pronóstico²⁰⁴. Cabe señalar que, en otros tipos de cáncer como el de mama o los colorrectales, HIF-1 α sí se encuentra relacionado con un aumento de la mortalidad²⁰⁵.

En cáncer de páncreas, se han analizado los niveles de expresión de los factores HIF- α en muestras de PDAC, tanto en humanos como en modelos

murinos. En humanos, el nivel de expresión de VHL y de HIF-1 α en las lesiones PanIN de bajo grado es casi indetectable²⁰⁶. Sin embargo, se ha detectado HIF-1 α muy expresado en lesiones precancerosas pancreáticas avanzadas y se le ha otorgado un importante papel como factor asociado a resistencia a quimioterapia y radioterapia²⁰⁷. Por otro lado, el estudio de muestras histológicas de pacientes con PDAC, han demostrado que HIF-2 α muestra un nivel de expresión detectable en el núcleo y/o citoplasma de células ductales metaplásicas y en lesiones PanIN de bajo grado²⁰⁸. Los niveles de proteína HIF-2 α van disminuyendo gradualmente según las lesiones precancerosas pancreáticas van avanzando a estadios más complejos (Fig. I9). En páncreas de individuos sanos, la expresión de HIF-2 α está limitada a los islotes endocrinos, mientras que los compartimentos exocrinos y ductales no muestran niveles detectables de esta subunidad. Estudios más recientes de modelos murinos productores de PDAC, con una mutación oncogénica en el gen *KRAS*, portador de dos sitios *loxP* sensibles a *Cre* recombinasa, expresada bajo la expresión del factor de transcripción *Ptf1a* (ratón *Ptf1a;Kras^{G12D}*), han permitido recapitular este fenotipo de expresión de HIF-2 α en páncreas, mostrando el mismo patrón de expresión en tejido normal y de expresión reducida en lesiones cancerosas de avanzado grado de diferenciación²⁰⁸.

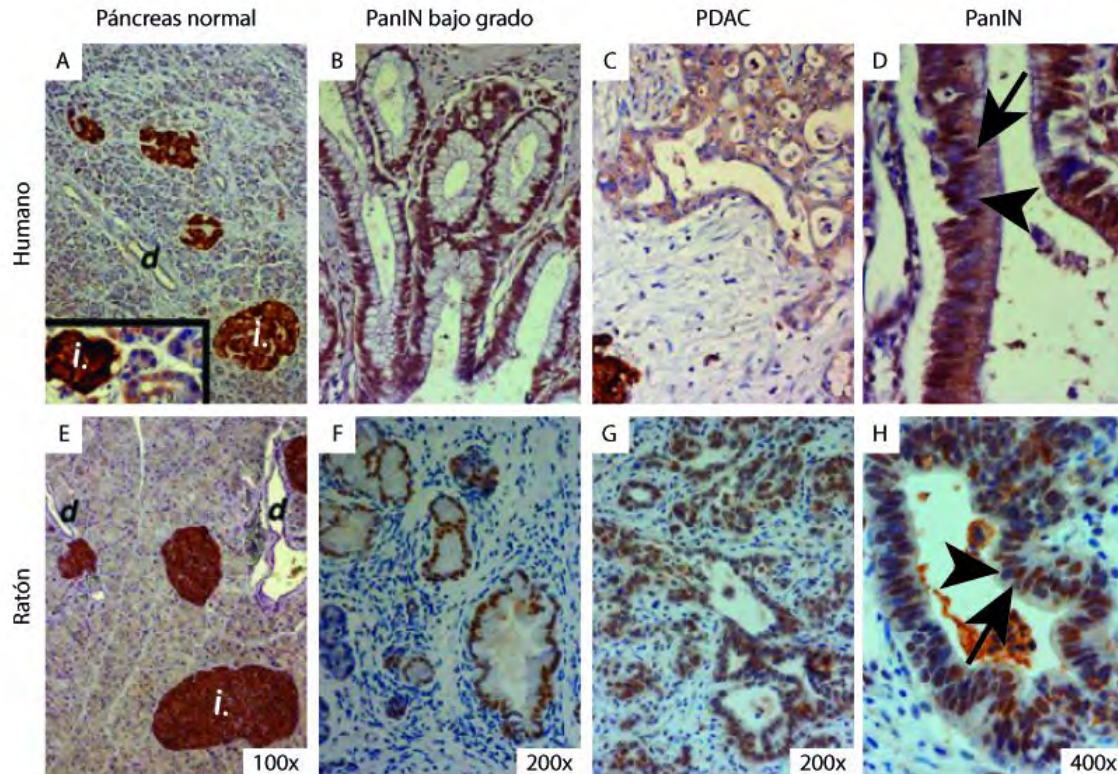


Figura I9. Patrón de expresión de HIF-2 α durante la progresión cancerosa.

Análisis inmunohistoquímicos para la detección de HIF-2 α en humanos (A-D) y ratones (E-H). Subpanel en A muestra lesiones ADM con expresión moderada de HIF-2 α junto a islotes con robusta señal de HIF-2 α . (B, F) Lesiones PanIN de bajo grado con señal positiva de HIF-2 α . (C, G) Lesiones PanIN de alto grado con expresión reducida de HIF-2 α . Tanto en humanos (D) como en ratones (H) las lesiones PanIN están constituidas por poblaciones celulares con niveles de expresión de HIF-2 α diferentes. Cabeza de flecha negra indica las células negativas para HIF-2 α , mientras que la flecha negra señala células positivas. *d.* = ductos; *i.* = islotes. Adaptado de ²⁰⁸.

Como se ha comentado, el modelo transgénico *Ptf1a;Kras^{G12D}*, expresa una forma mutada de *KRAS* constitutivamente activa y se ha descrito que los páncreas de estos ratones desarrollan lesiones PanIN que progresan en diferentes condiciones a todos los estadios histológicos descritos en la patología humana²⁰⁹. Para determinar si las subunidades HIF- α son funcionalmente relevantes durante la tumorigénesis pancreática, se han generado diferentes modelos basado en la tecnología *Cre-loxP*, donde se combinan mutaciones oncogénicas en el gen *KRAS* con ratones que presentan deleciones puntuales en los alelos de *HIF1A*²¹⁰ y de *HIF2A*²⁰⁸.

Los ratones con una delección completa de *HIF1A* específicamente en el páncreas exocrino (*Ptf1a-Cre*) no muestran eventos de letalidad asociada y tampoco presentan defectos histológicos ni metabólicos en el páncreas. El estudio de la delección de *HIF1A* en un contexto oncogénico con la alteración genética del gen *KRAS*, permite establecer que la pérdida de HIF-1 α provoca una aceleración en la progresión de las lesiones PanIN de bajo grado, con un aumento de la proliferación de su epitelio, y desencadena una intensa sustitución del parénquima acinar por tejido estromal. Estos eventos provocados por la ausencia de HIF-1 α , se justifican por su capacidad indirecta de modular las células B, puesto que aumentando la infiltración de estas células inflamatorias se producen alteraciones de los eventos tumorigénicos en el páncreas²¹¹.

De igual manera, los ratones con una delección completa de *HIF2A* específicamente en el tejido exocrino (*Ptf1a-Cre*) nacen con la frecuencia y proporción esperada y no muestran defectos aparentes en la citoarquitectura o en la diferenciación del páncreas posnatal. Sin embargo, en un contexto oncogénico con alteraciones en el gen *KRAS*, la ausencia de HIF-2 α provoca una aceleración de la progresión de las lesiones precancerosas apareciendo lesiones ADM, lesiones PanIN de bajo grado y ductos metaplásicos hiperproliferativos con mayor frecuencia que en los ratones con ambos alelos de *HIF2A* intactos²⁰⁸. Esas lesiones detectadas muestran defectos en la progresión a lesiones de alto grado y defectos en β -catenina y SMAD4, dos reguladores de la ruta WNT, la cual es clave en la transformación de las lesiones precancerosas a PDAC²¹².

Estos indicios sugieren que, aunque los factores HIF- α no son necesarios para la diferenciación y el desarrollo del páncreas, podrían jugar un papel relevante en la iniciación y progresión del cáncer del páncreas mediado por alteraciones del gen *KRAS*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Varios estudios han demostrado que los factores HIF- α tienen un papel importante en la función endocrina pancreática. Sin embargo, apenas se ha estudiado la implicación de los factores HIF- α y, particularmente, de HIF-2 α en la función y homeostasis del tejido exocrino pancreático.

La ruta de señalización HIF ha sido implicada en la fisiopatología de diversos tipos tumorales. En concreto, HIF-2 α juega un papel importante en el carcinoma de células renales y en cáncer de pulmón. Se ha descrito que HIF-2 α se encuentra muy expresado en lesiones precancerosas pancreáticas y que su patrón de expresión disminuye drásticamente en estadios avanzados de la enfermedad. Estos indicios sugieren que HIF-2 α podría tener una función relevante en la iniciación y progresión del cáncer del páncreas.

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es profundizar en la función de HIF-2 α en la formación y función del páncreas, así como analizar la contribución de HIF-2 α a la iniciación y progresión del cáncer de páncreas.

Para ello, se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto de la activación de HIF-2 α en la formación embrionaria del páncreas y su desarrollo posnatal mediante el uso de ratones transgénicos.
2. Examinar el impacto de la activación de HIF-2 α en la homeostasis del tejido exocrino adulto.
3. Determinar el efecto de la superproducción de HIF-2 α sobre la formación de tumores en un modelo de ratón de cáncer pancreático exocrino.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Mantenimiento de las líneas de ratones transgénicos

Todos los ratones que han sido utilizados en los estudios que incluyen esta tesis doctoral han sido mantenidos en las instalaciones del Animalario del IBiS/HUVR, siguiendo todos los protocolos establecidos por las instituciones responsables y aprobadas por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Los animales estaban sujetos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad donde la humedad y temperaturas estaban estrechamente reguladas en un ambiente libre de patógenos. Disponían también de comida y bebida *ad libitum* con una dieta estandarizada siempre que no se indique lo contrario.

2. Líneas de ratones utilizadas

Todas las líneas que han sido utilizadas en los estudios que incluyen esta tesis doctoral han sido, predominantemente, generadas en un fondo genético C57BL/6. Todas las modificaciones genéticas de las diferentes líneas transgénicas que ha sido utilizadas (individualmente o en combinación) en este trabajo han sido previamente descritas: *Pdx1*⁺/*Cre*²⁰⁹, *Ptf1a*⁺/*Cre*⁵⁰, *HIF2dPA*^{lox/lox180} y *Kras*⁺/*LSL-G12Vge0213*.

2.1. Líneas de ratones con la recombinasa *Cre*

Para generar las diferentes líneas de ratones transgénicos empleadas, se ha utilizado la tecnología *Cre-loxP* que permite modificar de forma específica los transgenes de interés en el momento del desarrollo del epitelio pancreático requerido. Esta tecnología se basa en la presencia de dos sitios *loxP*, que son regiones reconocidas por la enzima recombinasa *Cre*, localizadas flanqueando la región de interés. Tras la expresión de la enzima recombinasa *Cre*, se produce el reconocimiento y la escisión específica de la secuencia genética localizada entre ambos sitios *loxP*. Para generar esta escisión de manera específica en un tejido, el gen que codifica para la proteína recombinasa *Cre* se expresa bajo la regulación de un promotor específico, en nuestro caso los factores de transcripción *Pdx1* y *Ptf1a*.

2.1.1. *Pdx1*⁺/*Cre*

La línea *Pdx1*⁺/*Cre* utilizada en esta tesis doctoral fue generada por el Dr. Andrew M. Lowy (Universidad de California, EE.UU.) y se adquirieron del repositorio de *Jackson Laboratories* (referencia 014647). En esta línea, el gen que codifica para la recombinasa *Cre* se encuentra bajo la regulación del gen *Pdx1* de ratón (se encuentra a 4.5 Kb del inicio de transcripción), recapitulando la expresión de *Pdx1* tanto en páncreas como en duodeno o estómago. La actividad de la recombinasa *Cre* es similar al patrón de expresión de *Pdx1*, que ha sido detallado en la introducción, comenzando a E9.5 y expresándose en todo el epitelio pancreático. Sin embargo, en adulto queda restringido a las células β del compartimento endocrino.

2.1.2. *Ptf1a*⁺/*Cre*

La línea *Ptf1a*⁺/*Cre* utilizada durante el desarrollo de esta tesis doctoral fue generada por Roland M. Schmid y por Henrik Einwaechter (Universidad técnica de Munich, Alemania) y se obtuvieron del repositorio de *Jackson Laboratories* (referencia 023329). En estos ratones transgénicos, el gen de la recombinasa *Cre* se ha insertado en el primer exón codificante del gen *Ptf1a*, generando un alelo nulo y estableciendo que la expresión del gen *Cre* se encuentre bajo el control transcripcional de la copia endógena del gen *Ptf1a*. En este caso, aunque la actividad de la recombinasa *Cre* debería comenzar sobre E10.5 al expresarse *Ptf1a* en el endodermo prepancreático, bajo nuestra experiencia, la actividad recombinante es exclusivamente robusta en el linaje acinar.

2.2. Líneas de ratones con sobreexpresión de HIF-2 α

La línea *HIF2dPA^{flox/flox}* utilizada en los experimentos incluidos en esta tesis doctoral fue generada por el grupo del Dr. Kaelin Jr. (*Harvard Medical School*, EE.UU.) y fueron cedidos a nuestro laboratorio para la generación del modelo descrito en esta tesis doctoral. La línea transgénica *HIF2dPA^{flox/flox}* permite la superproducción de la proteína HIF-2 α de forma específica. La construcción descrita contiene una copia del gen *HIF-2 α* que ha sido modificada e incluye dos regiones *loxP* que flanquean una secuencia próxima a un casete STOP, de parada de la transcripción. Esta construcción se expresa de manera constitutiva y altamente eficiente en todos los tejidos del ratón, puesto que se localiza dentro del gen *ROSA26*. En condiciones basales, los animales que expresan esta construcción no presentan ninguna alteración génica, puesta que la presencia de la secuencia de parada de transcripción del gen *HIF-2 α* impide su transcripción.

Sin embargo, cuando estos animales transgénicos se cruzan con individuos que expresan la recombinasa *Cre*, se produce una escisión de la región de parada de la transcripción y el gen *HIF-2 α* comienza a expresarse de forma activa. Este modelo porta tres mutaciones específicas que impiden la hidroxilación de las prolina de *HIF-2 α* por parte de diferentes PHD, lo que impiden el reconocimiento de la proteína por el complejo VHL, evitando su ubiquitinación y posterior degradación. Por todo ello, se considera esta mutación de carácter dominante activo, puesto que se expresa de forma eficaz en presencia de oxígeno evitando su degradación.

2.3. Líneas de ratones con sobreexpresión de *Kras*

La línea *Kras⁺/LSL-G12V^{geo}* utilizada en tesis doctoral fue generada por el grupo del Dr. Mariano Barbacid (CNIO, España) y fueron cedidos por su laboratorio a nuestro grupo para su uso científico. En los ratones de la línea transgénica *Kras⁺/LSL-G12V^{geo}* (*Kras^{LSLG12V}*), mediante la tecnología *knockin*, se introdujo en el primer axón de un alelo *Kras* endógeno, una mutación

oncogénica en el codón 12 que codifica para un residuo de valina (G12V). Dicha mutación encontrada frecuentemente en tumores humanos. Además, este alelo modificado, tiene insertado dentro del primer intrón un casete STOP, de parada transcripcional. Este casete STOP está flanqueado por dos sitios *loxP*, sensibles a la recombinación de la proteína *Cre*, que permitirán la activación de *Kras* mutado de manera específica al expresar el transgén bajo la expresión de un promotor específico, en nuestro caso, *Ptf1a*. Está descrito que los ratones homocigotos *Kras^{LSLG12V}* son letales en etapas tempranas del desarrollo²¹³, indicando que es necesaria la utilización de individuos heterocigotos.

3. Genotipado de las líneas transgénicas

Para el genotipado, se extrajo ADN de los ratones de interés a partir de una muestra de tejido de la cola, la cual se incubó en 75 μ l de solución A (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA) durante 30 minutos a 92°C en un agitador térmico a 600 rpm. El producto se enfría a temperatura ambiente (RT, de sus siglas en inglés) y se equilibra la reacción añadiendo el mismo volumen de solución B (40 mM Tris-HCl, pH 5). Las PCR se realizaron siguiendo un protocolo estándar utilizando un volumen final de 25 μ l al cual se le añade 1 μ l de ADN por reacción. La tabla MM1 incluye la lista de los cebadores usados para el genotipado.

Tabla MM1. Lista de cebadores empleados para el genotipado de las líneas transgénicas

Nombre cebador	Secuencia del oligo
Cre 1	TGCCACGACCAAGTGACAGC
Cre 2	CCAGGTTACGGATATAGTTCATG
HIF-2 α 1	CCGGTAGAATTCCTGCAGGTCGAGGG
HIF-2 α 2	CGTGATCTGCAACTCCAGTC
HIF-2 α 3	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
Kras WT	GTCTTTCCCCAGCACAGTGC
Kras MUT1	CTCTTGCCCTACGCCACCAGCTC
Kras MUT2	AGCTAGCCACCATGGCTTGAGTAAGTCTGCA

4. Ensayo de escisión

Para comprobar el nivel de escisión del transgén *HIF2dPA^{lox/lox}* se empleó la misma metodología empleada para la realización de la PCR de genotipado pero con ligeros cambios. El primer cambio fue que, para la realización de la PCR, se añadía una concentración estandarizada de ADN, en nuestro caso, 20 ng/μl. Otra modificación del protocolo estándar fue la adición de DMSO 1x. Los cebadores diseñados (tabla MM2) se utilizaron de manera independiente (1+4 y 1+10). Tras la realización de ambas PCR y teniendo en cuenta localización de cada cebador indicada en la tabla MM2, se puede definir aquel que porta un alelo con la construcción transgénica sin recombinar (cebadores 1+4 positivos) y aquellos en los que se han llevado a cabo la recombinación (cebadores 1+10 positivos) tras la escisión provocada por la recombinasa *Cre*.

Tabla MM2. Lista de cebadores empleados para los ensayos de escisión

Nombre cebador	Localización genómica	Secuencia del oligo
R26-1	Cebador directo en el locus ROSA26 5'	TTGCCCCCTCTTCCCCCTCGTGATCT
R26-4	Cebador reverso en el casete LSL	CCGGTAGAATTCTGCAGGTCGAGGG
R26-10	Cebador reverso en HA-HIF2dPA	CGGCTTCGGACTCGTTTTTCAGAGCA

5. Extracción del ARN

Para la extracción del ARN de tejido pancreático, se emplearon muestras de tejido fresco procedente de las disecciones que fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y, posteriormente, almacenadas en un congelador a -80°C. Para la purificación del ARN se empleó el kit RNeasy (Qiagen 74104) con tratamiento de desoxirribonucleasas, siguiendo las instrucciones del fabricante. El grado de pureza y la concentración del ARN fue medido usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)

mientras que el posterior proceso de retrotranscripción de 1 µg de ADNc se realizó mediante el uso del kit cDNA *Omniscript reverse transcriptase* (Qiagen 205110) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto se almacena a -80°C diluido en agua libre de ARN (Qiagen).

6. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

Para la realización de RT-PCR, se empleó el sistema *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) en placas de 96 pocillos, usando el equipo 7900HT de PCR a tiempo real (Applied Biosystems). Las reacciones empleadas en las RT-PCR fueron de 25 µl de volumen final, donde se incluye 10 µl del producto de la retrotranscripción y 0.7 µM de cada cebador. Las muestras se añadieron por duplicado y con un mínimo de 3 muestras biológicas por condición. Se emplearon, como control de calidad, muestras a las que no se les había realizado la retrotranscripción. La cuantificación relativa de los niveles de ARN fue realizada empleando el método de $\Delta\Delta C_t^{214}$. Mientras no se indique lo contrario, el *housekeeping* empleado ha sido la Ciclofilina A²¹⁵. Los cebadores empleados para RT-PCR se han listado en la tabla MM3.

Tabla MM3. Lista de cebadores empleados para RT-PCR

Nombre cebador	Secuencia del oligo
Ciclofilina A D	TCACAGAATTATTCAGGATTCATG
Ciclofilina A Rv	TGCCGCCAGTGCCATT
VEGF D	CCAGCACATAGGAGAGATGAGCTT
VEGF Rv	TCTGTCTTTCTTTGGTCTGCATTC
Hes1 D	AGTGAAGCACCTCCGGAAC
Hes1 Rv	TCACCTCGTTCATGCACTC

D, directo; Rv, reverso.

7. Western blot

Para la extracción de proteínas se utilizó tejido de páncreas obtenido en las disecciones de, aproximadamente, 1 mg. Los tejidos fueron homogeneizados inmediatamente mediante el uso de un politrón, en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) suplementada con inhibidores de proteasas *Complete Ultra* (Roche). La concentración de proteínas fue cuantificada mediante el uso del kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo 23227F) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se prepararon geles con concentraciones variables de acrilamida entre 7.5-10% que se utilizaron para la separación de proteínas desnaturalizadas en solución Laemmli (Tris-HCl 1M pH6.8, SDS 20%, Glicerol, H₂O, azul bromofenol 0.015%) con un 12% de β-mercaptoetanol durante 5 minutos a 95°C. Los geles resultantes se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) la cual se incubó con el anticuerpo de interés (Tabla MM4, Anexo I) tras bloquear con un 5% BSA durante 1 hora a RT. El revelado de los anticuerpos secundarios conjugados con HRP incubados en la membrana 1 hora a RT, se realiza utilizando el kit *Western ECL Substrate* (BioRad). Las imágenes finales de las membranas fueron obtenidas con el equipo *ImageQuant LAS 4000 Mini Gold* (GE Healthcare). Mientras no se indique lo contrario, el *housekeeping* empleado ha sido la α-Tubulina. El análisis y la posterior cuantificación de las imágenes obtenidas se realizaron con el programa ImageJ (NIH).

8. Análisis histológicos

8.1. Preparación histológica de los tejidos

Para la obtención de las muestras parafinadas, los páncreas completos diseccionados se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS 1X (PFA 4%) durante toda la noche a 4°C. Los tejidos se embebieron en parafina utilizando un procesador de tejido automatizado Leica ASP200S y se montaron en bloques de histología para su posterior procesado.

Se realizaron secciones seriadas de 3 μm de grosor montadas en portaobjetos de todos los individuos diseccionados.

8.2. Tinciones histológicas

Para las tinciones de hematoxilina y eosina (HE), las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas en Hematoxilina durante 90 segundos a RT. Tras retirar los excesos y lavar el tejido con agua corriente, se incubó con Eosina durante 1 minuto a RT. Para la tinción azul alcian, los tejidos desparafinados son incubados con una solución con 10 g/l de azul alcian 8GX (pH 2.5) durante 30 minutos a RT. Una vez lavados los tejidos se contratiñeron los tejidos con *nuclear fast red* (NFR). Para la tinción de ácidos periódicos de Schiff (PAS), los tejidos fueron desparafinados e incubados con una solución de ácido periódico 0.5% (Sigma-Aldrich) a RT, durante 5 minutos. Tras lavar los portaobjetos con agua corriente, se sumergieron 15 minutos en el reagente Schiff (Sigma-Aldrich) y se contratiñeron, posteriormente, con Hematoxilina. Para la realización de la tinción tricrómica de Gomori, los tejidos desparafinados fueron pretratados con la solución Bouin (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 56°C. Posteriormente, los tejidos se incuban secuencialmente en hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos, solución tricrómica de Gomori (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y, finalmente, se diferencian con ácido acético 0.5% durante 2 minutos.

Todas las tinciones histológicas fueron montadas con medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich) y las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio BX-61 (Olympus).

8.3. Tinciones inmunohistoquímicas

Para realizar las tinciones inmunohistoquímicas, las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas y permeabilizadas en PBS con 0.2% de Triton X-100 (PBT 0.2%). A continuación, se desenmascararon los antígenos mediante ebullición y alta presión en una máquina Retriever 2100 sumergidos

en una solución de citrato sódico (pH 6). Tras esto, para bloquear la peroxidasa endógena, se incubaron los tejidos en peróxido de hidrógeno 0.3% durante 15 minutos a RT. Además, se bloquearon las uniones inespecíficas con un 3% suero de burro en PBT 0.2% durante 45 minutos a RT. Se incubaron las secciones con la dilución apropiada de cada anticuerpo primario (Tabla MM4, Anexo I) durante toda la noche a 4°C. Tras lavados seriados con PBS 1X, se incubaron con el anticuerpo secundario específico correspondiente, durante 45 minutos a RT. Se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados o anticuerpos con estreptavidina conjugada con FITC o Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Para el revelado de los anticuerpos secundarios biotinilados, se utilizó el kit ABC VECTASTAIN (Vector Labs) siguiendo las indicaciones del fabricante y se revelaron con el kit *SignalStain DAB Substrate* (Cell Signaling).

Finalmente, se utilizó hematoxilina para contrateñir el tejido de las secciones y, tras la deshidratación, se montaron usando medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich). Las imágenes de campo claro se obtuvieron utilizando un microscopio BX-61 (Olympus).

8.4. Tinciones inmunofluorescentes

Las secciones se procesaron de manera similar al descrito en el apartado anterior, pero se omitieron los pasos relacionados con el bloqueo de la peroxidasa endógena. Por otro lado, tras la incubación de los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla MM4, Anexo I), se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados correspondientes. Para la detección de la lectina DBA (aglutinina *Dolichos biflorus*) se utilizó un anticuerpo biotinilado FITC conjugado a estreptavidina (Vector Laboratories). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488, Alexa 568 (Molecular Probes), FITC y Cy3 (Jackson ImmunoResearch). En este caso, se utilizó DAPI (0.5 mg/ml) para marcar los núcleos celulares. Para las tinciones de fluorescencia, se empleó un medio de montaje de base acuosa (Agilent, DAKO). Las imágenes de las tinciones resultantes fueron visualizadas y capturadas usando un microscopio directo BX-61 (Olympus) o un microscopio confocal LTC SP2 (Leica). Todas las imágenes mostradas en esta tesis doctoral son

representativas de, al menos, tres muestras independientes del genotipo especificado.

9. Análisis de glucosa en sangre

La concentración de glucosa en sangre fue determinada usando un glucómetro *ACCU-CHEK Aviva* (Roche). Estas medidas se realizaron antes de diseccionar las diferentes camadas en un mínimo de 6 ratones/genotipo/edad. A través de una incisión en las venas de la cola se recogió un pequeño volumen de sangre, tal y como indica el fabricante. Tanto las disecciones como las medidas de glucemia, se realizaron siempre a la misma hora y sin privarles de comida previamente.

10. Análisis cuantitativos y cuantificaciones

10.1. Compartimento endocrino

Para las cuantificaciones de las imágenes del compartimento endocrino, se realizaron inmunofluorescencias con el anticuerpo insulina en 6 secciones de tejido seriadas, separadas al menos 60 μm , de al menos 3 individuos de 15 días de edad por cada genotipo. De cada corte se fotografiaron, como mínimo 6 campos elegidos al azar con un objetivo de baja magnificación. Usando el programa ImageJ (NIH) se crearon macros que permitieron automatizar la creación de máscaras binarias con umbrales específicos a partir de la expresión de la insulina detectada en las fotos originales. Este procesamiento de la imagen permitió cuantificar el área de tejido endocrino, el tamaño de cada islote y su número, asumiendo el error que conlleva cuantificar exclusivamente las células β positivas para insulina.

10.2. Compartimento exocrino

Para las cuantificaciones relativas al tejido exocrino, se utilizó el mismo procedimiento indicado en el apartado anterior, usando anticuerpos específicos de estructuras localizadas en este compartimento como amilasa, KRT19, Vimentina o α -SMA. En estos casos, se procesaron 3 cortes por individuo, analizándose 3 imágenes por corte, separados 60 μm entre sí, utilizando un objetivo de alta magnificación. Los valores obtenidos se representan como μm^2 .

Para cuantificar el área total de páncreas, el área de tejido graso o el tejido fibrótico, se analizaron, usando la misma metodología, cortes con tinciones HE o con tinciones tricrómicas de Gomori. Los parámetros obtenidos en estos análisis, cuando se indique, se relativizaron al área total de páncreas o al tamaño total del campo abarcado en la fotografía analizada, pudiendo extraerse valores relativos de porcentaje que permitieron la comparación entre grupos. Los valores obtenidos se representan como μm^2 .

Para la cuantificación y caracterización de la vascularización, se emplearon 3 cortes de 4 individuos por genotipo, donde se realizaron inmunofluorescencias con el marcador MECA32. Se realizaron capturas de 3 campos de baja magnificación por corte. Al igual que en el análisis del área de célula β , se crearon macros específicas para automatizar la creación de máscaras binarias con umbrales específicos a partir de la expresión de MECA32. Así, se obtuvieron unos valores absolutos de número de vasos, tamaño medio de cada vaso y, tras relativizar respecto al área de páncreas total, un valor relativo de densidad del tejido endotelial.

Para la cuantificación de proliferación (Ki67), apoptosis (caspasa-3 escindida) o marcadores inflamatorios como CD11b o F4/80, se analizaron 10-12 campos de alta magnificación, elegidos de manera aleatoria en 3 cortes independientes, separados al menos 50 μm entre sí, de 3 individuos por genotipo. Para las cuantificaciones de estos mismos parámetros en un compartimento específico, como el ductal o el acinar, se realizaron inmunofluorescencias dobles donde se incluyeron marcadores como amilasa (tejido acinar) o KRT19 (tejido ductal). En estos casos, solo se cuantificaron las

células que mostraban expresión para ambos marcadores. Los valores obtenidos se expresaron en número absoluto de células por campo o en porcentaje relativo.

11. Análisis morfométricos

Para el análisis de la morfología y distribución de los núcleos de las células acinares se realizaron inmunofluorescencias con el marcador amilasa y DAPI. Se analizaron 6 imágenes de 3 secciones de tejido de 3 μm de grosor, separados al menos 50 μm entre sí, de 3 individuos por condición. El marcador amilasa se utilizó para delimitar el tamaño del acino y para determinar la localización de los centroides de los acinos pancreáticos mediante el uso programa ImageJ (NIH). El análisis de las máscaras binarias resultantes del análisis del marcador DAPI de la misma muestra, permitió cuantificar el tamaño de los núcleos y la distancia existente respecto al centroide.

Para la cuantificación intracelular de la localización de β -catenina se realizaron capturas utilizando el microscopio confocal LTC SP2 (Leica) usando un objetivo de inmersión en glicerol. Se tomaron 3 capturas por sección, en el plano central del eje z, usando una configuración constante de potencia y sensibilidad. Solo 3 secciones fueron utilizadas por cada individuo y condición. Se cuantificó la amplitud de la señal de un segmento de 100 μm de tejido acinar conservado y el histograma resultante fue analizado con ImageJ (NIH). Por otra parte, para determinar la posible relocalización de en las células acinar se realizaron inmunofluorescencias dobles, junto a un marcador membranoso como N-cadherina. Se midieron 6 acinos seleccionados de manera aleatoria por individuo. Se posiciona de manera aleatoria un perfil de unas 70 μm que atraviese un acino por su centroide y se analizaron los histogramas de cada canal por separado.

12. Análisis histopatológicos

Con el objetivo de cuantificar el área afectada por lesiones PanIN y ADM en los diferentes genotipos, se realizaron tinciones HE y AB en 3 secciones por individuo, de un mínimo de 3 individuos por grupo. Cada sección fue digitalizada en su totalidad y procesada utilizando un microscopio BX-61 (Olympus) con la tecnología NewCAST. Estas súper imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (NIH). En el caso de la cuantificación del área afectada, se utilizaron los tejidos con HE, donde se delimitaron a mano las regiones afectadas en cada súper imagen, obteniéndose un valor de área total de páncreas afectado, el cual se estandariza respecto al tamaño del páncreas total. Utilizando las mismas herramientas descritas, se cuantificaron visualmente el número de lesiones PanIN en los mismos individuos, considerando exclusivamente aquellas lesiones que mostraban un marcaje positivo para la tinción AB. Para cuantificar el área de las lesiones PanIN, se emplearon las mismas muestras indicadas en el apartado anterior. En este caso, se utilizaron métodos digitales para generar máscaras binarias donde se establecieron unos umbrales limitados por la intensidad de los píxeles positivos para AB. De esta manera, se obtiene una máscara exacta del área que cubre la lesión PanIN positiva para AB, relativizada al tamaño del páncreas total. En las mismas muestras, se evaluaron todas las lesiones preneoplásicas cuantificadas anteriormente y se clasificaron según el nivel de expresión de los marcadores pERK o pRPS6 en dos grupos: bajo y alto grado de expresión. Los resultados obtenidos se representan como porcentaje respecto al número total de lesiones.

13. Análisis estadísticos

Todos los valores han sido indicados como la media, o la mediana cuando se indique, \pm la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (SEM). Los valores de significancia se determinaron utilizando la prueba de t-Student de dos colas y la prueba ANOVA con la corrección *post-hoc* de Tukey HSD. Se consideró estadísticamente significativo los valores. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

RESULTADOS

BLOQUE I. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE HIF-2 α EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO

1. Generación de un modelo animal con activación específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos

Trabajos previos han demostrado que la inactivación de HIF-2 α durante el desarrollo embrionario disminuye el tamaño y altera la ramificación (*branching*) del páncreas¹⁸⁸. Para investigar la función de HIF-2 α durante el desarrollo embrionario y determinar el posible impacto de una alteración de HIF-2 α en la formación del páncreas, activamos específicamente HIF-2 α en los progenitores embrionarios pancreáticos en ratón²¹⁶. Todas las células pancreáticas epiteliales adultas provienen de un conjunto común de progenitores embrionarios pancreáticos que expresan dos factores de transcripción críticos para la formación del páncreas, Pdx1 y Ptf1a⁴⁵. Ambos factores se coexpresan en el epitelio pancreático hasta la transición secundaria (E14.5) cuando la expresión de Pdx1 va reduciéndose progresivamente en el tejido acinar diferenciado, el cual continúa expresando Ptf1a. Debido a la temprana expresión de Pdx1 en los progenitores pancreáticos, se consideró al factor de transcripción Pdx1 como buen promotor candidato para expresar la recombinasa *Cre*. Así, se han generado varias líneas de ratones que expresan la recombinasa *Cre* bajo el control del promotor de *Pdx1* con diversos niveles de eficiencia y especificidad²¹⁷. En nuestro caso, utilizamos la línea generada en el laboratorio del Dr. Andrew M. Lowy [B6.FVB-Tg(Pdx1-cre)6Tuv/J]²⁰⁹ al ser una línea que, al contrario que otras líneas *Pdx1-Cre*, muestra una baja o nula expresión en el cerebro evitando potenciales efectos extrapancreáticos no deseados²¹⁸. Esta línea de ratón se obtuvo del repositorio comercial *Jackson Laboratory* (más detalles en el apartado 2.1.1. de Materiales y Métodos).

Para conseguir una activación específica de HIF-2 α en el epitelio pancreático se cruzó la línea *Pdx1-Cre*²⁰⁹ con la línea de ratón *HIF2dPA* (en adelante, ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*). La línea de ratón *HIF2dPA* porta un alelo transgénico, que en presencia de la recombinasa *Cre* produce una variante

humana de HIF-2 α resistente a la degradación incluso en presencia de oxígeno, al portar mutaciones específicas que impiden la hidroxilación necesaria para el reconocimiento por parte de pVHL¹⁸⁰ (detallado en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos).

2. La activación ectópica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos causa defectos severos en el tejido exocrino adulto, pero no en el compartimento endocrino

Para generar ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de la forma más eficiente se realizó, siempre que fue posible, un cruce entre un ratón macho *Pdx1-Cre* y ratones hembras homocigotas para el alelo *HIF2dPA floxeadado* (*HIF2dPA^{flox/flox}*) (Fig. R1A). Los individuos de las camadas resultantes de estos cruces portarían siempre un alelo *HIF2dPA floxeadado*, por lo que la consecución de animales *Pdx1-Cre;HIF2dPA* quedaría supeditada a la herencia de la *Cre* recombinasa. Se usaron como controles en todos los experimentos ratones *HIF2dPA* que no portaban el transgén *Pdx1-Cre* (en adelante, ratones *HIF2dPA*). Los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* nacieron en la proporción mendeliana esperada [46.87% (15 de 32) del total de nacimientos fueron *Pdx1-Cre;HIF2dPA*] y alcanzaban edades adultas sin señales aparentes de tener comprometida su salud. Igualmente, no existieron diferencias en el peso corporal entre los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y los ratones controles *HIF2dPA*, en ninguno de los puntos temporales analizados (Fig. R1B). Sin embargo, se detectó una sustancial reducción de masa pancreática en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a edades tempranas (2 semanas) (Fig. R1C, D), incluso cuando se normalizaban estos valores respecto al peso total del cuerpo (Fig. R1E). Esta diferencia en el peso del páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* se mantuvo también en edades más avanzadas (8 semanas) (Fig. R1C, E).

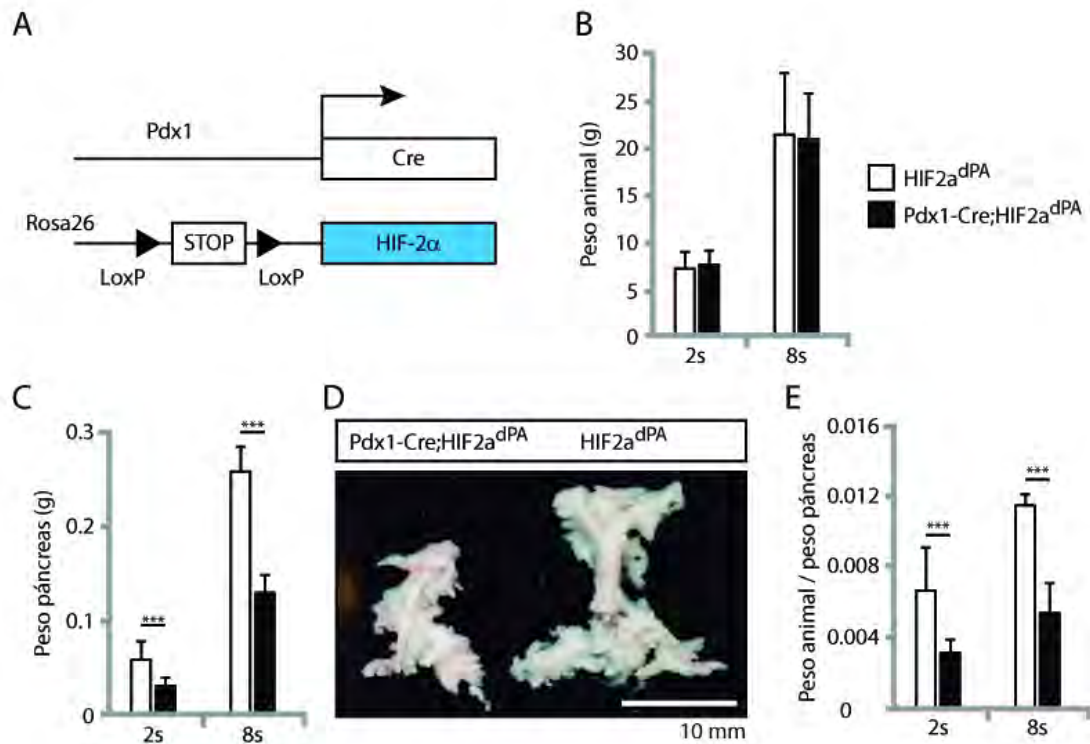


Figura R1. La activación específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos causa una reducción del tamaño del páncreas. (A) Esquema representativo de los alelos *Pdx1-Cre* y *HIF2^{dPA}*. Representación del peso corporal (B), peso pancreático (C) y proporción peso corporal/peso pancreático (E) en ratones *Pdx1-Cre;HIF2^{dPA}* y en ratones controles *HIF2^{dPA}* a 2 y 8 semanas de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. (D) Páncreas completos de ratones *Pdx1-Cre;HIF2^{dPA}* y en ratones controles a 2 semanas de edad tras ser diseccionados. Barra de escala en D, 10 mm. *** $P \leq 0.001$.

En los ratones *HIF2^{dPA}*, la variante de HIF-2 α lleva asociada un *tag* de afinidad, la hemaglutinina (HA). Esto nos permitió confirmar de manera indirecta la eficaz acumulación de HIF-2 α en el páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2^{dPA}* mediante *western blot* (Fig. R2A). También se realizó esta comprobación mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra HIF-2 α . En el páncreas adulto control, se detectó acumulación de la proteína endógena HIF-2 α en los islotes pancreáticos, mostrando, sin embargo, un patrón citoplasmático y/o perinuclear (Fig. R2B). No se detectó expresión de HIF-2 α endógena en células acinares o ductales, coincidiendo con estudios previos (Fig. R2C)²⁰⁸. En el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2^{dPA}* adultos se observó

una clara acumulación nuclear de HIF-2 α en el tejido exocrino, tanto células acinares como ductales (Fig. R2E). Los islotes pancreáticos de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostraron una intensa acumulación nuclear de HIF-2 α , además de la localización citoplasmática que se apreciaba en los individuos controles (Fig. R2D). En conjunto, estos resultados muestran que la proteína modificada HIF-2 α codificada por el alelo *HIF2dPA* se acumula de forma eficiente en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*.

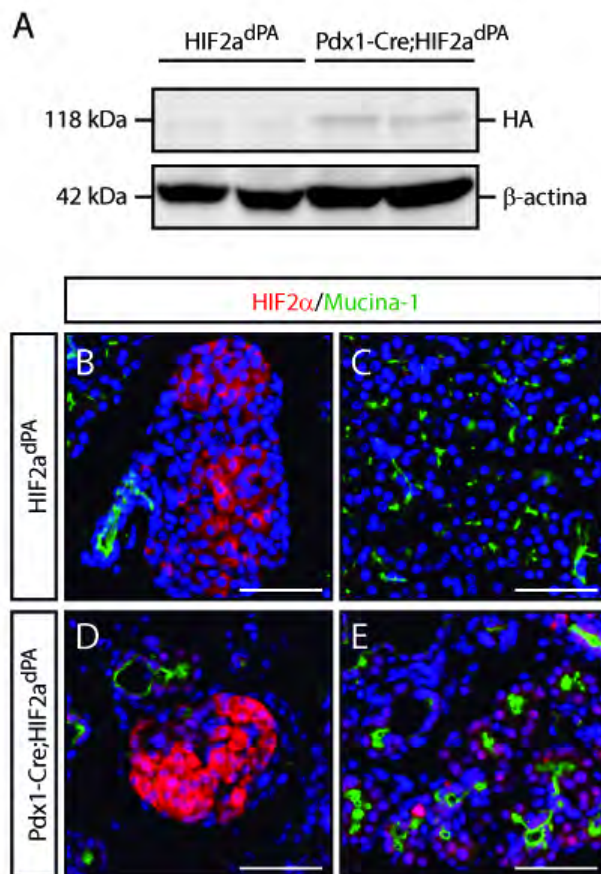


Figura R2. Patrón de expresión de HIF-2 α en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. (A) Acumulación de HIF-2 α en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* detectada mediante *western blot* utilizando un anticuerpo anti-HA. Se muestran extractos proteicos de 2 individuos independientes de 2 semanas de edad para cada genotipo. Se utilizó β -actina como control de carga. (B-E) Análisis de inmunofluorescencia de acumulación de HIF-2 α en páncreas de 2 semanas de edad. Se detectó señal endógena de HIF-2 α en los islotes pancreáticos (B), pero no en el tejido exocrino de ratones controles (C). (E) Robusta acumulación de HIF-2 α en los islotes (D) y en las células acinares y ductales de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m.

La acumulación ectópica de HIF-2 α no parecía afectar a la arquitectura del islote pancreático ni modificaba la composición celular del mismo (Fig. R3A, B), manteniendo una normal distribución de los tipos celulares más representados en el islote, como son las células β (productoras de insulina; Fig. R3C-F), las células α (productoras de glucagón; Fig. R3C, D) y las células δ (productoras de somatostatina; Fig. R3E, F). Asimismo, la cuantificación morfométrica del número de islotes y del tamaño de los mismos no reveló diferencias entre los

ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y los ratones controles (Fig. R3G, H). En consonancia con esta ausencia de defectos en el tejido endocrino, no observamos diferencias en los niveles de glucosa en sangre entre ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y ratones controles *HIF2dPA* (Fig. R3I)²¹⁹.

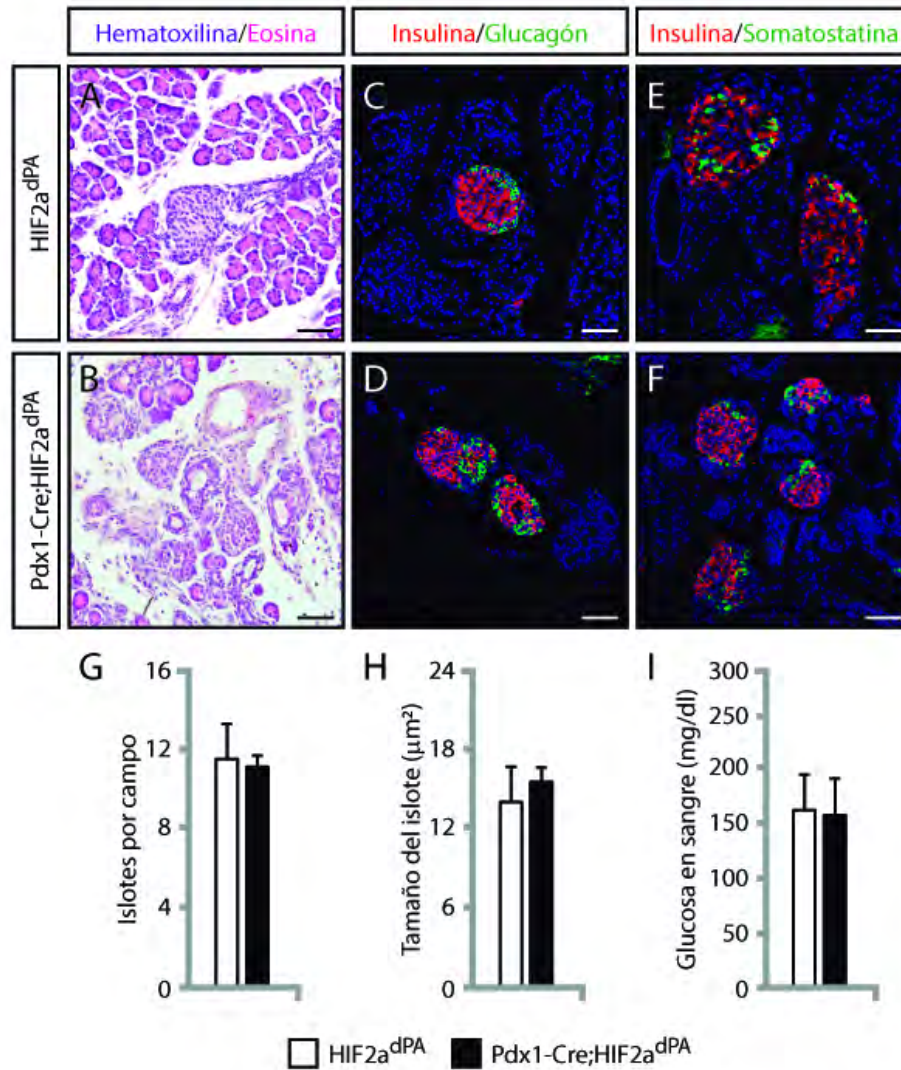


Figura R3. Los islotes pancreáticos de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* no muestran defectos. (A-B) HE de secciones de páncreas de ratones controles y de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad. (C-F) Inmunofluorescencias con los anticuerpos específicos de células endocrinas, anti-insulina (célula β), anti-glucagón (célula α) y anti-somatostatina (célula δ) en páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (D, F) y de ratones controles (C, E) de 2 semanas de edad. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 50 μm . Representación de las cuantificaciones del número de islotes (G), del tamaño de los islotes (H) y del nivel de glucosa en sangre previo a las disecciones (I) de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y ratones controles *HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar.

Para determinar si en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* se estaba produciendo una activación de otras isoformas de la ruta HIF, se realizaron estudios inmunohistoquímicos para determinar la expresión proteica de HIF-1 α . No se observaron niveles detectables de HIF-1 α en secciones de páncreas de ratones controles (Fig. R4A, B) ni en páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R4C, D). Esto confirma que se produce la estabilización específica de la isoforma HIF-2 α en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, sin afectar a otros factores de transcripción HIF.

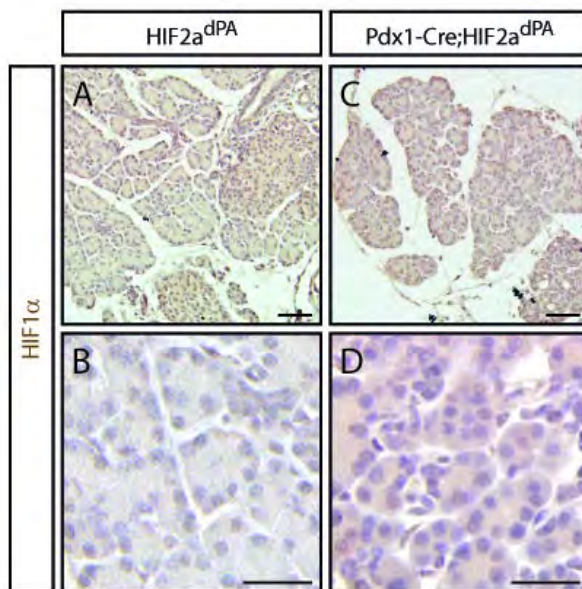


Figura R4. La estabilización de HIF-2 α en progenitores pancreáticos no produce acumulación de HIF-1 α en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. (A-D) Análisis inmunohistoquímico de HIF-1 α en ratones controles y en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Barras de escala en A y C, 50 μ m; en B y D, 100 μ m.

Para profundizar en la pérdida de masa pancreática encontrada en individuos *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se realizó un análisis histológico de la morfología pancreática mediante tinciones de HE a diversas edades tras el nacimiento. En ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* recién nacidos (P0, día posnatal 0) no se detectaron graves alteraciones histológicas (Fig. R5A-C, J) aunque en zonas muy localizadas se observaban acinos con pequeñas dilataciones en la zona apical produciendo estructuras similares a los conductos pancreáticos (Fig. R5C). En los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad, y en consonancia al análisis macroscópico de la disección (Fig. R1C), se observó histológicamente una atrofia del parénquima pancreático con una pérdida mayoritaria de células acinares

(Fig. R5E, J) respecto a los ratones silvestres (Fig. R5D) y un incremento muy llamativo de las estructuras similares a conductos (Fig. R5E) que se habían observado a P0. Además, en algunas zonas, se observó la aparición de tejido adiposo (Fig. R5F, K). A las 8 semanas de edad, en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, el páncreas exocrino había desaparecido casi en su totalidad, quedando solo remanentes de acinos, estructuras tubulares similares a conductos, estroma (Fig. R5H) y tejido adiposo (Fig. R5I, K).

Estos resultados indican que la estabilización específica de HIF-2 α en el páncreas causa una pérdida masiva de células acinares y el desarrollo de dilataciones ductales y tejido adiposo en ratones tras el nacimiento. Sin embargo, la activación de HIF-2 α no parece afectar a la estructura del tejido endocrino pancreático o su funcionalidad.

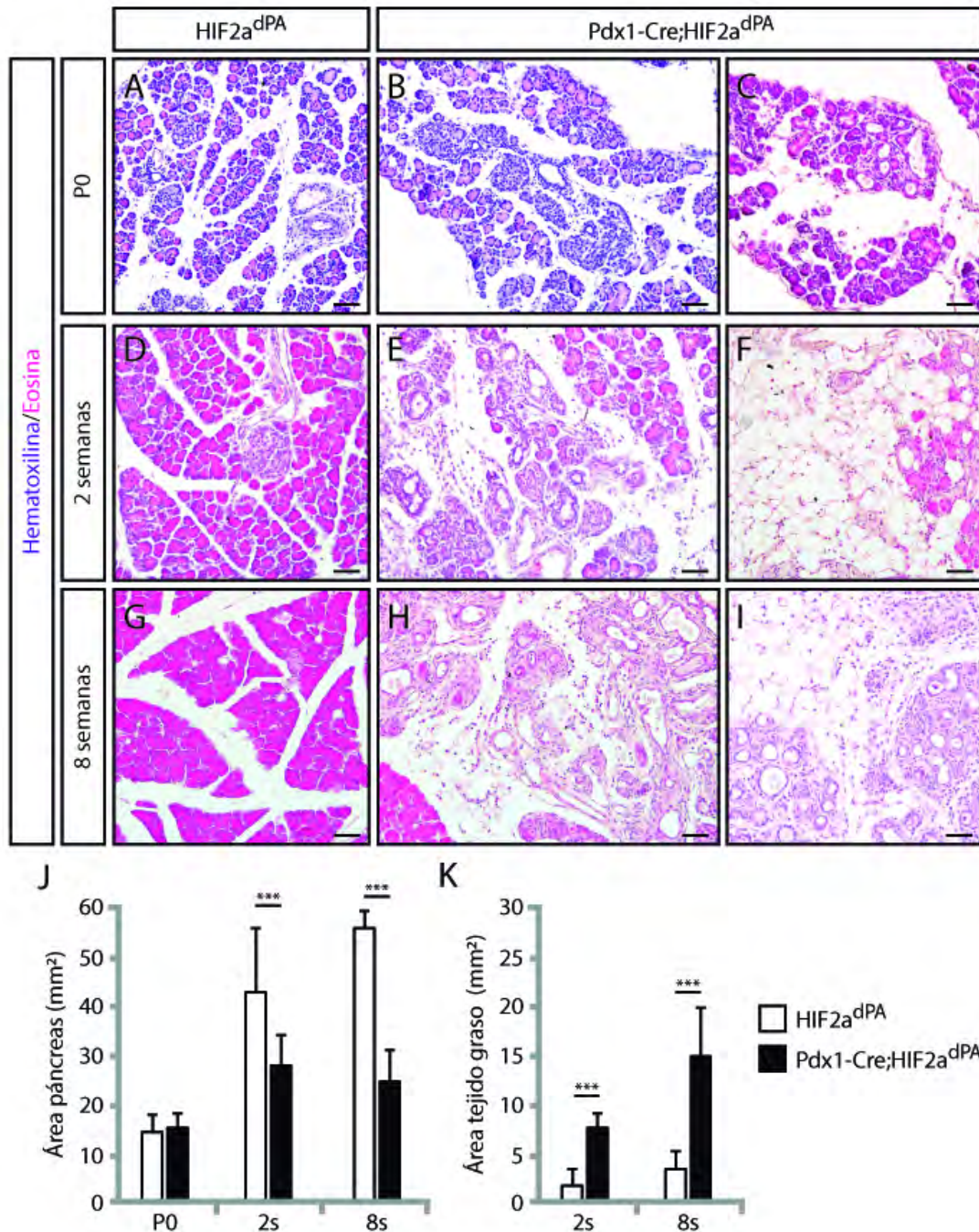


Figura R5. La estabilización de HIF-2 α produce defectos en la homeostasis del tejido exocrino. (A-I) Tinción con HE de secciones de páncreas de ratones controles y de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a Po (A-C), 2 semanas (D-F) y 8 semanas de edad (G-I). Se detectó un diferente grado de atrofia del parénquima pancreático con una aparición de lesiones túbulo-ductales en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a Po (C), a 2 semanas (F) y a 8 semanas de edad (I). Barras de escala, 100 μ m. (J) Cuantificación del área total de secciones de páncreas de ratones controles y de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a Po, a 2 semanas y a 8 semanas de edad. (K) Cuantificación del área de tejido graso detectado en las secciones de páncreas de ratones controles y de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas y a 8 semanas de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. *** $P \leq 0.001$.

3. La estabilización de HIF-2 α produce atrofia de las células exocrinas y metaplasia acino-ductal en páncreas de ratones adultos

Para caracterizar las alteraciones histológicas del tejido exocrino de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se realizaron análisis inmunohistoquímicos combinando marcadores específicos de células ductales (citoqueratina 19; KRT19) y de células acinares (amilasa). Como observamos en las tinciones con HE, los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* recién nacidos (P0) no mostraban una pérdida de células acinares sustancial (Fig. R6B, C) ni una expansión significativa del componente ductal (Fig. R6B, D) respecto a los ratones controles (Fig. R6A, C, D). Sin embargo, a las 2 semanas de edad, se observó una disminución de células acinares en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R6F, G) y un aumento drástico de estructuras tubulares de naturaleza ductal (con expresión de KRT19) (Fig. R6F, H) en comparación a los ratones controles (Fig. R6E, G, H). Histológicamente, la morfología del acino aparecía desorganizada, con dilataciones del lumen intraacinar y un aumento de células epiteliales positivas para KRT19 (Fig. R6F). Estos hallazgos histológicos son muy similares a un proceso patológico denominado metaplasia acino-ductal (ADM, por sus iniciales en inglés). Las lesiones ADM aparecen en situaciones de daño pancreático y se caracterizan por la formación anómala de estructuras tubulares, produciéndose un reemplazo de células acinares por células de naturaleza ductal²²⁰. A las 8 semanas de edad, los páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* se encontraban severamente atrofiados, con una masiva pérdida de células acinares (Fig. R6J, K) y una marcada expansión de estructuras ductales (Fig. R6J, L). Solo se observaron pequeños reductos de tejido acinar compacto, mientras el resto del tejido pancreático consistía en tejido adiposo, estroma y tejido fibrótico (* en Fig. R6J).

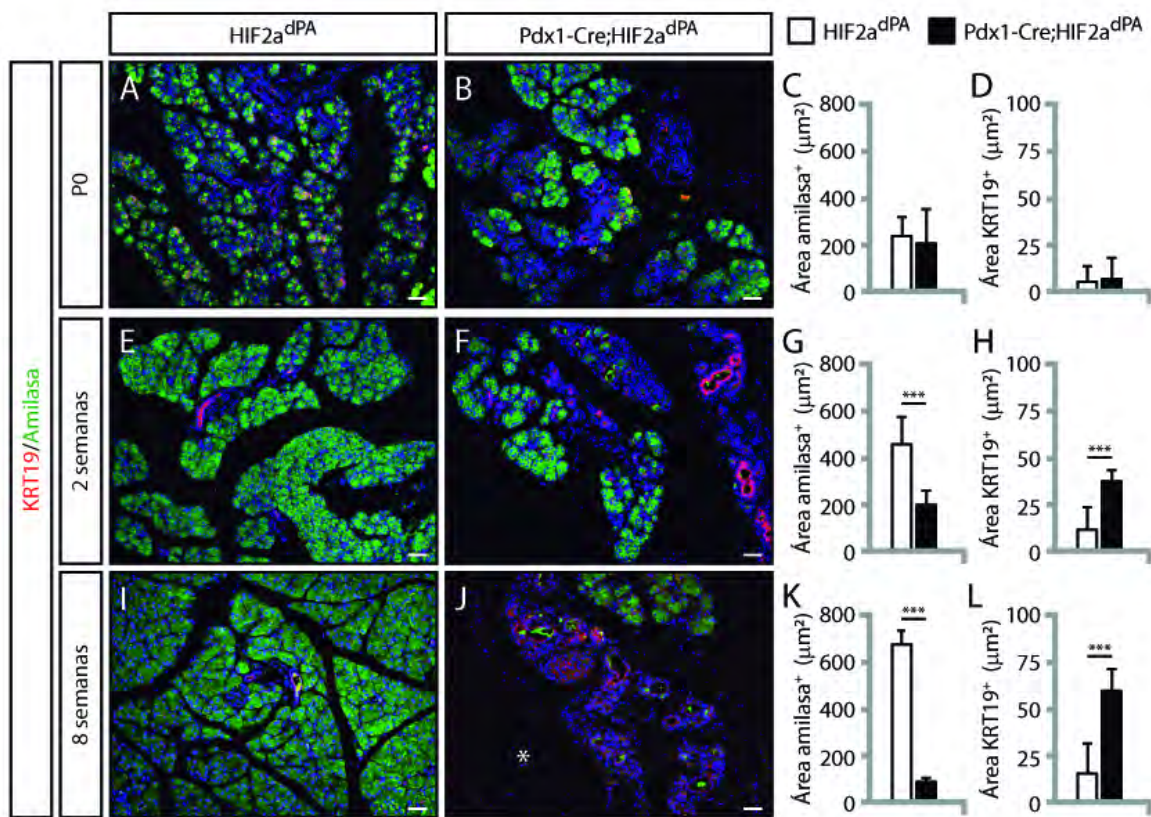


Figura R6. La activación de HIF-2α en progenitores pancreáticos induce la atrofia de las células acinares y la expansión del componente ductal. Análisis de inmunofluorescencia de amilasa y KRT19 en secciones de páncreas de ratones controles y de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a Po (A-B), a 2 semanas (E-F) y a 8 semanas de edad (I-J). * en J indica la presencia de abundante tejido graso. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μm. Cuantificaciones del área de células acinares positivas para amilasa y de células ductales positivas para KRT19 a Po (C, D, respectivamente), a 2 semanas (G, H, respectivamente) y a 8 semanas de edad (K, L, respectivamente). Los datos se han representado como la media ± desviación estándar. *** $P \leq 0.001$.

Cabe señalar que en las lesiones metaplásicas ADM de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, no se detectaron células que coexpresasen marcadores acinares y ductales ni a las 2 semanas (Fig. R7A) ni a las 8 semanas de edad (Fig. R7B), por lo que la formación de estas lesiones metaplásicas no parece tener origen en procesos de transdiferenciación directa acino-ductal, como sí se han descrito en otros modelos experimentales de daño pancreático^{75,100}.

Estos resultados demuestran que la activación ectópica de HIF-2 α altera la homeostasis del compartimento exocrino de ratones adultos produciendo una pérdida masiva de tejido acinar, una expansión de estructuras tubulares de naturaleza ductal y el desarrollo de metaplasia acino-ductal.

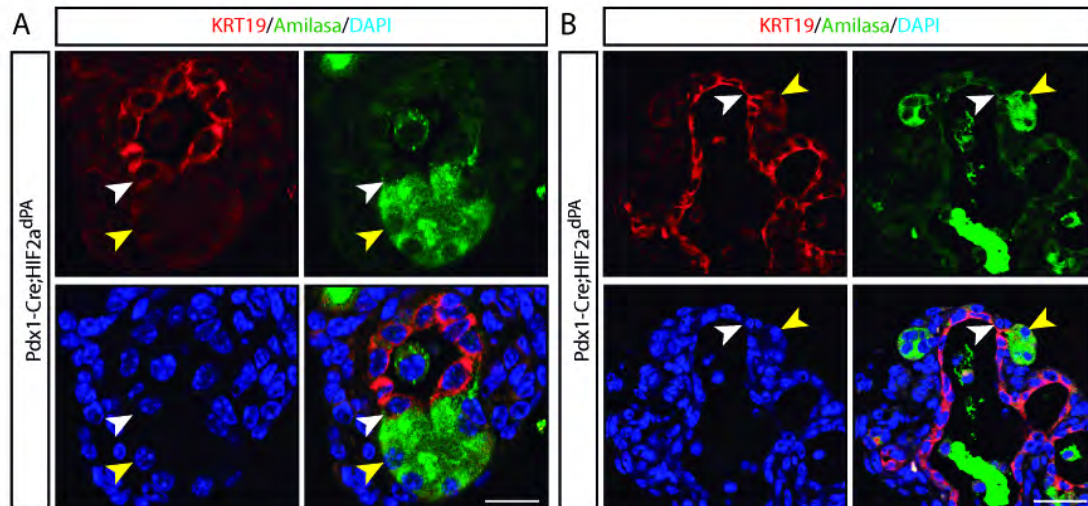


Figura R7. Las lesiones tubulares de los páncreas con activación de HIF-2 α no proceden de células acinares. (A-B) Imágenes de microscopía confocal de regiones de metaplasia acino-ductal en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad con los anticuerpos KRT19 y amilasa, mostrando la ausencia de colocalización entre ambos marcadores. Se han representado imágenes de 2 individuos *Pdx1-Cre;HIF2dPA* independientes de 2 semanas de edad. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Las flechas blancas indican las células ductales positivas para KRT19 pero no para amilasa. Las flechas amarillas señalan las células acinares positivas para amilasa, pero no para KRT19. Barras de escala, 20 μ m.

4. La acumulación de HIF-2 α en el páncreas produce un fenotipo similar a la pancreatitis en ratones adultos

El páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostraban características histológicas parecidas a las que se encuentran en pancreatitis. Desde un punto de vista histológico, la pancreatitis se define por la presencia de infiltrados inflamatorios, fibrosis del parénquima pancreático y pérdida progresiva del tejido exocrino funcional pero preservación del compartimento endocrino y del epitelio ductal⁶⁹. La realización de tinciones tricrómicas de Gomori en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de edades más avanzadas (8 semanas de edad), en los cuales

casi la totalidad del parénquima pancreático estaba severamente afectado, reveló un marcado incremento de tejido conectivo (Fig. R8B, C), mientras que en ratones controles solo se observó tinción sustancial en el tejido fibroconectivo interlobular y periductal (Fig. R8A). En el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* se observó un aumento de células estrelladas del páncreas (PSC, de sus siglas en inglés), las cuales se caracterizan por la expresión de marcadores de proteínas del citoesqueleto, como la vimentina (Fig. R8D-F). Tras eventos de estrés o daño pancreático, las PSC se diferencian a un estado activo adquiriendo características de miofibroblastos²²¹, lo que conlleva la inducción de la expresión filamentos intracelulares como la α -actina del músculo liso (α -SMA) o nestina. Las PSCs activadas causan el exceso de acumulación los componentes de matriz extracelular característicos de la fibrosis pancreática²²². En comparación con los páncreas de ratones controles *HIF2dPA* (Fig. R8G, J), los páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostraban unos altos niveles de células positivas para α -SMA (Fig. R8H, I) y nestina (Fig. R8K, L).

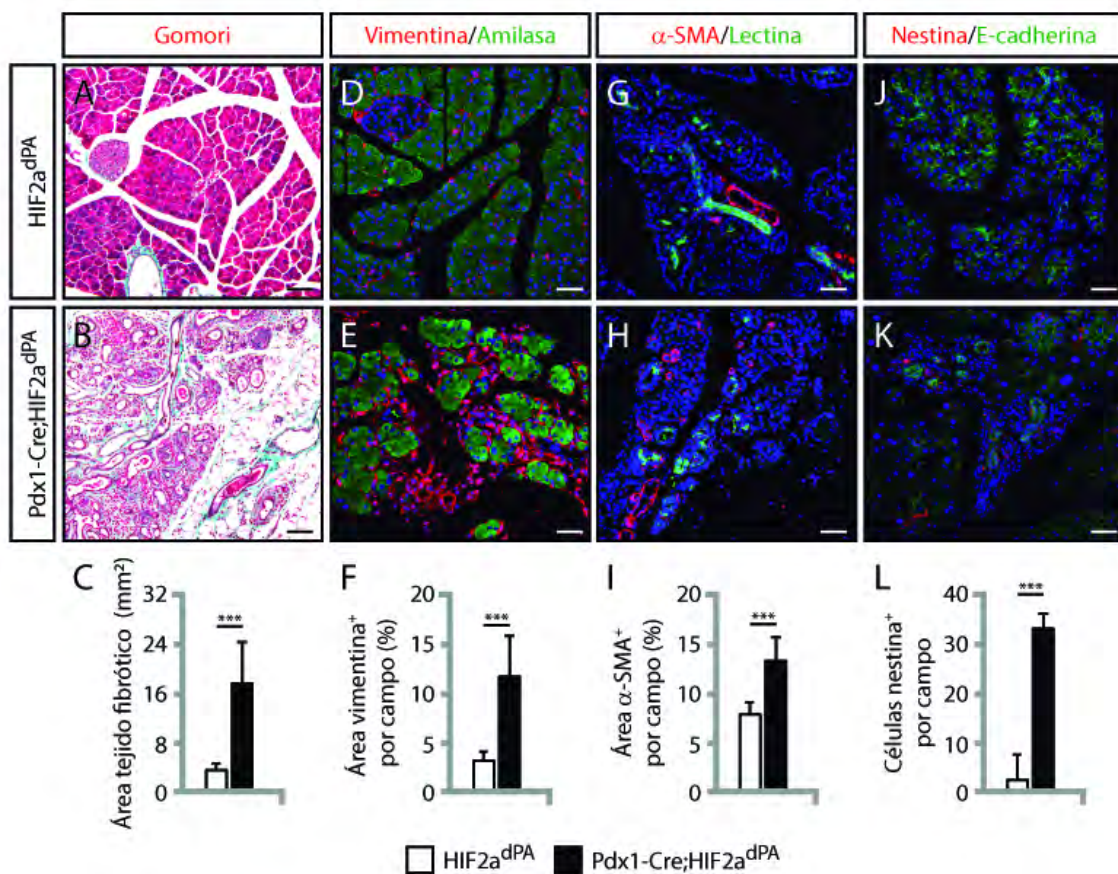


Figura R8. La estabilización de HIF-2 α induce defectos histológicos similares a los asociados a pancreatitis. (A-B) Tinción tricrómica de Gomori en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. (C) Cuantificación del área tejido fibrótico detectado en las secciones de páncreas a 8 semanas de edad. (D, E) Análisis de inmunofluorescencia de vimentina en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. Se detectaron pocas células positivas para vimentina en los páncreas de ratones controles. (F) Cuantificación del área total de señal positiva para vimentina en las secciones de páncreas a 8 semanas de edad. (G, H) Inmunofluorescencias de α -SMA en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. (I) Cuantificación del área total de señal positiva para α -SMA en las secciones de páncreas a 8 semanas de edad. (J, K) Inmunofluorescencias de nestina en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. (L) Cuantificación del número total de células positivas para nestina por campo de secciones de páncreas a 8 semanas de edad. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. *** $P \leq 0.001$.

Las células inflamatorias juegan un papel crucial en la inducción del daño tisular y en el mantenimiento de la fibrosis. El análisis inmunohistoquímico mostró un incremento de células inflamatorias en el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, intercalándose entre el tejido fibrótico. Se observó un aumento del número de células positivas para el marcador de leucocitos CD11b (que incluye macrófagos, neutrófilos y granulocitos; Fig. R9A-C), y el marcador específico de macrófagos F4/80 (Fig. R9D-F).

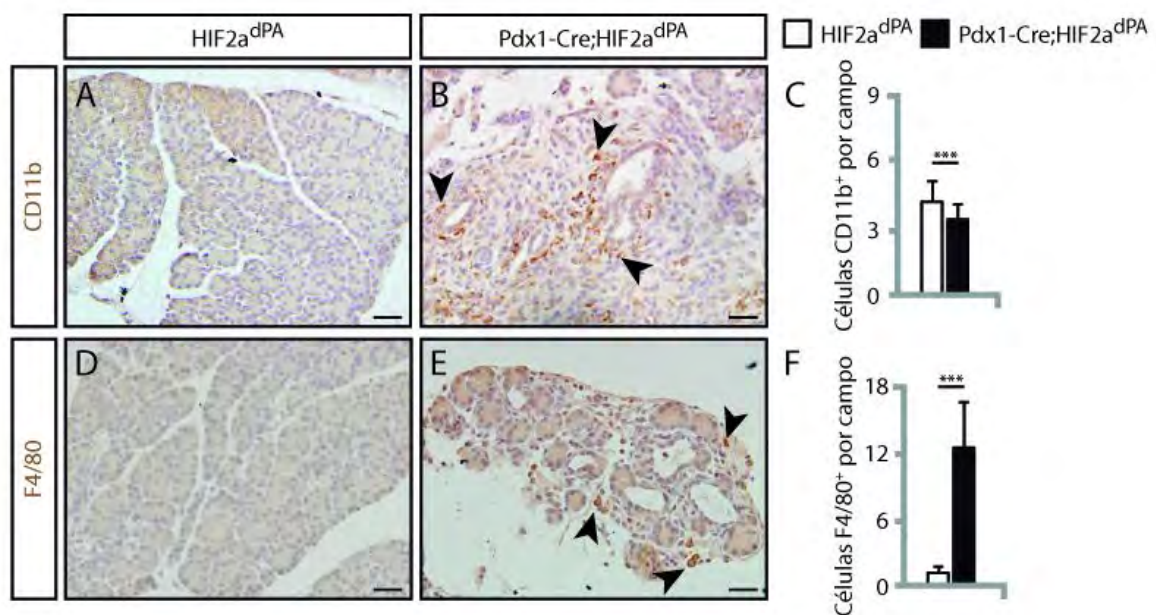


Figura R9. Aumento de células inflamatorias en el tejido pancreático de ratones con estabilización de HIF-2 α . (A, B) Inmunohistoquímica con el marcador específico de leucocitos, CD11b, en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. (C) Cuantificación del número total de células positivas para CD11b por campo en secciones de páncreas a 8 semanas de edad. (D, E) Inmunohistoquímica con el marcador específico de macrófagos, F4/80, en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. (F) Cuantificación del número total de células positivas para F4/80 por campo en secciones de páncreas a 8 semanas de edad. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. *** $P \leq 0.001$.

Estos resultados en su conjunto muestran que la activación de HIF-2 α causa fibrosis y un incremento en la infiltración de diferentes subpoblaciones de células del sistema inmune, relacionadas con un estadio inflamatorio del páncreas en ratones adultos. Todos estos rasgos histológicos son similares a los que se encuentran en pancreatitis.

5. Incremento de apoptosis y de proliferación en células acinares en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos

Para analizar las causas moleculares que causan la pérdida de tejido acinar, evaluamos en primer lugar la proliferación celular y apoptosis en el tejido exocrino pancreático. En individuos neonatos (PO) no se observaron diferencias significativas en los niveles de proliferación celular entre el epitelio pancreático de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y el de ratones controles (Fig. R10A-C). Cabe señalar que la proliferación celular detectada en páncreas de individuos controles era relativamente elevada, propio de una etapa posnatal tan temprana⁴⁵. Tampoco se detectaron a estas edades diferencias en los niveles de apoptosis celular (Fig. R10D-F), aunque hay que señalar que el número de células positivas para el marcador de apoptosis, la caspasa-3 escindida, fue muy bajo en todos los grupos analizados.

Sin embargo, a las 2 semanas de edad, cuando el fenotipo de pancreatitis ya es evidente, se observó un aumento significativo tanto de células proliferativas (positivas para Ki67; Fig. R11A-C) como de células apoptóticas (Fig. R11D-F) en el tejido exocrino de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. A pesar de que el tejido pancreático se encontraba muy reducido, en los reductos de tejido exocrino compacto se podían hallar estos fenómenos de hiperproliferación y apoptosis. Inmunohistoquímicas dobles del marcador de proliferación Ki67 junto a amilasa o KRT19, confirmaron que la hiperproliferación no solo se ceñía a células acinares (Fig. R11G-I) sino que también se detectaba en células ductales (Fig. R11J-L). Por otra parte, se confirmó el aumento de apoptosis en células acinares

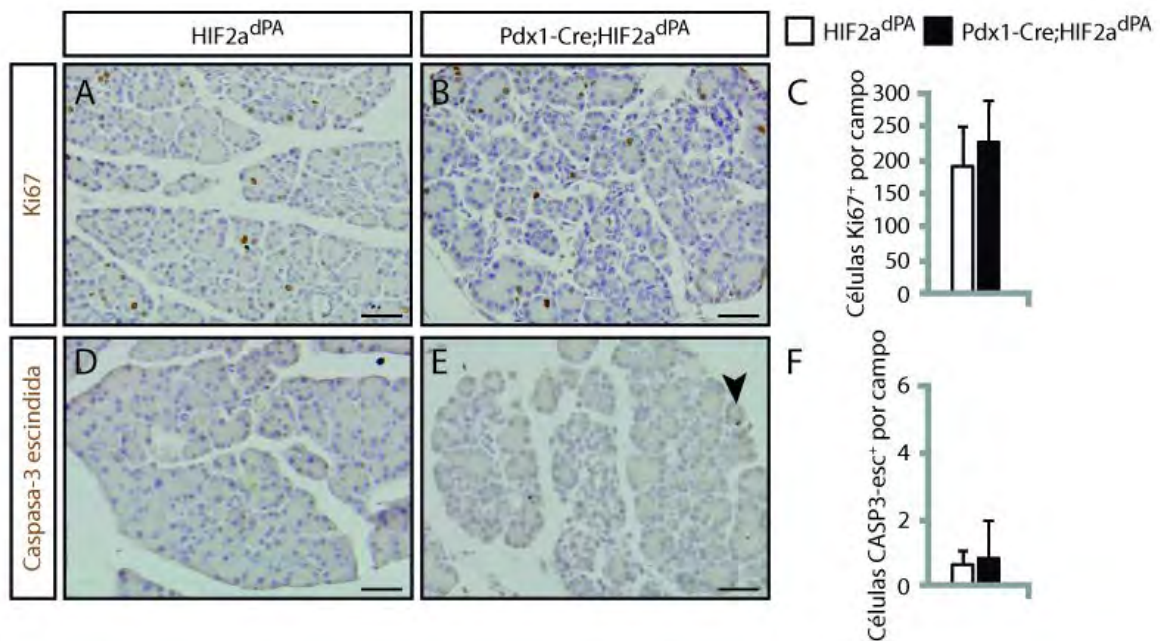


Figura R10. Análisis de la proliferación y apoptosis en páncreas con sobreexpresión de HIF-2 α a PO. (A, B) Inmunohistoquímica del marcador proliferativo Ki67 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a PO. (C) Cuantificación del número total de células positivas para Ki67 por campo en secciones de páncreas de ratones a PO. (D, E) Análisis inmunohistoquímico del marcador específico de células en apoptosis, caspasa-3 escindida, en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a PO. (F) Cuantificación del número total de células positivas para caspasa-3 escindida por campo en secciones de páncreas de ratones a PO. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar.

de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* tras cuantificar las células que colocalizaban con un marcador de células acinares (amilasa) con un marcaje positivo para el ensayo TUNEL (Fig. R11M-O). La técnica TUNEL permite la detección de núcleos de células apoptóticas, incluso aquellas que se encuentran en estadios iniciales de marginación cromatinica. Es importante señalar que en el epitelio pancreático de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* no se detectaron células apoptóticas que no fueran de naturaleza acinar.

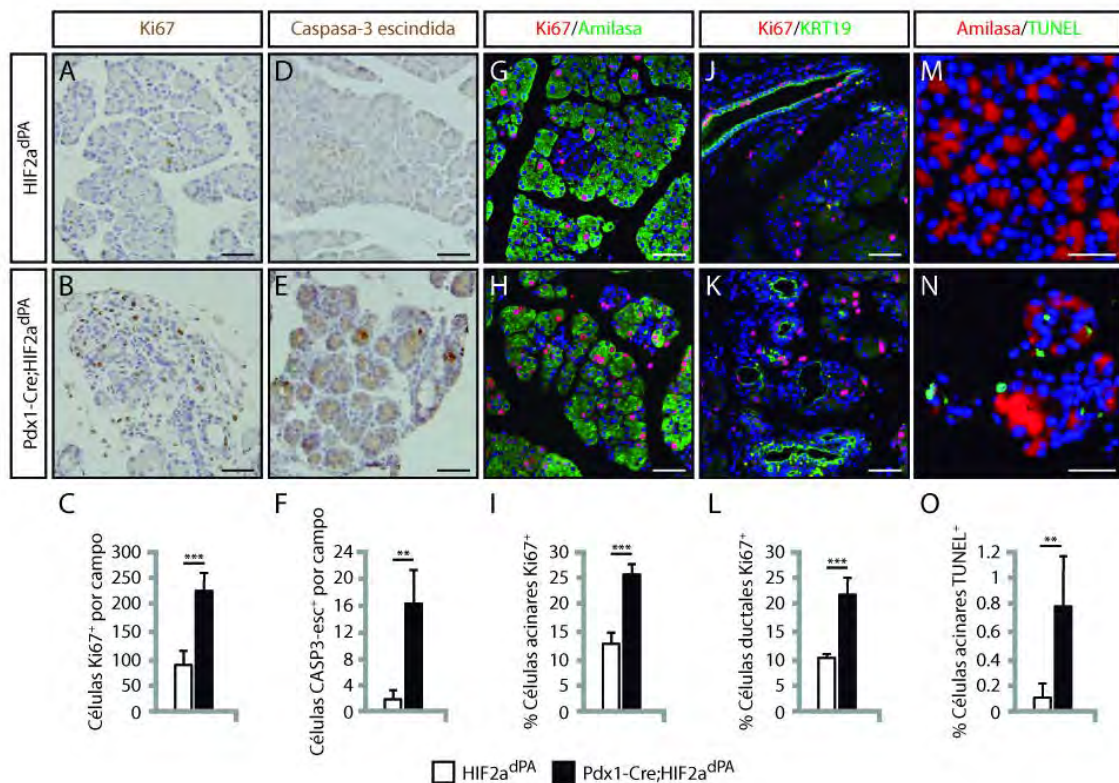


Figura R11. Incremento de la proliferación y de la apoptosis en el páncreas de ratones con sobreexpresión de HIF-2 α a 2 semanas de edad. (A, B) Inmunohistoquímica del marcador proliferativo Ki67 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (C) Cuantificación del número total de células positivas para Ki67 por campo en secciones de páncreas de ratones a 2 semanas de edad. (D, E) Análisis inmunohistoquímico del marcador específico de células en apoptosis, caspasa-3 escindida, en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (F) Cuantificación del número total de células positivas para caspasa-3 escindida por campo en secciones de páncreas de ratones a 2 semanas de edad. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Análisis de las inmunofluorescencias dobles de Ki67 con amilasa, un marcador específico de células acinares, (G, H), y KRT19, un marcador específico de células ductales, (J, M). (I, L) Cuantificación del porcentaje total de células positivas para Ki67 que colocalizan con amilasa (I) o con KRT19 (L) en secciones de páncreas de ratones

a 2 semanas de edad. (M, N) Inmunofluorescencia resultante de la utilización del kit TUNEL junto al anticuerpo amilasa en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (O) Cuantificación del porcentaje total de células positivas para TUNEL que colocalizan con amilasa en páncreas a 2 semanas de edad. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar y cuantificar el número de células pancreáticas totales. Barras de escala, 100 μm . Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

El estudio cuantitativo de proliferación y apoptosis no se extendió a ratones de edades más avanzadas debido a que la pancreatitis había progresado notablemente en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y casi la totalidad del epitelio pancreático había desaparecido. Sin embargo, un análisis cualitativo en ratones de 8 semanas de edad, confirmó que, en los pocos remanentes de tejido exocrino conservado, seguían activos los procesos de proliferación (Fig. R12A, B) y apoptosis (Fig. R12C, D).

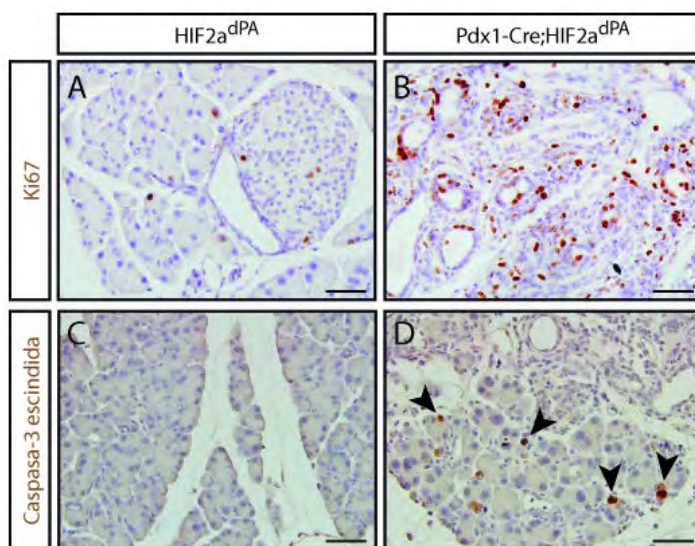


Figura R12. Análisis de la proliferación y apoptosis en páncreas con sobreexpresión de HIF-2 α a 8 semanas de edad.

(A, B) Inmunohistoquímica del marcador proliferativo Ki67 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (C, D) Análisis inmunohistoquímico del marcador específico de células en apoptosis, caspasa-3 escindida, en secciones de páncreas de ratones controles

y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. Las flechas negras en (D) indican las células acinares positivas para caspasa-3 escindida en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 8 semanas de edad. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Barras de escala en A-D, 100 μm .

Estos resultados confirman que el fenotipo de pancreatitis producido por la estabilización de HIF-2 α no es debido a defectos durante el desarrollo embrionario, sino a alteraciones que tienen lugar durante etapas posnatales tempranas. Además, la activación ectópica de HIF-2 α produce un aumento significativo de la proliferación en células acinares y ductales y un aumento de la apoptosis específicamente en células acinares.

6. La acumulación de HIF-2 α induce la activación postranscripcional de c-Myc y promueve cambios en la expresión de controladores del ciclo celular

Se han descrito diferentes mecanismos descritos a través de los cuales HIF-2 α puede inducir la proliferación celular²²³. Uno de estos mecanismos, que media HIF-2 α pero no la isoforma HIF-1 α , es la modulación transcripcional de la actividad del protooncogén *C-MYC*²²⁴. Para examinar la acumulación de c-Myc en el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* se realizó un estudio inmunohistoquímico en ratones de 2 semanas de edad. La inmunohistoquímica para c-Myc mostró una clara acumulación nuclear en células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R13B) mientras que en ratones *HIF2dPA* los niveles eran prácticamente indetectables (Fig. R13A). Además, se detectaron células con niveles de expresión de c-Myc moderados en el epitelio de las lesiones túbulo-ductales en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R13B). Curiosamente, se observó un aumento de acumulación de c-Myc en células localizadas en el estroma y el tejido fibrótico, rodeando las zonas más afectadas del tejido exocrino de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, donde se encuentran las lesiones túbulo-ductales (Fig. R13B).

Se ha descrito que HIF-2 α puede acelerar la progresión en el ciclo celular inhibiendo indirectamente la expresión de diferentes genes de ciclo celular como los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p21 y p27²²⁴. El análisis del patrón de expresión de p21 mostró abundante expresión en áreas con células acinares intactas en el páncreas adulto de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R13D) mientras que en el tejido control apenas había expresión de p21 en

ningún compartimento del páncreas (Fig. R13C). Contrastando con la alta expresión de p21 detectada en células acinares, las regiones con lesiones ADM en los ratones de *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostraban una expresión reducida, con un número de células positivas muy limitado (Fig. R13D).

Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico para p27 en páncreas controles, mostró el patrón esperado según estudios previos, observándose una expresión clara en células del epitelio ductal, células centroacinares y células endocrinas, mientras que en células acinares se expresaba de forma heterogénea (Fig. R13E). Ni el nivel de expresión ni la localización intracelular de la proteína p27 mostraron alteraciones significativas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R13F) en los compartimentos donde se expresa basalmente p27. El epitelio de las lesiones ADM presentaba un marcaje positivo para p27 (Fig. R13F), a un nivel de expresión similar al encontrado en células ductales controles (Fig. R13E).

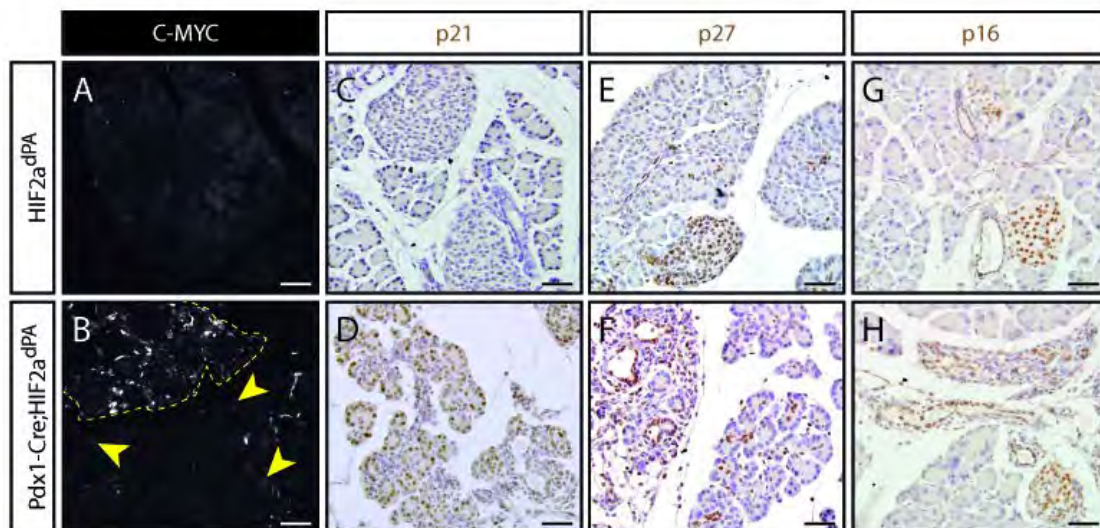


Figura R13. La activación de HIF-2 α en progenitores pancreáticos induce la activación de c-Myc y produce cambios en los niveles de reguladores del ciclo celular. (A, B) Inmunofluorescencia de c-Myc en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se ha representado el canal específico de la señal fluorescente de manera binaria para facilitar su observación. La señal positiva aparece en blanco. La línea amarilla discontinua delimita una región afectada con múltiples lesiones ADM. Las flechas amarillas indican las células acinares que muestran expresión nuclear de c-Myc. Análisis inmunohistoquímicos de los inhibidores de quinasas dependiente de ciclinas, p21 (C, D), p27 (E, F) y p16 (G, H) en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Barras de escala en, 100 μ m.

Se ha descrito en estudios previos que p16, otro inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, está relacionado con patologías neoplásicas asociadas a pancreatitis crónica en humanos^{225,226}. En ratones controles, observamos una expresión marcada de p16 en islotes pancreáticos y en células ductales (Fig. R13G). El patrón de expresión de p16 no mostraba cambios sustanciales en el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R13H), ni en el compartimento endocrino ni en el epitelio ductal. Tampoco se observó aumento de p16 en los remanentes de células acinares bien conservadas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Las lesiones ADM mostraban una robusta acumulación de p16 (Fig. R13H), de igual manera que las células ductales controles (Fig. R13G).

Estos resultados muestran que, tras la estabilización de HIF-2 α , se induce una activación del factor de transcripción c-Myc en el parénquima pancreático de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Además, la sobreexpresión de HIF-2 α tiene efectos sobre los reguladores del ciclo celular, alterando la acumulación del inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas p21, pero no de p27 y p16.

7. Remodelación de la morfología de los acinos pancreáticos tras la sobreexpresión de HIF-2 α

Las células acinares pancreáticas sintetizan y secretan enzimas digestivas hacia el lumen central de los acinos que se encuentra conectado a una red interconectada de conductos. Una característica fundamental asociada a la correcta función del tejido acinar pancreático es la polaridad de las células acinares que componen los acinos. Así, las células acinares tienen el núcleo en la región basal y los gránulos de zimógeno se localizan en la zona apical del citoplasma. Analizamos la polaridad apical-basal de las células acinares examinando múltiples marcadores de polaridad celular en páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad.

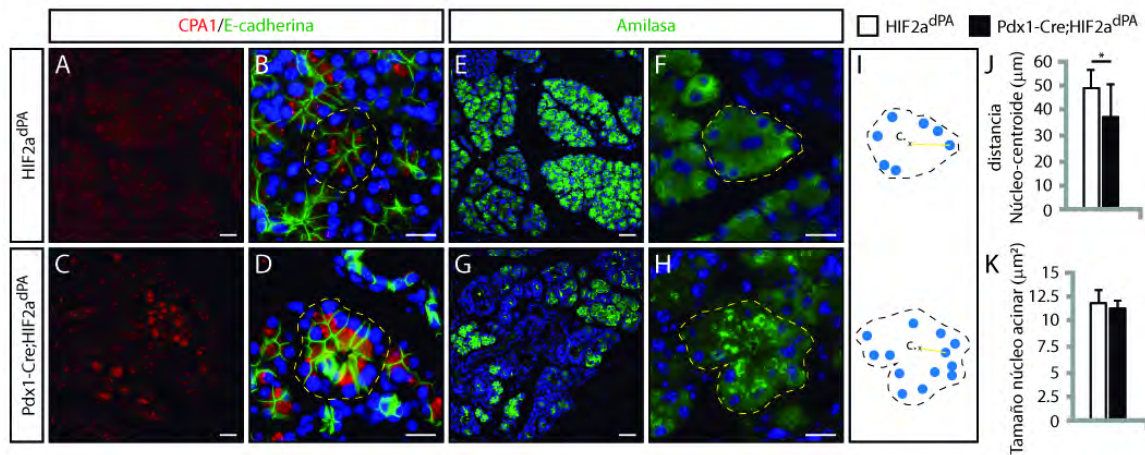


Figura R14. La estabilización de HIF-2 α en progenitores pancreáticos afecta a la identidad y la polaridad de las células acinares. (A, C) Imágenes de inmunofluorescencia con baja magnificación usando el marcador específico de célula acinar CPA1 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (B, D) Imágenes con alta magnificación de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostrando en detalle acinos pancreáticos teñidos con CPA1 junto al marcador de membrana basolateral, E-cadherina, para delimitar visualmente la morfología acinar. (E-H) Imágenes de inmunofluorescencia de amilasa en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se muestran imágenes con baja magnificación (E, G) e imágenes con alta magnificación mostrando en detalle los acinos pancreáticos (F, H). La línea amarilla discontinua delimita un acino pancreático independiente. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala en A, C, E, G, 100 μm ; en B, D, F, H, 20 μm . (I) Esquema representativo de la metodología utilizada en la cuantificación de la distancia entre el centroide acinar y el núcleo de cada célula acinar que compone el acino (J). La línea negra discontinua determina el perímetro de un acino representativo. La línea amarilla marca la distancia centroide-núcleo. Los núcleos se han representado en el diagrama como circunferencias azules. c. = centroide. (K) Cuantificación del tamaño medio de los núcleos de las células acinares que conforman los acinos de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. * $P \leq 0.05$.

Para visualizar los gránulos de zimógenos en células acinares, utilizamos dos anticuerpos que reconocen de manera específica las enzimas pancreáticas, carboxipeptidasa (CPA1) y amilasa. En células acinares controles, la CPA1 (Fig. R14A-D) y la amilasa (Fig. R14E-H) se concentran en la porción apical del citoplasma en zonas cercanas al lumen del acino. En la células acinares de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad observamos una disminución de los niveles de estas dos enzimas (Fig. R14C, G). Más llamativo aún, tanto CPA1

como la amilasa no mostraban una clara localización apical en las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R14D, H) a diferencia de los individuos controles (Fig. R14B, F). Otro rasgo morfológico distintivo de los acinos pancreáticos normales es la localización basal de los núcleos celulares (Fig. R14B, F). Sin embargo, en las células acinares que superproducían HIF-2 α , los núcleos aparecían parcialmente desorganizados, más cercanos a la porción apical (Fig. R14D, H). Se realizó una cuantificación más precisa midiendo las distancias de los núcleos al centroide de los acinos pancreáticos (Fig. R14I). Estos estudios confirmaron que en las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, los núcleos se localizaban a menores distancias del centroide acinar que en células acinares de ratones controles (Fig. R14I, J). En otras palabras, los núcleos habían perdido su localización basal. A pesar de estas alteraciones en la localización del núcleo celular, no se detectaron cambios en el tamaño del núcleo de las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R14K).

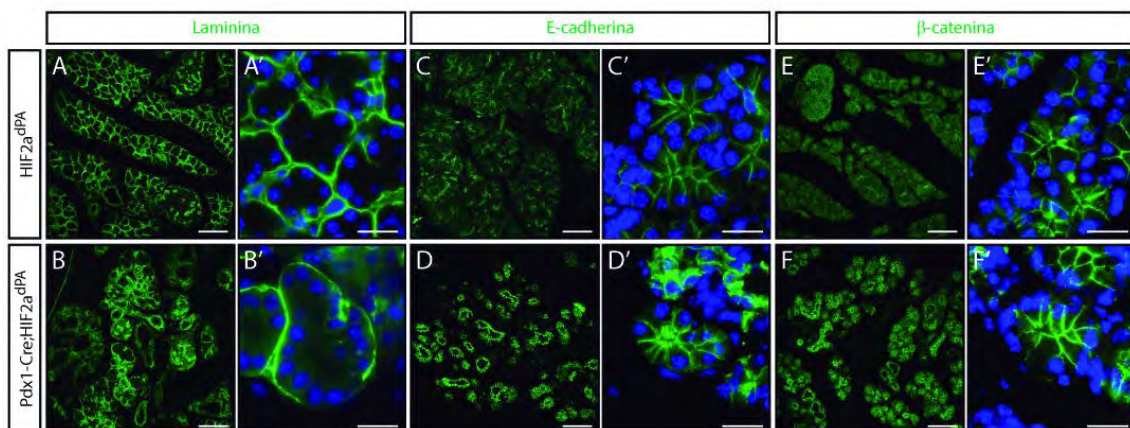


Figura R15. La activación de HIF-2 α no altera la localización de marcadores de membrana de células acinares. (A, B) Inmunofluorescencia de laminina en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (A', B') Imagen aumentada mostrando en detalle acinos pancreáticos teñidos con laminina. (C, D) Inmunofluorescencia de E-cadherina en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (C', D') Imagen de alta magnificación mostrando con detalle acinos pancreáticos teñidos con E-cadherina. (E, F) Inmunofluorescencia de β -catenina en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (E', F') Imagen aumentada mostrando con detalle acinos pancreáticos teñidos con β -catenina. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala en A, B, C, D, 100 μ m; en A', B', C', D', 20 μ m.

El análisis de la localización de marcadores de membrana basal como la laminina (Fig. R15A, B) y marcadores de membrana basolateral como la E-cadherina (Fig. R15C, D) y la β -catenina (Fig. R15E, F), no revelaron alteraciones sustanciales, manteniendo una localización bien definida en células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, al igual que en individuos controles (Fig. R15A, C, E). β -catenina es un factor de transcripción activador de la ruta canónica Wnt, que participa en la regulación de la diferenciación y regeneración de las células acinares^{227,228}. Además, se ha establecido una relación entre HIF-2 α y la actividad de β -catenina en neoplasias intraductales pancreáticas²⁰⁸. Aunque no observamos grandes cambios en el patrón de acumulación celular de β -catenina, el estudio cuantitativo mediante microscopía confocal mostró un aumento en la intensidad general de β -catenina en las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R16B, C) respecto a los individuos controles (Fig. R16A, C). Sin embargo, la cuantificación intracelular (Fig. R16D, E) de β -catenina confirmó que no había relocalización intracelular de la proteína, manteniendo un patrón eminentemente membranoso en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R16E) al igual que en las células acinares de individuos controles (Fig. R16D). Además, los estudios de *western blots* no mostraban un aumento de β -catenina total (Fig. R16F, G).

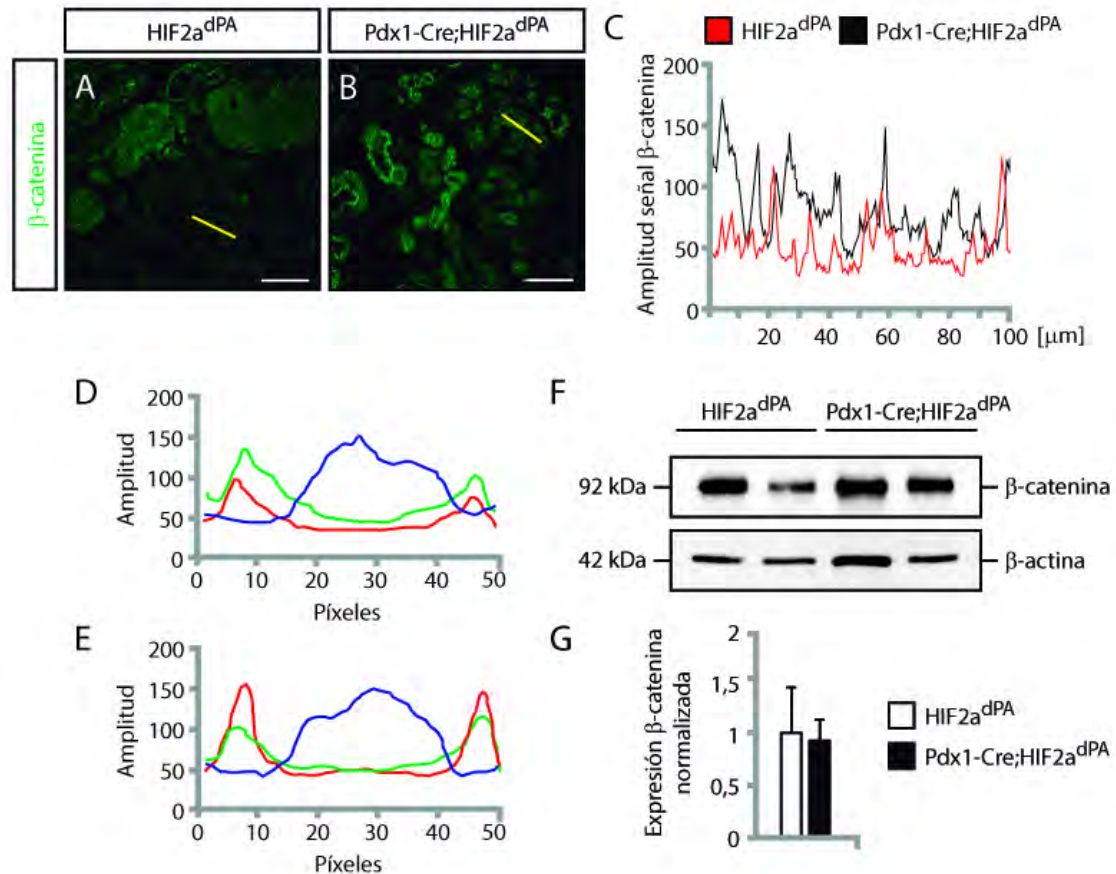


Figura R16. La sobreexpresión de HIF-2 α no produce la deslocalización de β -catenina en células acinares adultas. (A, B) Análisis confocal de β -catenina en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. La línea amarilla indica el segmento de tejido exocrino cuya amplitud de señal ha sido analizada. Barras de escala, 100 μ m. (C) Cuantificación de la amplitud de la señal de β -catenina detectada en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (D, E) Cuantificación de la localización intracelular de β -catenina en células acinares. Se ha utilizado E-cadherina (en verde) como marcador de membrana estable y DAPI como marcador de los núcleos celulares (en azul). Se analizó la amplitud de la señal de cada marcador sobre un segmento de 50 μ m que incluyese la totalidad de una célula acinar. (F) Nivel de expresión proteica de β -catenina en ratones controles y en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* detectado mediante *western blot*. Se muestran extractos proteicos de 2 individuos independientes de 2 semanas de edad para cada genotipo. Se utilizó α -tubulina como control de carga. (N) Cuantificación de los niveles de expresión de β -catenina normalizados. Los datos se han representado como la media \pm SEM.

El análisis de la polaridad celular se completó con la evaluación de marcadores que se localizan preferentemente en la región apical celular, la proteína mucina-1, la proteína de unión *zonula occludens 1* (ZO-1) y la proteína quinasa PKC ϵ . En ratones controles *HIF2dPA*, todas estas proteínas se localizan exclusivamente en la zona apical de las células acinares (Fig. R17A, C, E). Sin embargo, en células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* todos estos marcadores apicales mostraban alteraciones significativas. Así, la inmunofluorescencia de mucina-1 reveló dilataciones del lumen en la región centroacinar de los acinos *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R17B) comparado con los pequeños lúmenes de los acinos controles (Fig. R17A). Además, se observó una acumulación en la zona citoplasmática apical muy acusada. La visualización de ZO-1 confirmó las dilataciones de los lúmenes intracinares (Fig. R17D). Por otro lado, PKC ϵ , aunque mantenía cierta localización apical, se localizaba por todo el citoplasma de las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R17F). Es importante señalar que este fenómeno, la translocación de PKC ϵ de la membrana al citoplasma, está asociado en la activación intracelular de enzimas digestivas²²⁹.

Por tanto, todos estos resultados indican que la estabilización de HIF-2 α en células acinares afecta a la estructura de los acinos pancreáticos, donde destaca una marcada dilatación del lumen centroacinar y una deslocalización de marcadores apicales, mientras que los marcadores celulares basales o basolaterales aparecen correctamente distribuidos.

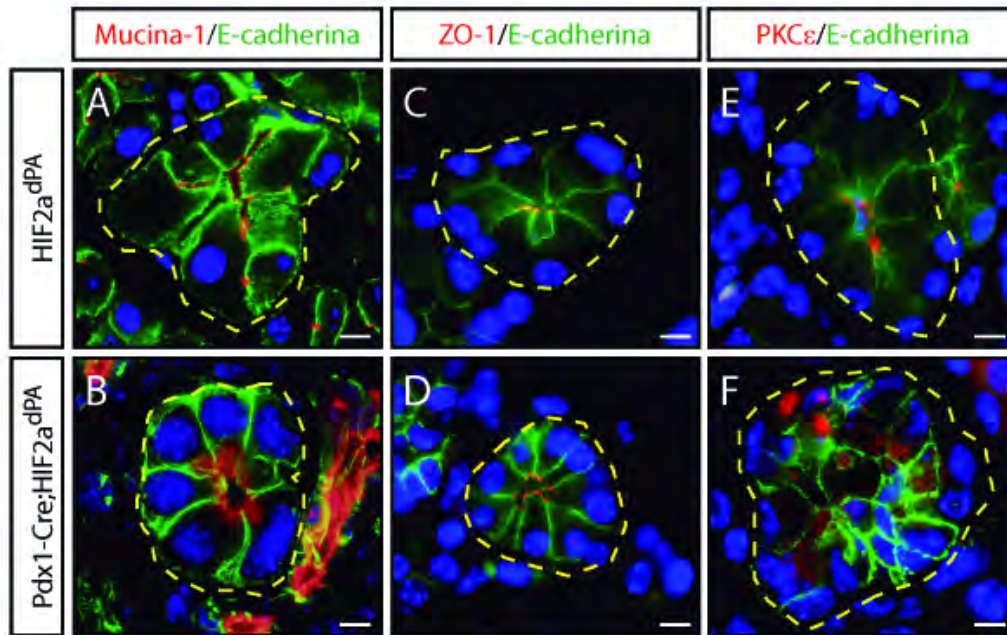


Figura R17. Las células acinares de páncreas con sobreexpresión de HIF-2 α muestran defectos en la polaridad apical-basal. Inmunofluorescencias de marcadores específicos de la región apical de los acinos pancreáticos como mucina-1 (A, B), ZO-1 (C, D) y PKC ϵ (E, F) en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se utilizó el anticuerpo E-cadherina (en verde) para marcar la membrana de las células acinar y facilitar su análisis. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 20 μ m.

8. Los páncreas con sobreexpresión de HIF-2 α muestran alteraciones en el endotelio vascular y activación de genes relacionados con angiogénesis

HIF-2 α juega un papel importante en etapas de postvasculogénesis y es necesario para la remodelación de la red vascular primaria y para el desarrollo de un sistema vascular funcional²³⁰. Para analizar la vascularización de los páncreas *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se realizó un análisis inmunohistoquímico con el marcador de células endoteliales MECA-32 (Fig. R18A, B). Se cuantificó el número total de vasos sanguíneos en secciones de tejido para determinar la densidad de la vasculatura pancreática. Los individuos *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostraban un incremento muy significativo de la densidad vascular relativa pancreática (Fig. R18C). Este aumento venía determinado por el incremento del tamaño de

los vasos sanguíneos (Fig. R18D) ya que el número de vasos sanguíneos era similar en páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y controles *HIF2dPA* (Fig. R18E). En consonancia con el incremento de vascularización, observamos un aumento de expresión del gen *VEGF* a nivel de ARNm en los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R18F). Hay que señalar que este gen es una de las principales dianas activadas por HIF-2 α en un contexto proangiogénico²³¹.

Un aspecto llamativo que reveló la visualización de la vascularización del páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* fue la presencia de las células endoteliales rodeando las lesiones pancreáticas con características de estructuras ductales tubulares (Fig. R18I, J). Este tipo de lesiones, túbulos o pequeños quistes de células epiteliales con características ductales rodeadas por células endoteliales, se asemejan histológicamente a las lesiones quísticas pancreáticas encontradas en los pacientes con enfermedad de VHL²⁰¹.

En resumen, la acumulación de HIF-2 α produce un aumento de la vascularización en páncreas adultos y activa la expresión de genes diana relacionados con eventos proangiogénicos.

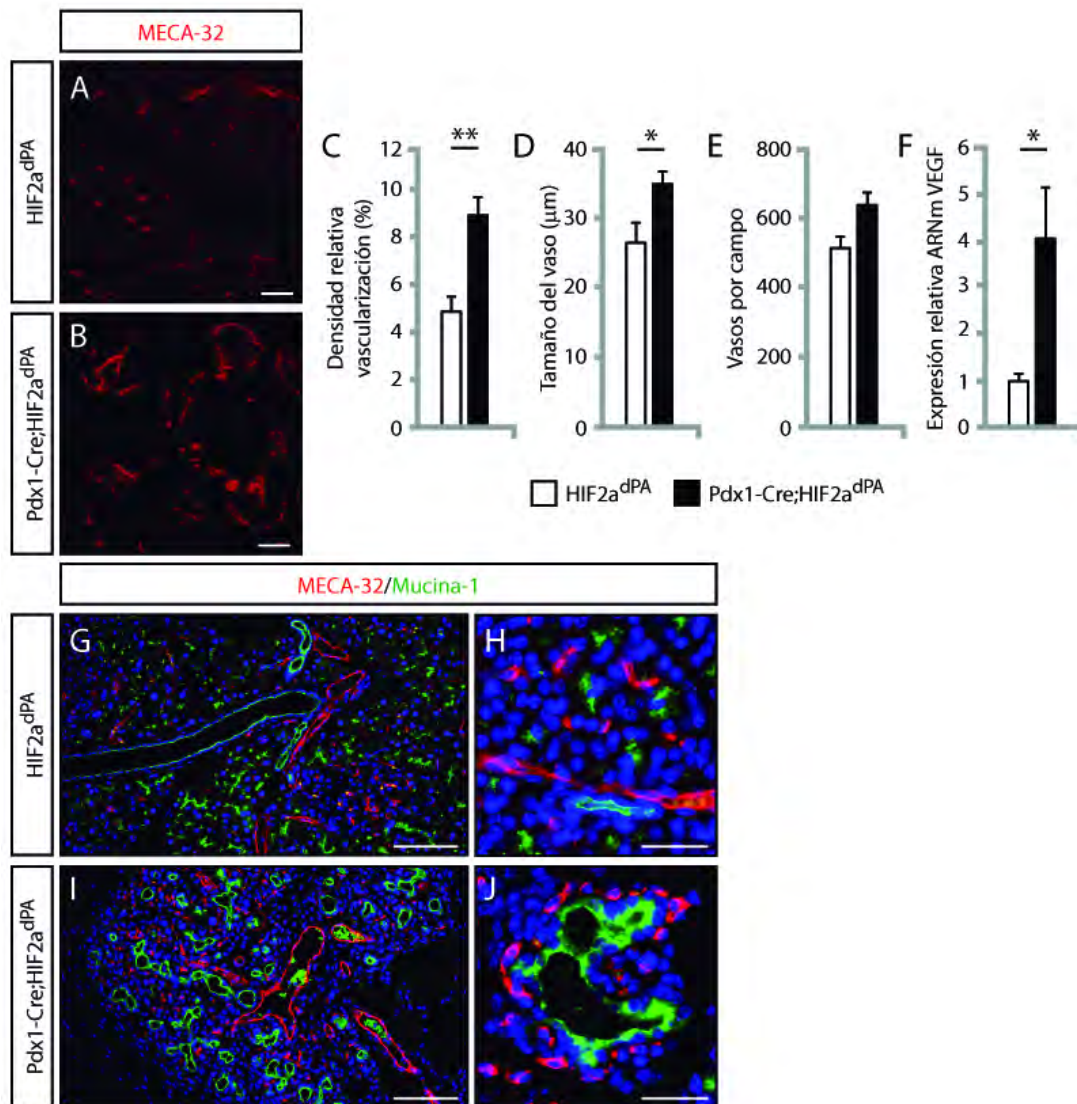


Figura R18. La acumulación de HIF-2 α produce un aumento de la vascularización en páncreas adultos. (A, B) Análisis de inmunofluorescencia de MECA-32 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Representación de las cuantificaciones del porcentaje de densidad vascular respecto a área pancreática (C), del tamaño de los vasos sanguíneos (D) y del número de vasos sanguíneos por campo (E) de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y ratones controles *HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (F) Análisis por qPCR de los niveles de expresión relativos de *VEGF* de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad, normalizados al nivel medio de expresión de los individuos controles analizados (n=3 por genotipo). Los datos se han representado como la media \pm SEM. (G-J) Ensayos de inmunofluorescencia con el marcador endotelial MECA-32 y el marcador ductal, mucina-1, en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Las imágenes a baja magnificación (G, I) muestran el aumento del tejido endotelial en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. (J) Detalle de las lesiones pancreáticas detectadas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* donde se observan células endoteliales (MECA-32; en rojo) rodeando el epitelio de naturaleza ductal (mucina-1; en verde). Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala en A, B, G, I, 100 μ m; en H, J, 20 μ m. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

9. Caracterización de las lesiones encontradas en el tejido exocrino de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos

La mayoría de las lesiones pancreáticas encontradas en pacientes VHL son de naturaleza quísticas e incluyen desde simples quistes a adenomas microquísticos serosos²³². Histológicamente, estas lesiones quísticas tienen un marcado componente estromal y una abundante presencia de células endoteliales²⁰¹. Como se ha mencionado en el apartado anterior, estas características histológicas son similares a las lesiones túbulo-ductales de los páncreas *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Otra característica de los adenomas microquísticos serosos asociados a la enfermedad de VHL es la ausencia de estructuras papilares y de componentes mucinosos. Esto permite diferenciar estas lesiones de otras neoplasias quísticas pancreáticas.

Para determinar si existen estructuras papilares productoras de mucinas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* se realizaron diferentes tinciones histológicas en ratones de 15 días de edad. Las estructuras túbulo-ductales de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* no mostraban una acumulación de mucinas significativa, como revelaron las tinciones con azul alcian (Fig. R19A, B) y PAS (*Periodic Acid-Schiff*) (Fig. R19C, D). Las células epiteliales expresaban marcadores típicos de células ductales como KRT19 (Fig. R19E, F) o la lectina DBA (aglutinina *Dolichos biflorus*; Fig. R19G, H). La pérdida de cilios primarios es una característica diferencial de lesiones neoplásicas intraepiteliales pancreáticas (PanIN) o de células cancerosas del páncreas²³³. Las lesiones túbulo-ductales de los páncreas *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R19J) tenían cilios primarios al igual que los ductos controles (Fig. R19I), confirmando, por tanto, su naturaleza benigna.

Por lo tanto, los resultados obtenidos de la caracterización de las lesiones ADM encontradas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* permiten afirmar que la estabilización de HIF-2 α provoca lesiones pancreáticas similares histológicamente a las descritas en los páncreas de pacientes VHL.

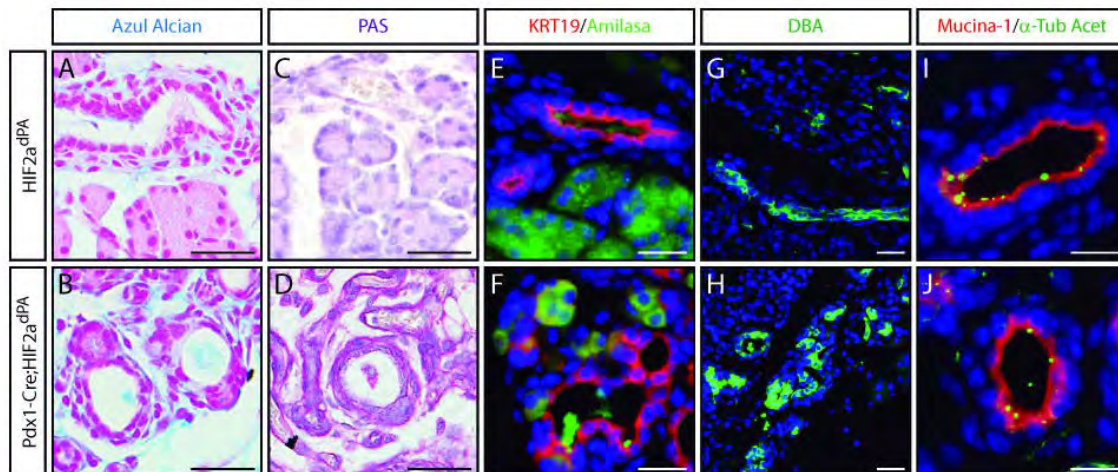


Figura R19. Caracterización de las lesiones ADM observadas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos. (A, B) Tinción con azul alcian, contrateñida con NFR, y tinción PAS (C, D), contrateñida con hematoxilina, en páncreas controles y *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (E, F) Análisis de inmunofluorescencia de KRT19 y amilasa en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. (G, H) Inmunofluorescencia de lectina DBA (aglutinina *Dolichos biflorus*) en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. (I, J) Inmunofluorescencia con α -tubulina acetilada para teñir los cilios primarios. Se utilizó mucina-1 (en rojo) para marcar el epitelio ductal. Las lesiones ADM de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (J) presentan cilios primarios al igual que los conductos de los ratones controles (I). Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m.

10. La estabilización de HIF-2 α afecta a la identidad de las células acinares adulta induciendo un proceso de desdiferenciación hacia un estado progenitor

Se ha descrito en la literatura que las células acinares, tras daño o en presencia de algún factor prooncogénico, pueden sufrir un proceso de pérdida de identidad celular, disminuyendo la expresión de genes específicos de la fase adulta y aumentando la expresión de genes que normalmente se expresan solo durante el desarrollo embrionario. Este proceso, denominado desdiferenciación, se caracteriza por la reactivación de factores transcripcionales y de rutas moleculares típicas de células progenitoras embrionarias pancreáticas^{76,234}. Para

determinar si estos fenómenos de dediferenciación estaban ocurriendo en células acinares tras la estabilización ectópica de HIF-2 α , se estudió la expresión de factores de transcripción propios de células progenitoras pancreáticas como Sox9 o Pdx1, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Tal y como se ha descrito en la literatura, en ratones controles *HIF2dPA* neonatos, la expresión de Sox9 se localiza principalmente en células centroacinares y en una subpoblación de células ductales (Fig. R20A), pero no se observa en células acinares (Fig. R20B). Sin embargo, en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se observó un aumento drástico de los niveles de Sox9 tanto en regiones donde el tejido acinar se encuentra desorganizado como en las lesiones ADM bien definidas (Fig. R20B). Por otro lado, en la etapa juvenil analizada (15 días) la expresión de Pdx1 se restringe casi exclusivamente a islotes pancreáticos. Este fue el patrón que observamos en ratones en ratones controles *HIF2dPA* (Fig. R20C). Sin embargo, en páncreas de ratones transgénicos *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, Pdx1 se acumula de una forma muy notable en las células acinares que componen los acinos desorganizados (Fig. R20D). Además, se observaron células positivas para Pdx1 tanto en el tejido ductal como en el epitelio de las lesiones ADM (Fig. R20D). Como era de esperar, también observamos una expresión muy fuerte de Pdx1 en islotes de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (Fig. R20D), al igual que en islotes controles (Fig. R20C).

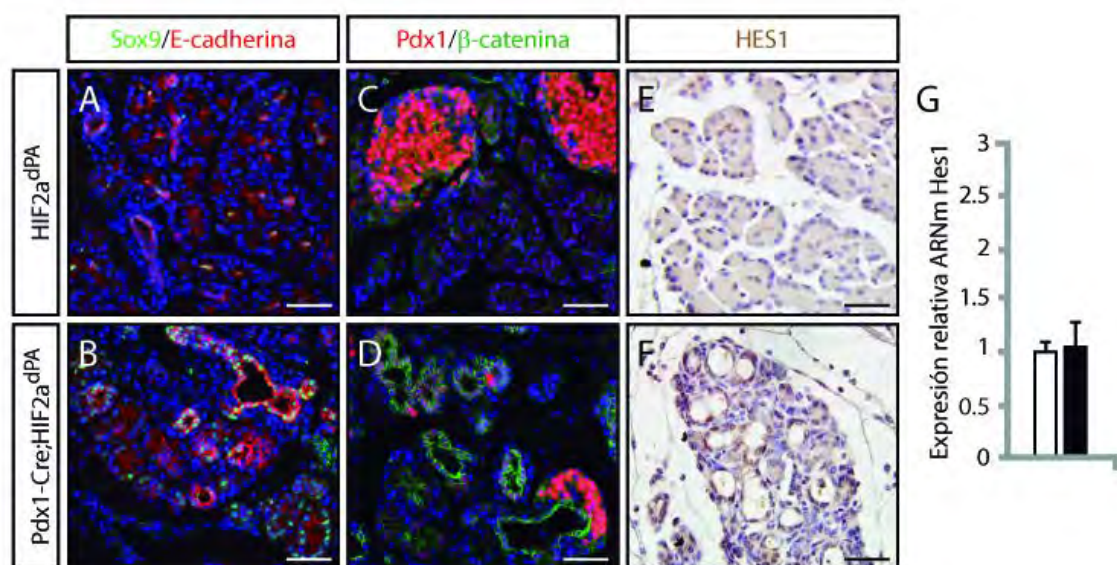


Figura R20. La activación ectópica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos induce un proceso de desdiferenciación de células acinares hacia un estado progenitor. (A, B) Análisis de inmunofluorescencia de Sox9 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se utilizó E-cadherina (en rojo) para marcar el epitelio pancreático. (C, D) Inmunofluorescencia de Pdx1 en tejido pancreático de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se utilizó β -catenina (en verde) para marcar el tejido pancreático y las células del epitelio de las lesiones túbulo-ductales. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. (E, G) Inmunohistoquímica de Hes1 en páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m. (G) Representación gráfica de los niveles de expresión relativos de *HES1* de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad detectados mediante qPCR, normalizados al nivel medio de expresión de los individuos silvestres analizados (n=3 por genotipo). Los datos se han representado como la media \pm SEM.

La ruta de señalización Notch, en el páncreas, es necesaria durante el desarrollo embrionario²³⁵ y es fundamental para el mantenimiento de la identidad celular de las células acinares adultas²³⁶. Para analizar la activación de la ruta Notch se realizaron ensayos de expresión de un factor clave en la ruta, el factor de transcripción Hes1. En páncreas de ratones *HIF2dPA* adultos, y de acuerdo con previos estudios, la expresión de Hes1 se restringe exclusivamente a las células centroacinares (Fig. R20E). Sin embargo, en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se observó un aumento de la expresión de Hes1 en el epitelio de las lesiones ADM (Fig. R20F). Aunque se mantenía una expresión moderada en células centroacinares, no se detectó aumento de expresión de Hes1 en células acinares. Sin embargo, hemos de señalar que este aumento de Hes1 observado por inmunohistoquímica no se vio corroborado por los estudios de expresión de Hes1 a nivel de ARNm (Fig. R20G). Es posible que esto se deba al bajo número de células que expresan Hes1, dificultando la posibilidad de detectar pequeños aumentos de expresión por técnicas en las que se analiza todo el tejido pancreático, como es la PCR cuantitativa o que los cambios se deban a procesos de regulación postranscripcionales.

Todo esto hace indicar que, tras la activación ectópica de HIF-2 α , se produce una alteración en la plasticidad de las células acinares activándose programas genéticos propios de células embrionarias progenitoras pancreáticas.

11. Rutas moleculares alteradas en el tejido exocrino y en las lesiones ADM en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos

La homeostasis del tejido exocrino adulto y los mecanismos de respuesta a daño pancreático están regulados por diferentes vías de señalización que desempeñan papeles cruciales en estos procesos. Estas vías de señalización pueden afectar no solo al compartimento epitelial del páncreas o a las regiones neoplásicas donde se localizan las lesiones ADM, sino también al compartimento estromal asociado.

Una de las rutas implicada en la homeostasis de las células acinares y en la respuesta a eventos proinflamatorios, como la pancreatitis, es la ruta de las MAP quinasas (MAPK, de sus siglas en inglés). La ruta MAPK está implicada en la respuesta a eventos de metaplasia acino-ductal^{237,238} e interviene en procesos de desdiferenciación de células acinares²³⁹. Evaluamos la actividad de la ruta MAPK en páncreas de ratones adultos *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mediante análisis de inmunofluorescencia de la fosforilación de una de las tres quinasas que forman el módulo de la estructura básica de MAPK, ERK1/2 (pERK, del inglés *phosphorylated-ERK*). En ratones controles *HIF2dPA*, no se detectaron células acinares positivas para pERK, aunque sí se observaron algunas células positivas en regiones periacinares (Fig. R21A-C).

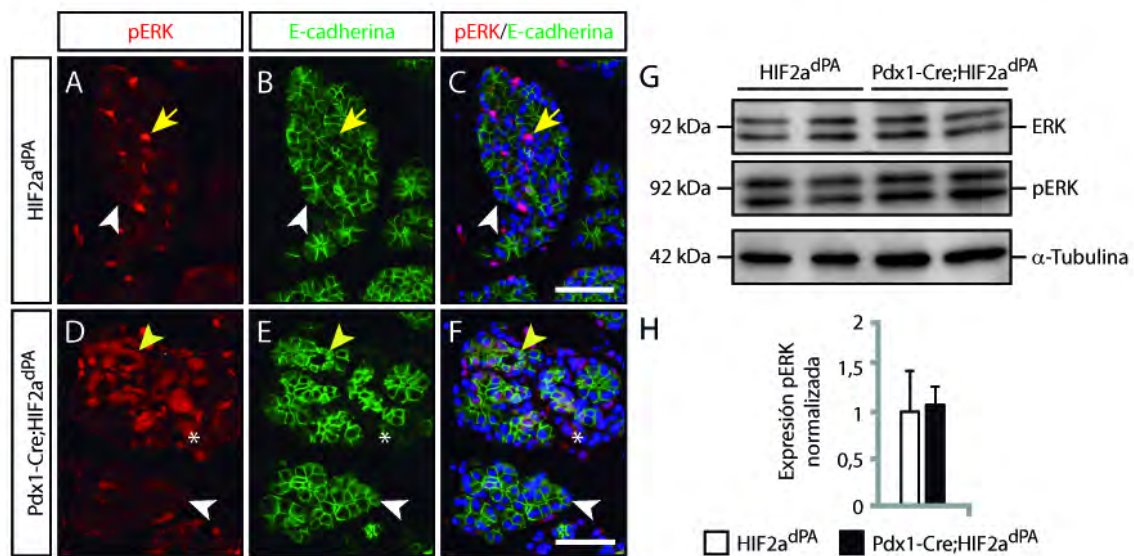


Figura R21. La sobreexpresión de HIF-2 α en páncreas produce una activación de la ruta MAPK en el tejido exocrino. (A-F) Análisis de inmunofluorescencia de pERK en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se utilizó E-cadherina (en verde) para marcar el epitelio pancreático. Se presentan las imágenes de los canales por separado (A, D; B, E) y la composición de ambos canales junto a DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares (C, F). Las flechas amarillas muestran las células periacinares positivas para pERK. Las cabezas de flechas blancas indican los acinos negativos para pERK en ratones controles y en tejido exocrino conservado de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Las cabezas de flechas amarillas señalan las células epiteliales que conforman las lesiones pancreáticas con activación de pERK. * en D-F indica la activación de pERK en el estroma de las lesiones pancreáticas. Barras de escala en C y F para A-E, 100 μ m. (G) Nivel de expresión proteica de ERK total y pERK en ratones controles y en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* detectado mediante *western blot*. Se han representado 2 individuos independientes de 2 semanas de edad para cada genotipo. Se utilizó α -tubulina como control de carga. (H) Cuantificación de los niveles de expresión de pERK normalizados respecto a proteína ERK total detectados en los ensayos de *western blot*. Los datos se han representado como la media \pm SEM.

En el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 semanas de edad, al igual que en los ratones controles, no se observaron células positivas para pERK en los acinos íntegros (Fig. R21D-F). Sin embargo, se detectó una clara acumulación nuclear de pERK en las regiones con tejido acinar afectado, donde se localizaban las lesiones ADM (Fig. R21D, F). Además, se observó también un aumento de los niveles de MAPK en las células epiteliales de las lesiones ADM, así como en las células estromales que rodeaban los lóbulos de tejido exocrino afectados (Fig. R21D, F).

Otra de las rutas relevantes en la homeostasis del tejido exocrino es la ruta AKT/mTOR. La proteína diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, por sus siglas en inglés) es una proteína diana *downstream* de *AKT*, la cual está implicada en la regulación del crecimiento celular y división celular. Para evaluar la actividad de la ruta mTOR, se analizó el nivel de fosforilación de la proteína ribosómica S6 (pRPS6, de sus siglas en inglés), uno de los genes diana de esta ruta, mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Como se había descrito con anterioridad²⁴⁰, en páncreas de ratones controles, RPS6 se encontró fosforilado en una pequeña subpoblación de células del islote pancreático y en la mayoría de células acinares, positivas para amilasa (Fig. R22A-C), pero no fue detectado en células ductales, positivas para KRT19 (Fig. R22G-I). En el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* tampoco se observó ninguna célula ductal positiva para pRPS6 (Fig. R22J-L). Al igual que en los páncreas controles, en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se observó una intensa señal de pRPS6 en el citoplasma de células acinares y en una pequeña subpoblación de células endocrinas (Fig. R22D-F). La activación de pRPS6 se limitaba a las células acinares compactas de zonas adyacentes a regiones afectadas donde se ubican las lesiones ADM (Fig. R22D, F). En estas regiones exocrinas más afectadas, pRPS6 mostraba un patrón más débil y parcheado que en las regiones bien conservadas, desapareciendo en algunas regiones la colocalización con amilasa (Fig. R22D, F). Era llamativa también la baja expresión de pRPS6 en las células epiteliales de las lesiones ADM.

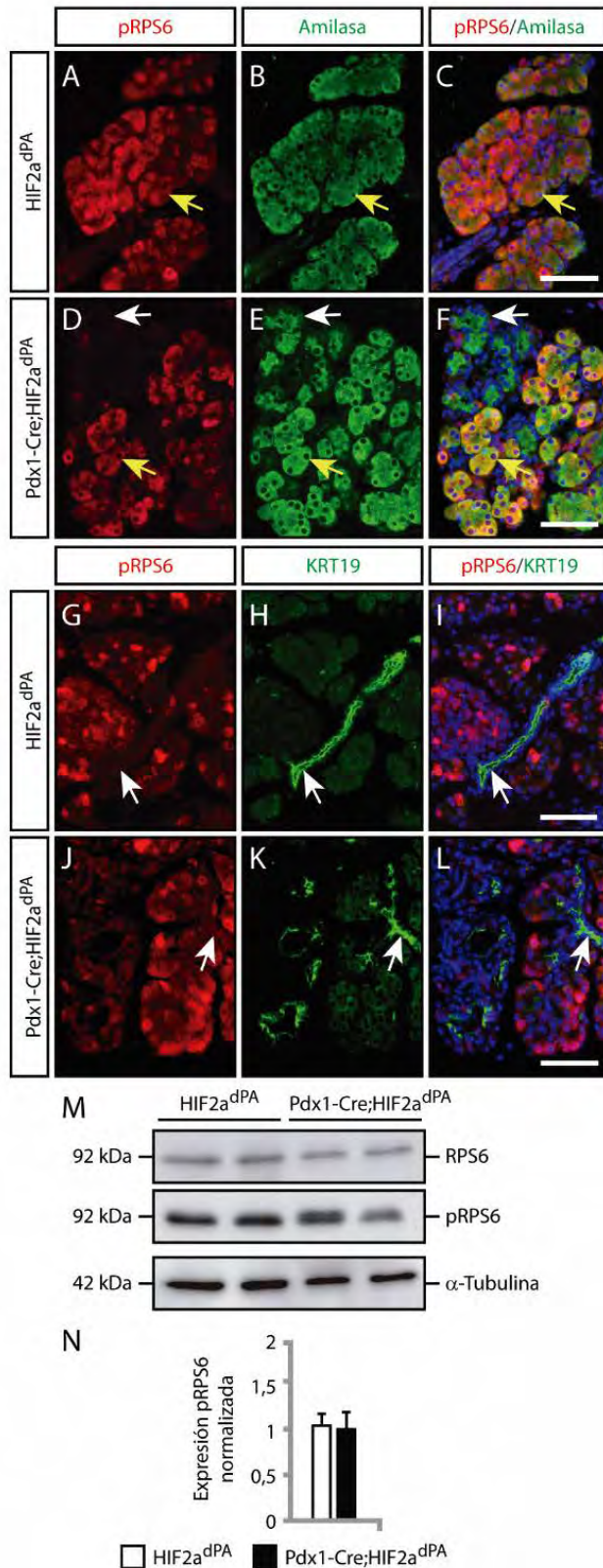


Figura R22. La activación específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos produce alteraciones en la ruta mTOR en el tejido exocrino adulto. (A-F) Análisis de inmunofluorescencia de pRPS6 en el tejido acinar, positivo para amilasa (en verde), en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se presentan las imágenes de los canales por separado (A, D; B, E) y la composición de ambos canales junto a DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares (C, F). Las flechas amarillas muestran las células acinares (positivas para amilasa) con expresión alta de pRPS6. Las flechas blancas (en D-F) indican los acinos pancreáticos afectados (positivos para amilasa) con una pérdida de expresión de pRPS6 en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. (G-L) Análisis de inmunofluorescencia de pRPS6 en el tejido ductal, positivo para KRT19 (en verde), en ratones controles y ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se presentan las imágenes de los canales por separado (G, J; H, K) y la composición de ambos canales junto a DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares (I, L). Las flechas blancas (en G-L) indican las células ductales (positivos para KRT19) sin expresión de pRPS6 en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Barras de escala en C, F, I, L para A-L, 100 μ m. (M) Nivel de expresión proteica de pRPS6 total y pRPS6 en ratones controles y en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* detectado mediante

western blot. Se han representado 2 individuos independientes de 2 semanas de edad para cada genotipo. Se utilizó α -tubulina como control de carga. (N) Cuantificación de los niveles de expresión de pRPS6 normalizados a proteína RPS6 total detectados en los ensayos de *western blot*. Los datos se han representado como la media \pm SEM.

Hemos de señalar que estas alteraciones observadas en los niveles de activación de la ruta MAPK y de la ruta mTOR a nivel histológico no pudieron ser validadas a nivel de proteínas mediante la realización de *western blot*, ni para pERK ni para pRPS6 (Fig. R21G, H; Fig. R22M, N). Esto puede ser debido a que, a 2 semanas de edad, los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* muestran una afección pancreática focal y que el patrón anómalo de ambas rutas se localiza específicamente en zonas dañadas, por lo que los cambios pueden ser muy pequeños para ser detectados en un extracto proteico del páncreas completo.

La clusterina es una proteína chaperona que se sintetiza en respuesta al estrés celular. En acinos normales de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, así como en acinos de ratones controles *HIF2dPA*, no se detectó expresión de clusterina (Fig. R23B, E, H, K). Sin embargo, en las regiones de acinos desorganizados adyacentes a las lesiones ADM de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, se detectó un aumento significativo de la proteína clusterina (Fig. R23E, K). Este aumento de clusterina se detectó en las células epiteliales de las lesiones túbulo-ductales y en las células acinares de los acinos afectados donde se activó pERK (Fig. R23D-F). Cabe destacar, que las regiones de acinos afectados donde se observó la acumulación de clusterina y la activación de pERK, coincide con las regiones acinares donde se produce una disminución de la expresión de pRPS6 (Fig. R23J-L).

Estos datos, en su conjunto, permiten establecer que la activación de HIF-2 α en páncreas de ratones adultos afectan a rutas de señalización molecular como MAPK y AKT/mTOR. Además, estas alteraciones provocadas por el daño pancreático van acompañadas de la inducción de proteínas de estrés celular como la clusterina.

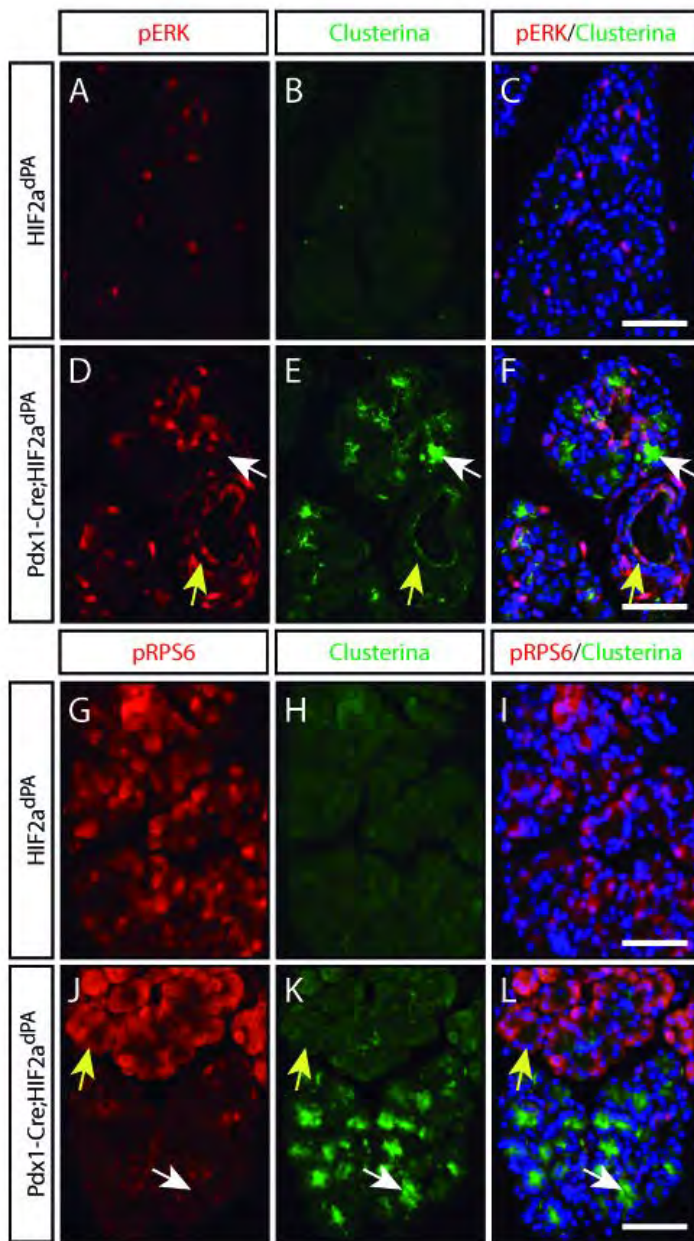


Figura R23. Inducción de proteínas de estrés celular en el tejido exocrino de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos tras la estabilización de HIF-2 α .

(A-F) Análisis de inmunofluorescencia de la proteína clusterina en el tejido exocrino donde se activa la expresión de la ruta MAPK (pERK, en rojo), en ratones controles y en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se presentan las imágenes de los canales por separado (A, D; B, E) y la composición de ambos canales junto a DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares (C, F). Las flechas blancas (en D-F) indican las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* donde se detecta una colocación de clusterina (en verde) y pERK (en rojo). Las flechas amarillas (en D-F) señalan las células ductales de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* donde se detecta una colocación de clusterina

(en verde) y pERK (en rojo). (G-H) Inmunofluorescencias de clusterina en secciones de páncreas donde se activa la expresión de la ruta mTOR (pRPS6, en rojo), en ratones controles y en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* a 2 semanas de edad. Se presentan las imágenes de los canales por separado (G, J; H, K) y la composición de ambos canales junto a DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares (I, L). Las flechas amarillas (en J-L) señalan las células acinares estables de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* donde se detecta señal de pRPS6 y no de clusterina. Las flechas blancas (en J-L) indican las células acinares afectadas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* donde se detecta una activación de la proteína clusterina y un descenso en la expresión de pRPS6. Barras de escala en C, F, I, L para A-L, 100 μ m.

BLOQUE II. EFECTO DE LA SOBREATIVACIÓN DE HIF-2 α EN UN CONTEXTO ONCOGÉNICO Y SU PAPEL EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

12. Generación de un modelo animal con activación específica de HIF-2 α en progenitores específicos del linaje exocrino

Hasta ahora, utilizando el modelo *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, hemos demostrado como la estabilización de HIF-2 α en la mayoría de las células del epitelio pancreático temprano durante el desarrollo embrionario provoca alteraciones en la homeostasis del páncreas exocrino. Uno de los factores de transcripción clave en la diferenciación de las células acinares es *Ptf1a*, el cual juega dos papeles fundamentales durante la organogénesis pancreática. Primero, es necesario para el crecimiento y la morfogénesis del epitelio pancreático temprano y segundo, regula la expresión génica de genes específicos del linaje exocrino en células acinares adultas²⁴¹. En nuestras manos, la línea *Ptf1a-Cre* no mostró una actividad apreciable durante estadios tempranos del desarrollo embrionario del páncreas. Nuestros estudios de trazado de linaje en esta línea, no detectó escisión del gen *reporter* en células endocrinas del islote pancreático ni en la mayoría células ductales¹⁹⁶. Sin embargo, la escisión en células acinares era muy robusta, convirtiéndose así en una herramienta válida para modificar nuestro gen de interés específicamente en las células acinares del páncreas. Por lo tanto, utilizamos esta línea transgénica *Ptf1a-Cre* para evaluar el efecto de la sobreexpresión de HIF-2 α en células acinares maduras.

13. La estabilización ectópica de HIF-2 α en progenitores específicos de células exocrinas no altera severamente la homeostasis del tejido exocrino adulto

Para generar ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* de forma eficiente se realizó, al igual que con el modelo *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, un cruce entre un ratón macho *Ptf1a-Cre* y ratones hembras homocigotas *HIF2dPA*. Al portar los individuos resultantes de estos cruces un alelo *HIF2dPA* floxeado, la generación de *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* depende de la herencia de la *Cre* recombinasa (Fig. R24A). En este caso, se usaron como controles en todos los experimentos ratones *HIF2dPA* que no portaban el transgén *Ptf1a-Cre*. Los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* nacieron en la proporción mendeliana esperada. El 55.55% del total de nacimientos fueron *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y alcanzaban edades adultas sin alteraciones de salud aparentes y sin letalidad asociada. No se detectaron diferencias significativas en el peso corporal entre los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y los ratones controles *HIF2dPA*, en ninguno de los puntos temporales analizados (Fig. R24B). Puesto que en edades tempranas posnatales (2 semanas) no se observaron alteraciones morfológicas durante las disecciones ni defectos metabólicos, se optó por analizar animales de edades superiores (Fig. R24C) a las analizadas previamente en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Se detectó una moderada reducción de masa pancreática en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* a partir de los dos meses de edad (Fig. R24D). Esta diferencia se evidenció también cuando se normalizaron los valores respecto al peso total del cuerpo del ratón (Fig. R24E). Sin embargo, aunque existentes, estas diferencias en el peso del páncreas de ratones se redujeron al analizar animales de edades más avanzadas (6 meses) (Fig. R24D, E).

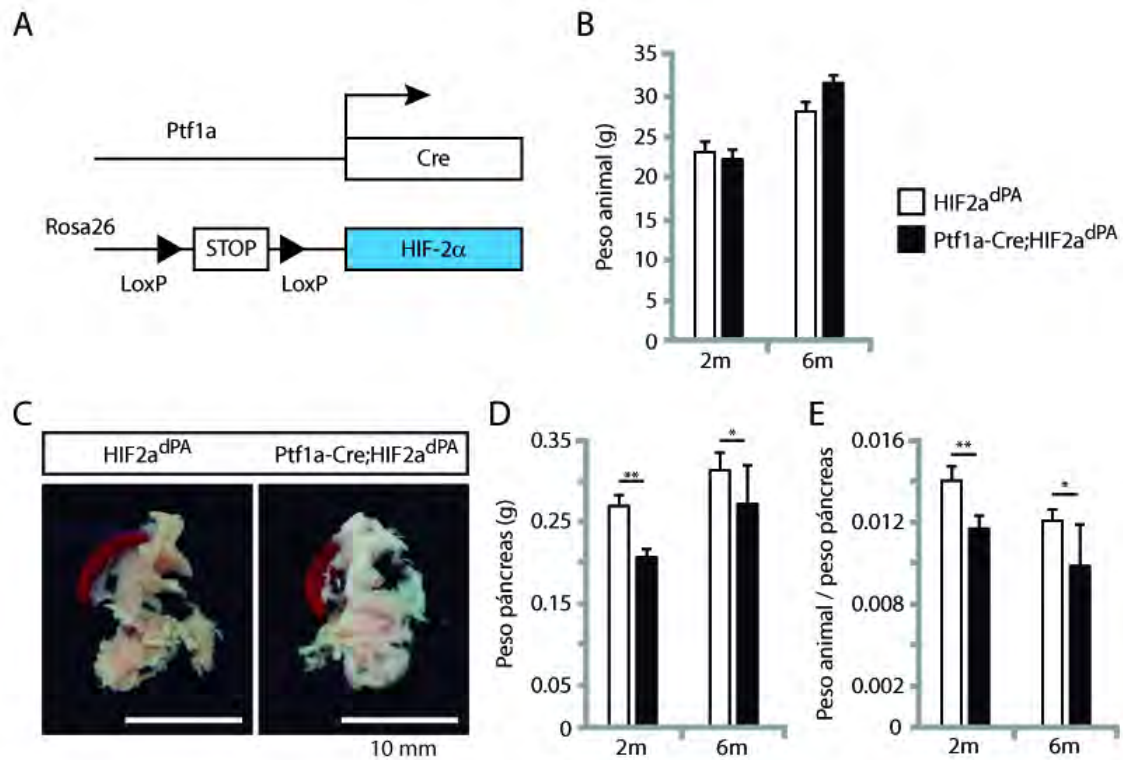


Figura R24. La activación específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos del linaje exocrino no produce defectos morfológicos severos en páncreas adultos. (A) Esquema representativo de los alelos *Ptf1a-Cre* y *HIF2dPA*. (B) Representación gráfica del peso corporal de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y de ratones controles *HIF2dPA* a 2 y 6 meses de edad. (C) Disección representativa de los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y de ratones controles a 6 meses de edad. Se mantuvo el bazo para facilitar la orientación del páncreas. Barra de escala, 10 mm. (D) Representación gráfica del peso pancreático y la proporción peso corporal/peso pancreático (E) en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y en ratones controles a 2 y 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

El análisis histológico mediante tinciones de HE no reveló graves alteraciones histológicas en el páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* (Fig. R25A-E). A partir de los 6 meses de edad, en zonas muy localizadas del tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, se observaron pequeños grupos de acinos que mostraban pequeñas dilataciones apicales produciendo estructuras similares a conductos pancreáticos (Fig. R25C, D), similares a las lesiones descritas en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, pero con una prevalencia mucho menor. Aunque en general la arquitectura del tejido exocrino de los ratones

Ptf1a-Cre;HIF2dPA no estaba afectada, ni siquiera en edades avanzadas (6 meses), observamos algunos lóbulos de tejido exocrino con un alto grado de lipomatosis (Fig. R25E, F) y una gran cantidad de estroma, que podría explicar la disminución del peso pancreático.

Para determinar si la activación de HIF-2 α alteraba la homeostasis del tejido exocrino en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, se realizó un análisis inmunohistoquímico con amilasa (Fig. R25G, H). En los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, a diferencia de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, no se observó pérdida de células acinares ni tampoco se detectó una expansión sustancial del componente ductal (Fig. R25H, I) en comparación con ratones controles (Fig. R25G, I). Además, se estudió la vascularización de los páncreas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* mediante la realización de ensayos de inmunofluorescencia con el marcador de células endoteliales MECA-32 (Fig. R25J, K). Se realizaron cuantificaciones del número de vasos sanguíneos totales (Fig. R25L) y del tamaño relativo de cada vaso individual (Fig. R25M) y encontramos que la densidad de la vasculatura pancreática de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* aumentó significativamente en comparación a los ratones controles (Fig. R25N).

En ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, como era de esperar debido a la especificidad de escisión en el compartimento exocrino, no se observó defecto alguno en la arquitectura del islote pancreático (Fig. R25C-E), incluso cuantificando los lóbulos más afectados por la aparición masiva de tejido adiposo (Fig. R25O). Una cuantificación morfométrica detallada reveló que no existían diferencias ni en el número de islotes ni en el tamaño de los mismos entre los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y los ratones controles (Fig. R25P, Q). Además, no observamos diferencias en los niveles de glucosa basal en sangre entre ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y ratones controles (Fig. R25R).

Todos estos datos indican que la estabilización de HIF-2 α en células progenitoras acinares no afecta de forma severa a la homeostasis del tejido exocrino causando algunos focos de lipomatosis y un número limitado de lesiones ductales similares a las detectadas en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*.

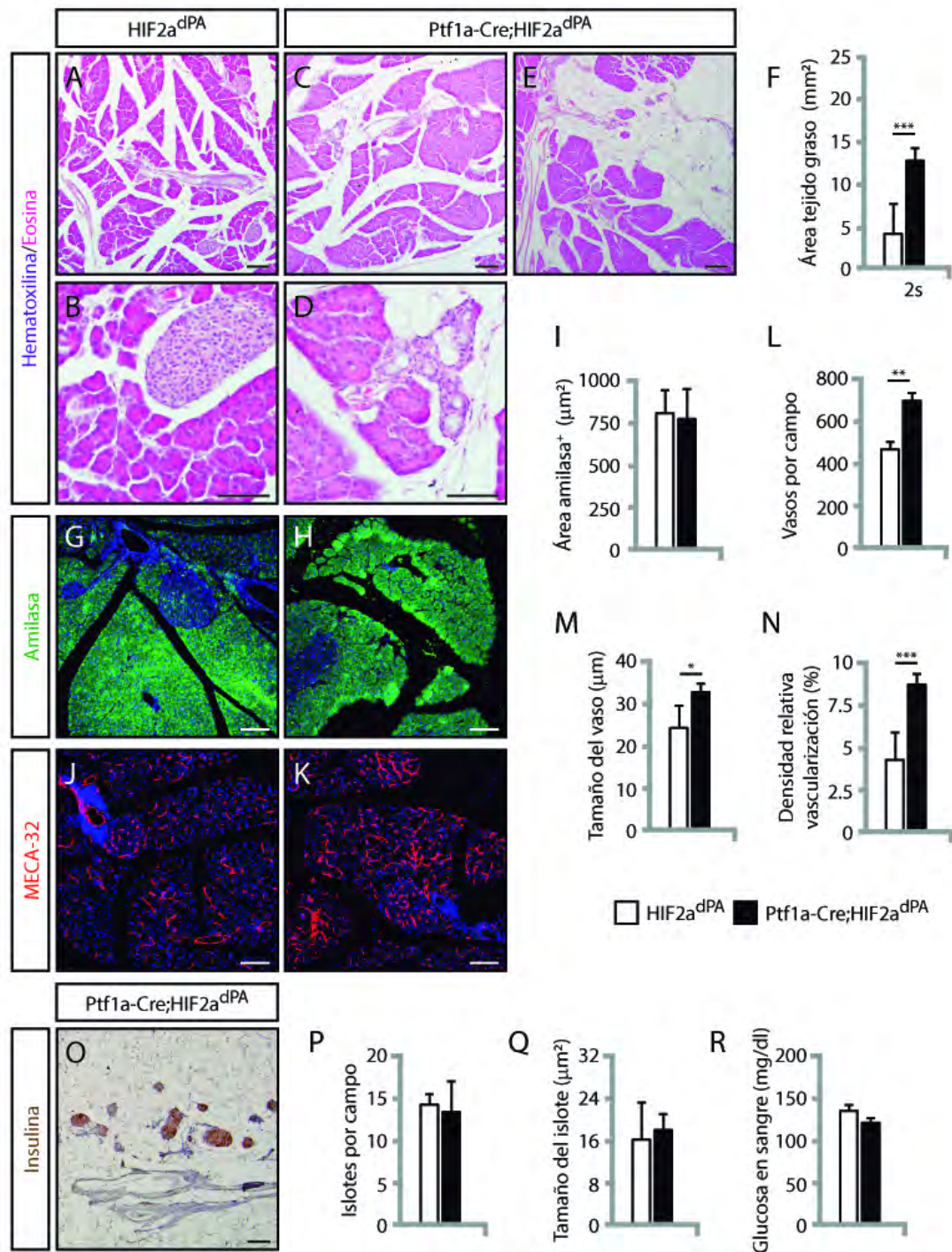


Figura R25. La estabilización de HIF-2 α en progenitores pancreáticos del linaje exocrino produce defectos leves en la estructura del tejido exocrino.

(A-E) HE de secciones de páncreas de ratones controles y de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* a 6 meses de edad. (D) Se detectaron pequeños focos con lesiones túbulo-ductales en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y lóbulos de tejido acinar con un alto componente de tejido graso (E). (F) Cuantificación del área total de tejido graso detectado en secciones de páncreas de ratones controles y de ratones teñidos con HE. (G, H) Análisis de inmunofluorescencia de amilasa en secciones de páncreas de ratones controles y de

ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* de 6 meses de edad. (I) Cuantificación del área total de amilasa por sección de páncreas a los 6 meses de edad. (J, K) Análisis de inmunofluorescencia de MECA-32 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* a 6 meses de edad. Representación de las cuantificaciones del número de vasos sanguíneos por campo (L), del tamaño de los vasos sanguíneos (M) y del porcentaje de densidad vascular respecto a área pancreática (N) de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y ratones controles *HIF2dPA* a 6 meses de edad. (O) Inmunohistoquímica de insulina en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* con alto contenido en tejido graso. Representación de las cuantificaciones del número de islotes por campo (P), del tamaño de los islotes (Q) y del nivel de glucosa en sangre (R) de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y ratones controles a 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

14. Eficiente estabilización de HIF-2 α en el tejido acinar adulto de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*

La falta de fenotipos claros en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* comparado con los defectos tan severos observados en el tejido exocrino de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* fueron inesperados. Quisimos descartar que el nivel de activación del transgén *HIF2dPA* bajo el control de la *Cre* recombinasa asociada al promotor *Ptf1a* no tuviese suficiente eficiencia y justificase esta relativa ausencia de fenotipo. Para ello, en primer lugar, evaluamos la escisión del transgén *HIF2dPA* realizando diferentes PCR con cebadores específicos (detalles en el apartado 4 de Materiales y Métodos de esta tesis). Los resultados revelaron un nivel de escisión apropiado del alelo *HIF2dPA* en las muestras de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* exclusivamente, mientras que los ratones controles no mostraban escisión detectable (Fig. R26A). Se utilizaron como control de especificidad, muestras de cola de los mismos individuos analizados. Estos resultados permiten descartar un problema de eficacia de escisión en el modelo genético generado.

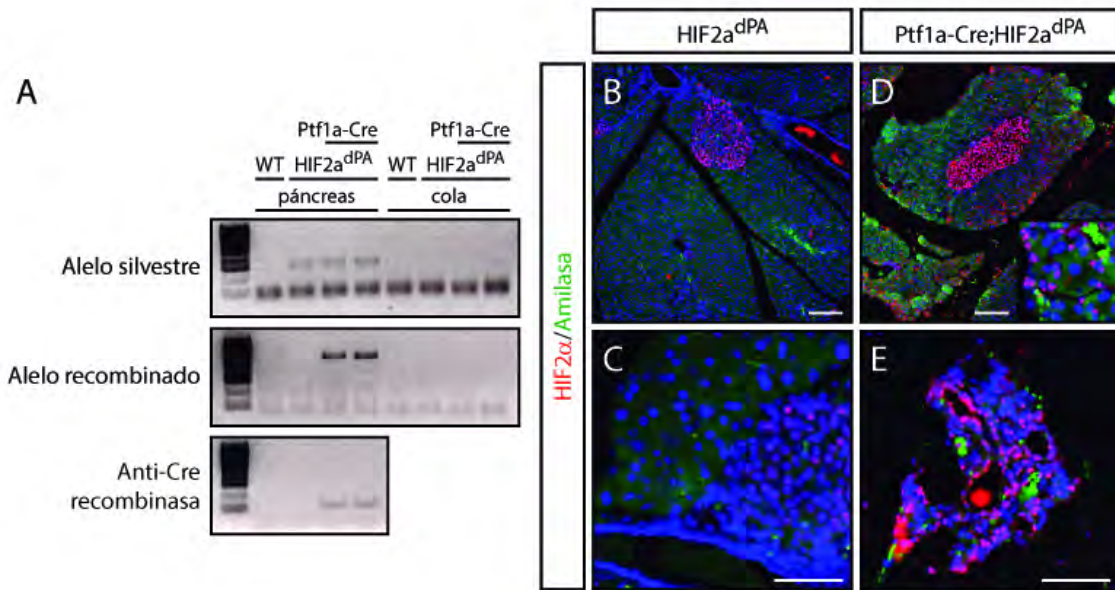


Figura R26. Niveles de escisión del transgén *HIF2dPA* y acumulación de HIF-2 α en los ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA*. (A) PCR genómica con cebadores específicos para detectar el alelo silvestre del transgén *HIF2dPA* (panel superior), para el alelo recombinado del transgén *HIF2dPA* (panel intermedio) y para la *Cre* recombinasa (panel inferior) en ratones controles y ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA*. Se utilizó como control negativo ADN extraído de tejido de la cola del mismo ratón analizado. (B-E) Análisis de inmunofluorescencia de HIF-2 α en ratones de 6 meses de edad. Se detectó señal endógena de HIF-2 α en los islotes pancreáticos (B, C, D), pero no en el tejido exocrino de ratones controles (B, C). Robusta acumulación de HIF-2 α en las células acinares (D) y en las células epiteliales de las lesiones encontradas en ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA* de 6 meses de edad (E). Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m.

En segundo lugar, evaluamos los niveles de HIF-2 α mediante inmunofluorescencias. Como describimos anteriormente, en el páncreas de ratones *HIF2dPA* adultos, se detectó acumulación de la proteína endógena HIF-2 α en los islotes pancreático con el patrón típico citoplasmático y/o perinuclear pero no en células acinares o ductales (Fig. R26B, C). Sin embargo, en ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA*, se observó una clara acumulación de HIF-2 α en el núcleo de la mayoría de las células acinares (Fig. R26D, E). En consonancia con nuestros estudios de trazado de linaje realizados en la línea *Ptfla-Cre*, solo un limitado número de células ductales mostraban expresión detectable de HIF-2 α en ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA* adultos (Fig. R26D). Igualmente, los

islotes pancreáticos de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* no mostraban acumulación nuclear HIF-2 α , solo localización citoplásmica similar a la detectada en los islotes de ratones controles (Fig. R26D). Cabe destacar que, en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* adultos, las células del epitelio de las lesiones descritas en regiones del tejido exocrino afectado mostraban un alto nivel de acumulación de HIF-2 α (Fig. R26E).

En su conjunto, estos resultados indican que la proteína modificada HIF-2 α codificada por el alelo *HIF2dPA* se estabiliza de forma eficiente en células acinares de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* adultos.

15. Caracterización de las lesiones focales encontradas en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* adultos

Histológicamente, la mayoría del tejido exocrino de individuos *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* adultos se encontraba bien conservado, sin defectos aparentes. Sin embargo, ocasionalmente hallábamos algunas estructuras tubulares dilatadas rodeadas de estroma (Fig. R25C-D), similares a las lesiones denominadas ADM que observamos en el modelo *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. De hecho, el análisis de inmunofluorescencia con MECA-32 mostró la presencia de células endoteliales rodeando las lesiones quísticas de naturaleza ductal observadas (Fig. R27A-D). Este tipo de lesiones coinciden histológicamente a las encontradas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y a las descritas en los pacientes con la enfermedad de VHL²⁰¹. Las lesiones túbulo-ductales detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* de 6 meses de edad, no presentaron una acumulación de estructuras papilares citoplasmáticas productoras de mucinas, como demostró la tinción azul alcian (Fig. R27E-H). Además, las células epiteliales de las lesiones tubulares analizadas no mostraron una pérdida de los cilios primarios significativa (Fig. R27I, J), característica que indica que no se trata de lesiones preneoplásicas (PanIN) y que no denotan un componente de malignidad. Aunque se detectaron estas lesiones ADM similares a las encontradas en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, no se observó ninguna otra evidencia histológica de eventos asociados a pancreatitis. No se visualizó un aumento de infiltrados inflamatorios,

ni un aumento de fibrosis del parénquima pancreático y, como indicamos anteriormente, no hubo una pérdida progresiva del tejido exocrino funcional.

Este conjunto de resultados permite concluir que la estabilización de HIF-2 α en el tejido exocrino en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* produce lesiones quísticas similares histológicamente a las detectadas en el páncreas de pacientes VHL, a partir de los 6 meses de edad pero con una prevalencia mucho menor que en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Sin embargo, no se detectan más evidencias histológicas de características propias de pancreatitis.

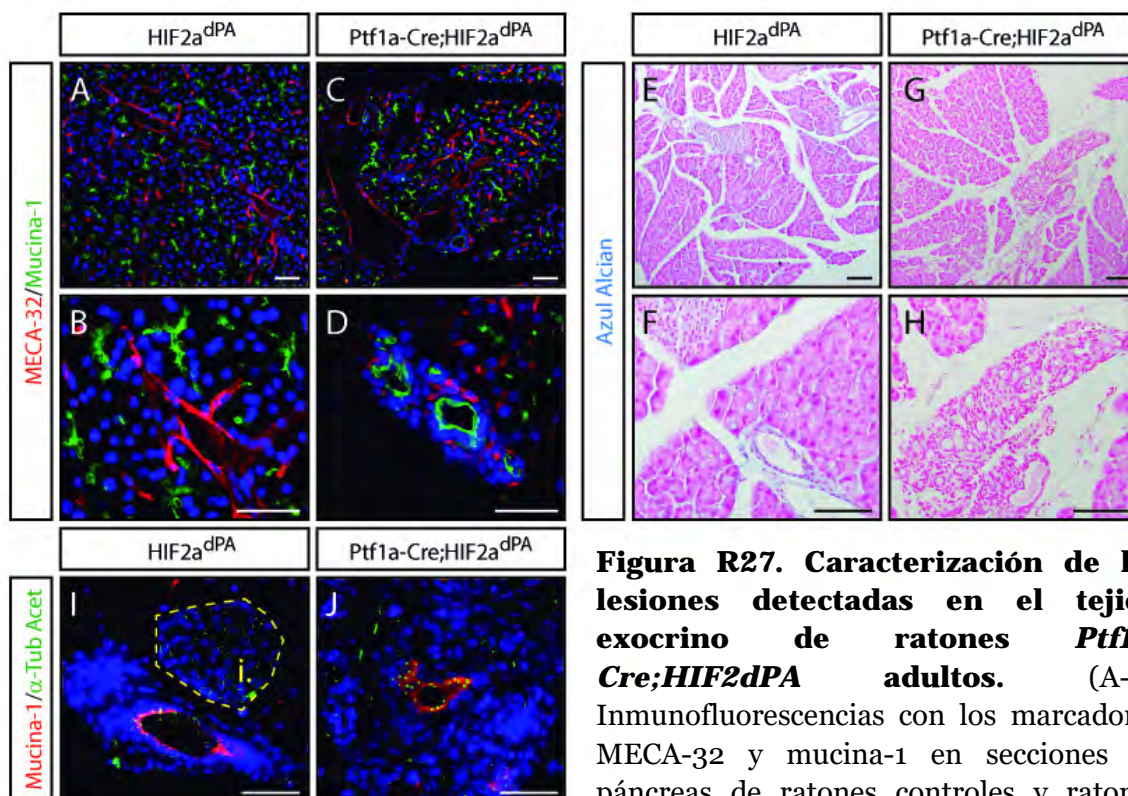


Figura R27. Caracterización de las lesiones detectadas en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* adultos. (A-D) Inmunofluorescencias con los marcadores MECA-32 y mucina-1 en secciones de páncreas de ratones controles y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* a 6 meses de edad. (E-H) Tinción con azul alcian, contratada con NFR en ratones controles y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* a 6 meses de edad. (H) Las células que componen las lesiones tubulares detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* muestran una ausencia total de mucinas en su citoplasma. (I, J) Inmunofluorescencia con α -tubulina acetilada para teñir los cilios primarios. Se utilizó mucina-1 (en rojo) para marcar el epitelio ductal. Las lesiones tubulares de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* (J) presentan cilios primarios al igual que los conductos de los ratones controles (I). La línea amarilla discontinua delimita un islote pancreático (i.). Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala en A, C, E, G, 100 μ m; en B, D, F, H, I, J, 50 μ m.

Imágenes a baja magnificación (A, C) y detalle de las lesiones pancreáticas detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* (D) donde se observan células endoteliales (MECA-32; en rojo) rodeando el epitelio de la lesión de naturaleza ductal (mucina-1; en verde). (E-H) Tinción con azul alcian, contratada con NFR en ratones controles y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* a 6 meses de edad. (H) Las células que componen las lesiones tubulares detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* muestran una ausencia total de mucinas en su citoplasma. (I, J) Inmunofluorescencia con α -tubulina acetilada para teñir los cilios primarios. Se utilizó mucina-1 (en rojo) para marcar el epitelio ductal. Las lesiones tubulares de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* (J) presentan cilios primarios al igual que los conductos de los ratones controles (I). La línea amarilla discontinua delimita un islote pancreático (i.). Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala en A, C, E, G, 100 μ m; en B, D, F, H, I, J, 50 μ m.

16. Generación de un modelo animal con activación específica de HIF-2 α simultánea a la activación oncogénica del gen *Kras* en progenitores acinares

HIF-2 α muestra un nivel de expresión elevado en las lesiones preneoplásicas pancreáticas (PanIN) tempranas y su nivel expresión, a diferencia de HIF-1 α , decrece en estadios avanzados de la carcinogénesis pancreática²⁰⁸. Además, como reflejan nuestros propios resultados, la activación ectópica de HIF-2 α en el páncreas produce un fenotipo similar a la pancreatitis, considerado uno de los factores implicados más relevantes para el desarrollo de cáncer de páncreas. Por todo ello, nos planteamos si HIF-2 α podía desempeñar un papel en la iniciación y progresión temprana del desarrollo de PDAC. Para ello decidimos evaluar el efecto de la HIF-2 α en un contexto prooncogénico pancreático utilizando un modelo de ratón transgénico bien establecido que está basado en la activación condicional de un alelo mutante de *Kras* (*Kras*^{LSLG12V}, más detalles en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos). Este ratón *Kras*^{LSLG12V} fue cruzado con ratones con ratones *Ptf1a-Cre* generando así la línea *Ptf1a-Cre;Kras*^{LSLG12V} (en adelante, *Ptf1a-Cre;Kras*). Antes de los cruces con la línea *Ptf1a-Cre*, los animales *Kras*^{LSLG12V} son funcionalmente heterocigotos para el alelo silvestre de *Kras* (*Kras*^{+/-}). Tras la escisión del casete de parada y la consiguiente recombinación, se permite la expresión del alelo mutante, resultando un ratón heterocigoto mutante funcionalmente (*Kras*^{+/LSLG12}). Está descrito en la literatura que esta línea de ratones transgénicos *Kras* desarrollan lesiones PanIN completa pero la formación de PDAC solo ocurre en edades avanzadas y con una baja penetrancia²⁰⁹, resultando un modelo idóneo para estudiar el potencial papel prooncogénico de HIF-2 α *in vivo* (Fig. R28A).

Se realizaron cruces de ratones *HIF2dPA* con ratones *Ptf1a-Cre;Kras* para obtener ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*. En todos los experimentos se usó como controles tanto ratones *HIF2dPA* como ratones *Kras* que no portaban el transgén *Ptf1a-Cre*. Ambos genotipos no presentaban fenotipo alguno. Tanto los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* como los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* nacieron en la proporción mendeliana esperada (30.30% (10 de 33) y 27.28% (9 de 33),

respectivamente) y no presentaron fenómenos de letalidad asociados, alcanzando edades avanzadas de hasta 12 meses, el último punto temporal analizado, sin aparentes problemas de salud.

17. La sobreactivación de HIF-2 α en el tejido exocrino en un contexto oncogénico no altera la formación de lesiones preneoplásicas en ratones adultos ni induce su expansión

Desde los primeros estadios analizados (2 meses de edad), los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, no mostraron ninguna diferencia ni en el peso corporal ni en el peso pancreático respecto a animales controles (Fig. R28B, C). Tampoco en edades avanzadas (6 y 12 meses) se detectaron diferencias en el peso corporal o en el peso del páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* respecto a animales controles (Fig. R28B-D). Los ratones dobles transgénicos, *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, al igual que los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, mostraron una pérdida de peso pancreático significativa respecto a los ratones silvestres y a los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R28C, D) en los diferentes puntos temporales analizados.

Un análisis histológico de los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* reveló una penetrancia completa de la formación de lesiones PanIN (Fig. R28E, F). Todos los individuos analizados mostraron diferente número de lesiones PanIN en diferentes estadios de progresión, como se ha descrito anteriormente²⁰⁹. En ratones *Ptf1a-Cre;Kras* de 2 meses de edad encontramos un número bajo de lesiones preneoplásicas por sección completa de páncreas (Fig. R28I). Sin embargo, a partir de los 6 meses de edad, el número de lesiones preneoplásicas aumentó de forma sustancial (Fig. R28I). De igual manera, la totalidad de los páncreas analizados de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 2 meses de edad, mostraron al menos algún foco con lesiones histológicamente similares a PanIN (Fig. R28G, H). A partir de los 6 meses de edad, el número de lesiones detectadas en los individuos *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* también aumentó de manera significativa (Fig. R28I) como en los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*. A pesar de las lesiones encontradas, los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraron, en su conjunto, un tejido exocrino estable con células acinares compactas sin una

fibrosis destacable (Fig. R28G, H). Sin embargo, se detectaron lóbulos acinares con un alto grado de lipomatosis, donde predominaba la presencia de estroma y tejido adiposo (Fig. R28J), fenotipo similar al descrito en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*.

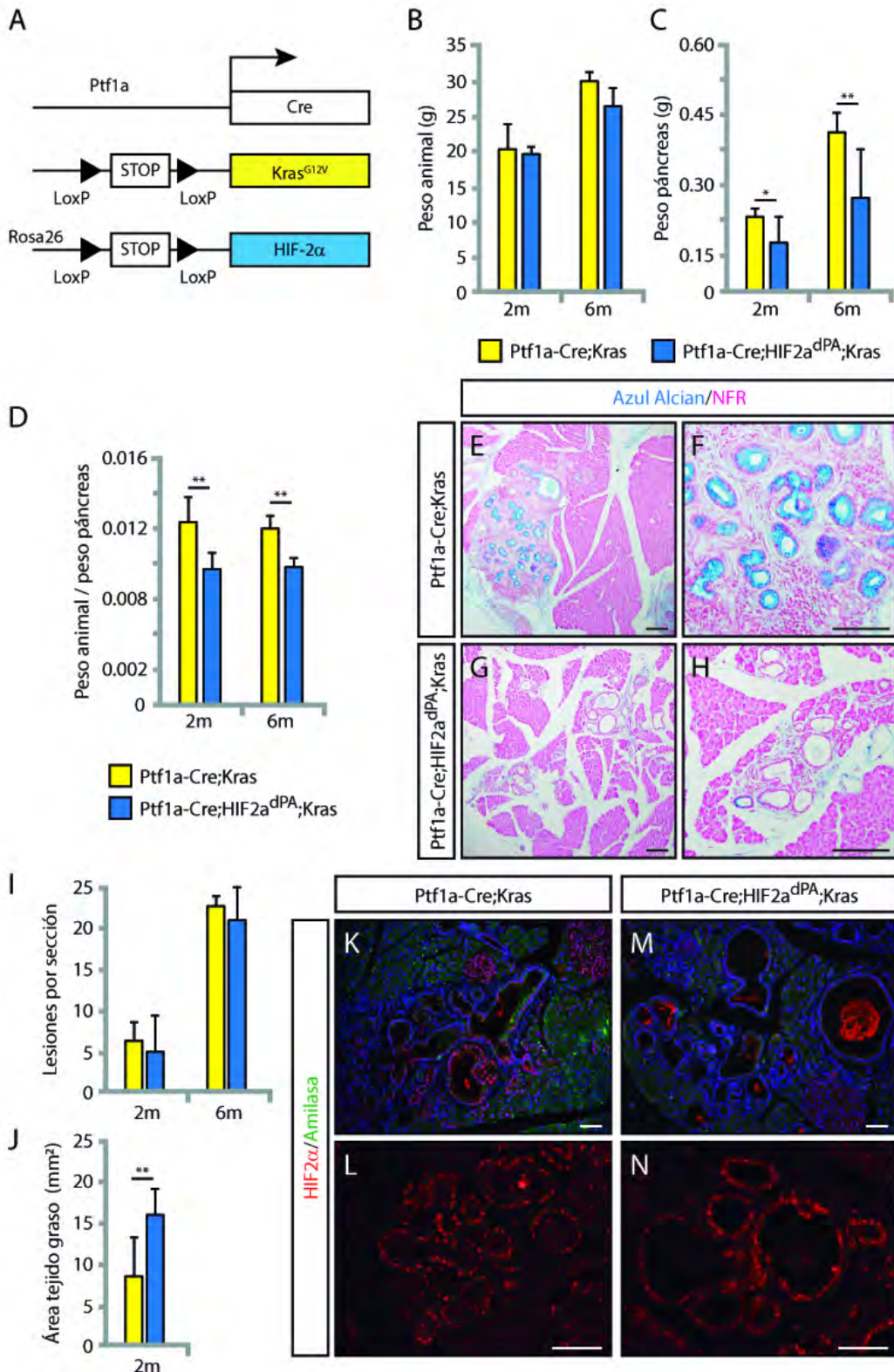


Figura R28. La activación oncogénica de *Kras* simultánea con la estabilización específica de HIF-2 α en progenitores del linaje exocrino pancreático afecta a la homeostasis del tejido exocrino adulto. (A) Esquema representativo de los alelos *Ptf1a-Cre*, *HIF2dPA* y *Kras^{LSLG12V}*. Representación gráfica del peso corporal (B), peso pancreático (C) y proporción peso corporal/pancreático (E) de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 2 y 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. (E-H) Tinciones de HE de secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Se detectaron las lesiones PanIN características de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* con diferente grado histológico (E, F). Se detectaron focos con lesiones túbulo-ductales en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y lóbulos de tejido acinar con un alto componente de tejido graso (G-H). Representación de las cuantificaciones del número de lesiones por sección de páncreas (I) y del área total de tejido graso detectado (J) en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. (K-N) Análisis de inmunofluorescencia de HIF-2 α en ratones de 6 meses de edad. Se detectó señal endógena de HIF-2 α en los islotes pancreáticos (K, M), pero no en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (K). (M) Robusta acumulación de HIF-2 α en las células acinares de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*. (L, M) Las células epiteliales que componen las lesiones detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* muestra un nivel de expresión de HIF-2 α . Se utilizó amilasa para marcar las células acinares y DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m. ** $P \leq 0.01$.

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para comprobar los niveles de expresión de HIF-2 α en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, tras la estabilización ectópica del transgén. El patrón de expresión en ratones controles *HIF2dPA* adultos se mantuvo homogéneo al previamente descrito, con una acumulación endógena en los islotes pancreáticos con localización citoplasmática y/o perinuclear, no mostrando tampoco expresión de HIF-2 α en células acinares o ductales. En ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, se detectó el mismo nivel de expresión de HIF-2 α en el tejido endocrino, pero con un predominante patrón nuclear de acumulación (Fig. R28K). Además, no se observó una acumulación detectable de HIF-2 α en el conjunto de las células acinares del tejido exocrino compacto (Fig. R28K, L). Sin embargo, las células que conforman el epitelio de las lesiones PanIN observadas y las células acinares adyacentes a las regiones afectadas, mostraban un nivel de expresión de HIF-2 α elevado (Fig. R28K, L). En una misma lesión se podían observar células con diferentes niveles de expresión de

HIF-2 α . Aunque en lesiones PanIN de bajo grado el número de células con poca o nula expresión de HIF-2 α era muy limitado, la presencia de células negativas para HIF-2 α aumentaba en lesiones de mayor grado de progresión, coincidiendo con datos de publicaciones previas²⁰⁸.

Por otra parte, el nivel de expresión de HIF-2 α en islotes pancreáticos de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* se mantuvo similar al observado en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R28M). Como era de esperar, casi la totalidad de las células acinares en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* mostraban un nivel de expresión de HIF-2 α elevado, aumentando la intensidad en las regiones adyacentes a las lesiones descritas (Fig. R28M, N). La mayoría de las lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraban un elevado nivel de acumulación de HIF-2 α (Fig. R28M, N). Sin embargo, un grupo limitado de estas lesiones presentaban un patrón difuso de expresión de HIF-2 α , aunque pocas células de su epitelio podían considerarse como negativas para HIF-2 α (Fig. R28N).

Para determinar con precisión el alcance del efecto de la acumulación de HIF-2 α en el tejido exocrino de los ratones se cuantificó el área pancreática afectada observada en secciones de tejido teñidas con HE en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, (Fig. R29A-H). Para evitar sesgos de muestreo, se digitalizaron las secciones completas de los páncreas de todos los individuos analizados, como se describe en el apartado 12 de Materiales y Métodos. Se consideró como tejido afectado aquella zona donde se localizasen estructuras histológicamente compatibles con lesiones preneoplásicas, incluyendo el tejido fibroso periférico o el estroma. Para este análisis, se excluyó el área correspondiente a tejido adiposo asociado a los eventos de lipomatosis descritos en edades tempranas y así analizar exclusivamente las alteraciones del tejido exocrino conservado. Tras normalizar los valores obtenidos de área afectada respecto al tamaño total del páncreas, se obtuvo un valor relativo de porcentaje de tejido afectado (Fig. R29I). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de tejido afectado entre los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* a 2 meses de edad (Fig. R29D, H, I). Anteriormente, describimos que el número de lesiones preneoplásicas observadas aumentaron de manera marcada en los ratones de

ambos genotipos a los 6 meses de edad (Fig. R28H). De igual manera, el área de tejido afectado conformados por estas lesiones aumentó a los 6 meses de edad, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R29I).

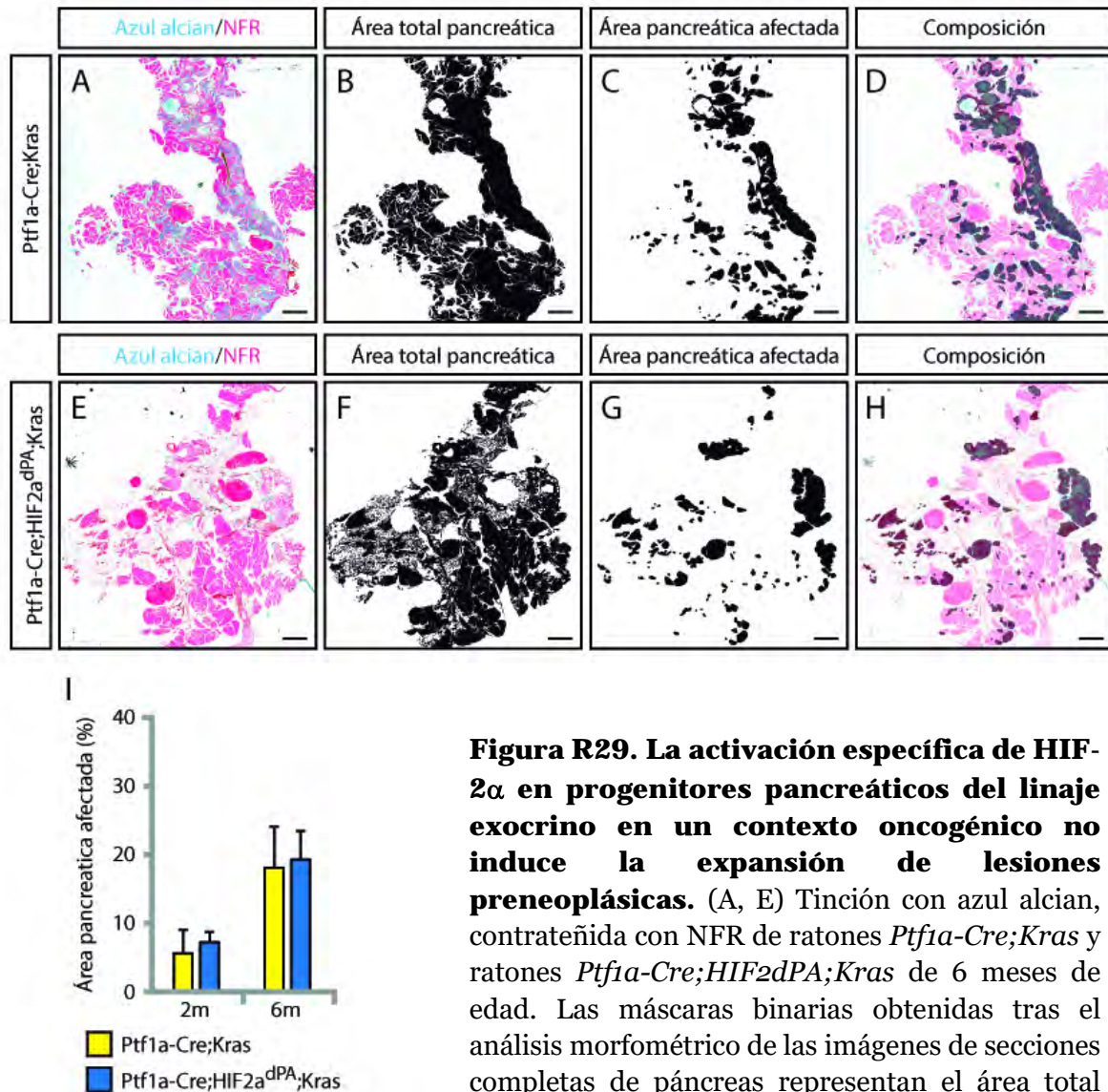


Figura R29. La activación específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos del linaje exocrino en un contexto oncogénico no induce la expansión de lesiones preneoplásicas. (A, E) Tinción con azul alcian, contrateñida con NFR de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Las máscaras binarias obtenidas tras el análisis morfométrico de las imágenes de secciones completas de páncreas representan el área total pancreática (B, F) y el área total de tejido pancreático afectado (C, G). Se muestra una

composición representativa de los análisis de imágenes realizados para facilitar su visualización (D, H). Barras de escala en A-H, 2 mm. (I) Cuantificación del porcentaje de área de tejido pancreático afectado respecto al área pancreática total en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 2 y 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar.

Las lesiones PanIN son neoplasias microscópicas no invasivas con un epitelio papilar o aplanado y se caracterizan por contener gran cantidad de mucinas en su citoplasma¹⁰¹. Para determinar la naturaleza de las lesiones observadas en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, se realizaron tinciones histológicas con azul alcian en secciones parafinadas de páncreas. Como se esperaba, y de acuerdo con la literatura²⁰⁹, las células que componen las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* tenían un abundante contenido en mucinas, mientras que no se detectó señal en islotes pancreáticos, acinos o ductos adyacentes a las lesiones (Fig. R30A, B). Prácticamente la totalidad de las lesiones PanIN detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* de 6 meses de edad mostraron una acumulación elevada de mucinas en el citoplasma de sus células epiteliales (positivas para azul alcian; Fig. R30A, B). Sorprendentemente, las lesiones de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* adultos, aunque histológicamente similares a PanIN, eran negativas para azul alcian (Fig. R30E-H), indicando un bajo o nulo contenido en mucinas en su citoplasma. Hay que resaltar que la acumulación de mucinas es característica identitaria de las lesiones PanIN. En la mayoría de las lesiones de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, se detectó un número muy limitado de células epiteliales que mostrase acúmulo de mucinas en el citoplasma. Sin embargo, un 8.3% \pm 0.9 del total de las lesiones preneoplásicas detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraban una positividad completa para azul alcian, pudiendo ser histológicamente consideradas lesiones PanIN (Fig. R30E-H). Para determinar la penetrancia del fenotipo detectado, se cuantificó el área positiva para azul alcian, marcador específico de lesiones PanIN, y se normalizó respecto al área total de páncreas. Así, se obtuvo un valor relativo de porcentaje de área de lesiones PanIN por sección de páncreas. Se observó una diferencia significativa en la cantidad de área positiva para azul alcian entre los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, tanto a 2 como a 6 meses de edad (Fig. R30I). La cantidad de lesiones PanIN (área positiva para la tinción con azul alcian) aumentó significativamente en los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* de 6 meses respecto a los ratones jóvenes de 2 meses. Sin embargo, no se detectó un aumento destacable del área positiva para azul alcian en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad respecto a ratones jóvenes (Fig. R30I).

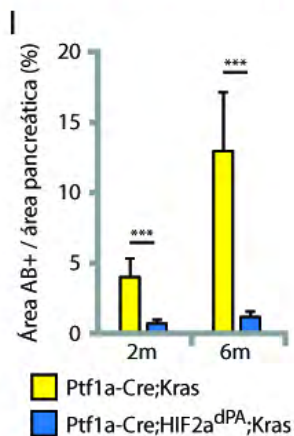
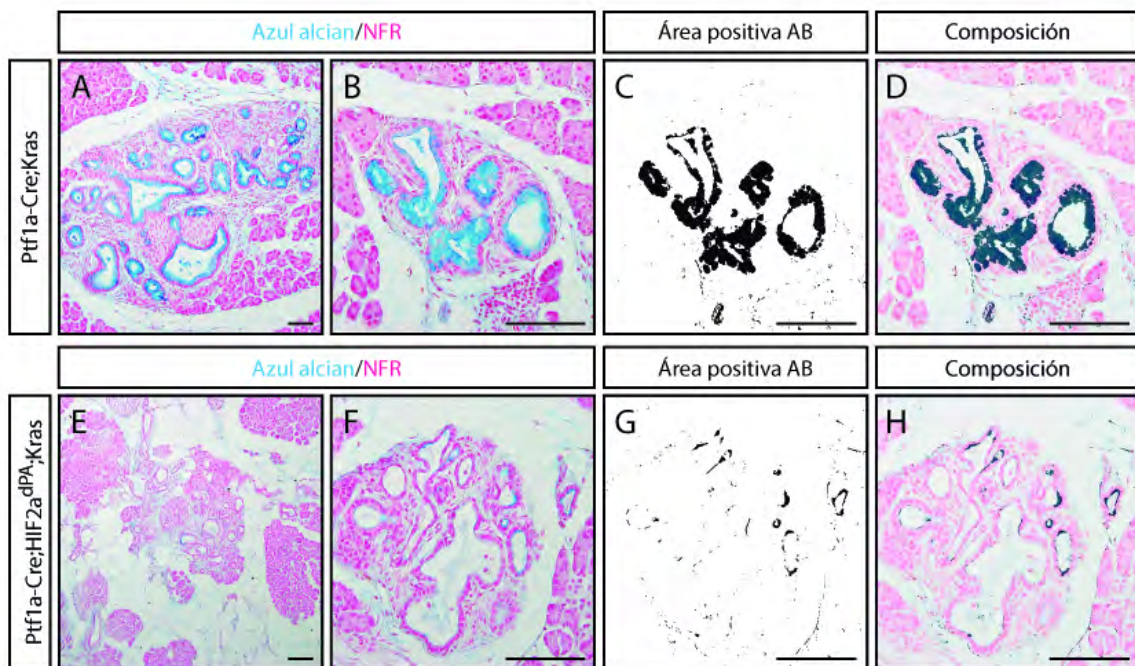


Figura R30. Ausencia de lesiones PanIN en los páncreas de ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA;Kras*. (A, B, E, F) Tinción con azul alcian, contrateñida con NFR de secciones de páncreas de ratones *Ptfla-Cre;Kras* y ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. (A, B) Las lesiones PanIN de los ratones *Ptfla-Cre;Kras* muestran un acúmulo elevado de mucinas en las células epiteliales que la componen. (E, F) Las lesiones preneoplásicas de los ratones no muestran mucinas en el citoplasma de sus células epiteliales. (C, G) Las máscaras binarias obtenidas tras el análisis morfométrico de las imágenes de

secciones completas de páncreas representan el área positiva para azul alcian. (D, H) Composición representativa del análisis de las imágenes de las lesiones preneoplásicas para facilitar su visualización. Barras de escala en A y E, 100 μm ; en B-D, F-H, 20 μm . (I) Cuantificación del porcentaje de área de mucinas (positivas para AB) respecto al área pancreática total en ratones *Ptfla-Cre;Kras* y ratones *Ptfla-Cre;HIF2dPA;Kras* de 2 y 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. *** $P < 0.001$.

Se realizó un estudio cuantitativo de la proliferación existente en los páncreas de los diferentes genotipos a los 6 meses de edad utilizando Ki67 como marcador específico de célula en división (Fig. R31A-B). Las lesiones PanIN muestran unos niveles de expresión de Ki67 proporcionales al estadio en el que se encuentre, es decir, las lesiones PanIN de bajo grado muestran un nivel proliferativo moderado o bajo, el cual aumenta en lesiones PanIN de alto grado²⁴². No se observó un aumento en la proliferación en los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* respecto a los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R31C). Se detectó una tasa de proliferación baja en las células epiteliales de las lesiones PanIN, mientras que el estroma adyacente mostraba unos niveles moderados de expresión de Ki67. Analizamos también diferentes inhibidores de las ciclinas dependiente de quinasas como p16, p21 o p27, las cuales han sido propuestas como controladores del desarrollo de PDAC dirigido por *KRAS*²⁴³. Se encontró un número mayor de células con localización nuclear de p16 en las lesiones de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, en comparación con las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R31D-F). Sin embargo, el número de células con acumulación nuclear de p21 y p27 fue similar entre las lesiones preneoplásicas de ambos grupos (Fig. R31G-L). Estos resultados son consistentes con la ausencia de expansión de las lesiones neoplásicas detectadas en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*.

En su conjunto, estos resultados demuestran que la acumulación de HIF-2 α en el tejido exocrino, en un contexto oncológico de sensibilización por una mutación en *Kras*, no induce la formación de lesiones preneoplásicas ni promueve su expansión. Además, las lesiones pancreáticas detectadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* no son histológicamente compatibles con las lesiones PanIN.

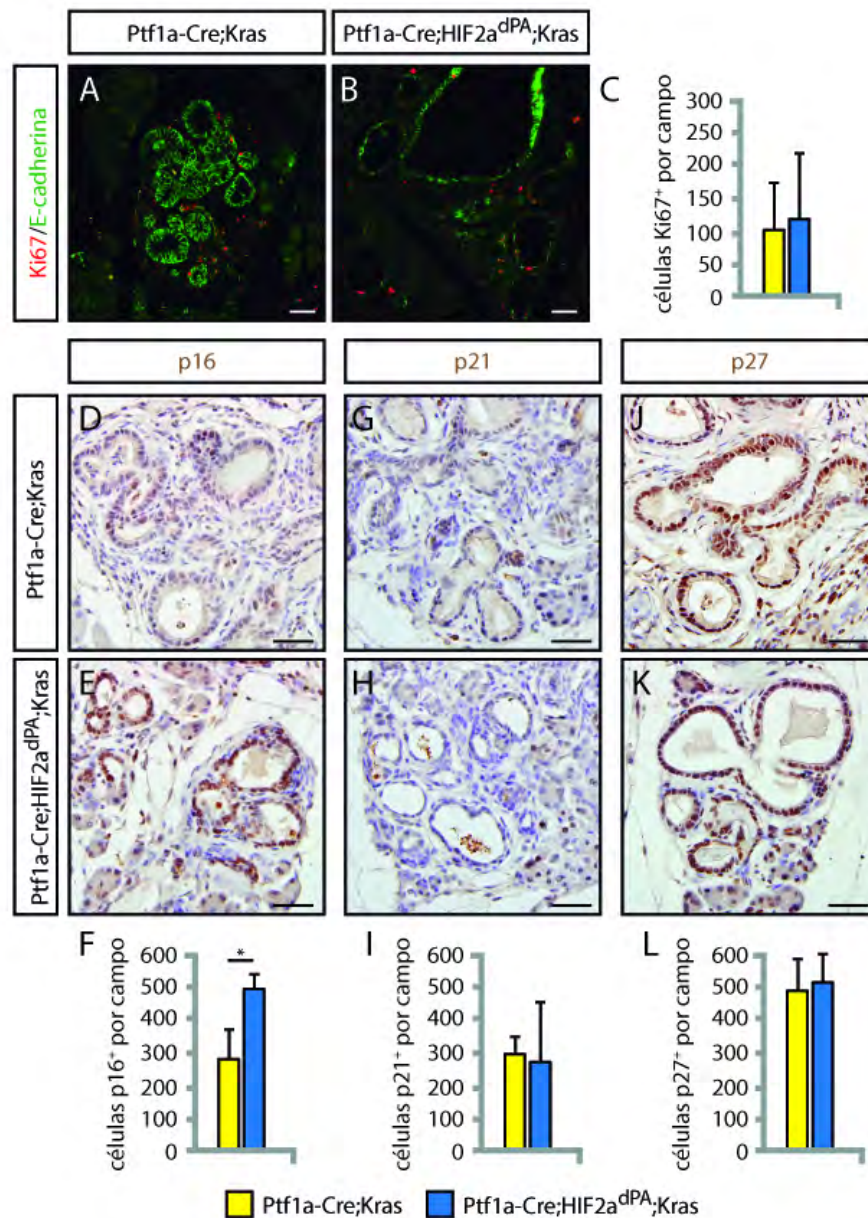


Figura R31. Análisis de la proliferación y de controladores del ciclo celular en páncreas adultos de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*. (A, B) Análisis de inmunofluorescencias de Ki67 con un marcador de epitelio pancreático, E-cadherina, en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Barras de escala en A, B, 100 μ m. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. (C) Cuantificación del porcentaje total de células positivas para Ki67 por campo en páncreas de 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. Inmunohistoquímicas con p16 (D, E), p21 (G, H) y p27 (J, K) en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Barras de escala en D-K, 50 μ m. Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. Representación gráfica de las cuantificaciones del número total de células positivas por campo para p16 (F), p21 (I) y p27 (L) en secciones de páncreas a 6 meses de edad. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. * $P \leq 0.05$.

18. Caracterización histológica de las lesiones preneoplásicas detectadas en el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* adultos

Debido a los hallazgos histológicos que demuestran que las lesiones detectadas en los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* no son compatibles con lesiones PanIN propiamente dichas, propusimos la realización de una caracterización histológica detallada de estas lesiones. La mucina-1 se expresa en la membrana apical y basolateral de células centroacinares y en células que componen pequeños y grandes ductos²⁴⁴. Al igual que en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, las lesiones tubulares analizadas en los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, estaban compuestas por una capa de células de naturaleza ductal, rodeadas por una capa de células endoteliales (Fig. R32B). Estas lesiones se asemejan histológicamente a las lesiones quísticas descritas en el modelo *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y en pacientes con la enfermedad de VHL. Sin embargo, las lesiones PanIN observadas en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* muestran una capa de células de naturaleza ductal con expresión moderada de mucina-1, no están rodeadas por una capa de células endoteliales, observándose solo un limitado número de ellas dispersas en el estroma de la lesión (Fig. R32A).

Otra característica identitaria de las lesiones PanIN es la ausencia de ciliogénesis en las células que componen la lesión²⁴⁵. Los ductos interlobulares de tejido histológicamente normal de ratones *HIF2dPA* mostraron una acumulación de tubulina acetilada elevada pero variable. Como se ha descrito en estudios previos, las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* mostraron una pérdida masiva de los cilios primarios (Fig. R32C). Sin embargo, el ensayo de inmunofluorescencia mostró que las lesiones analizadas en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* presentan un elevado número de cilios primarios (Fig. R32D) al igual que las lesiones descritas en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, no siendo detectadas lesiones con ausencia de cilios. Además, las células epiteliales de las lesiones preneoplásicas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* expresaban marcadores típicos de células ductales como la lectina DBA (Fig. R32F), mientras que las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* solo mostraban un limitado número de células dispersas con positividad para DBA

(Fig. R32E). Se detectó un aumento significativo de *PSC* activadas en el estroma de las lesiones PanIN de ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, detectadas como células con altos niveles de α -SMA, en comparación con las lesiones de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (Fig. R32E, F), cuyas lesiones presentaban un limitado componente estromal.

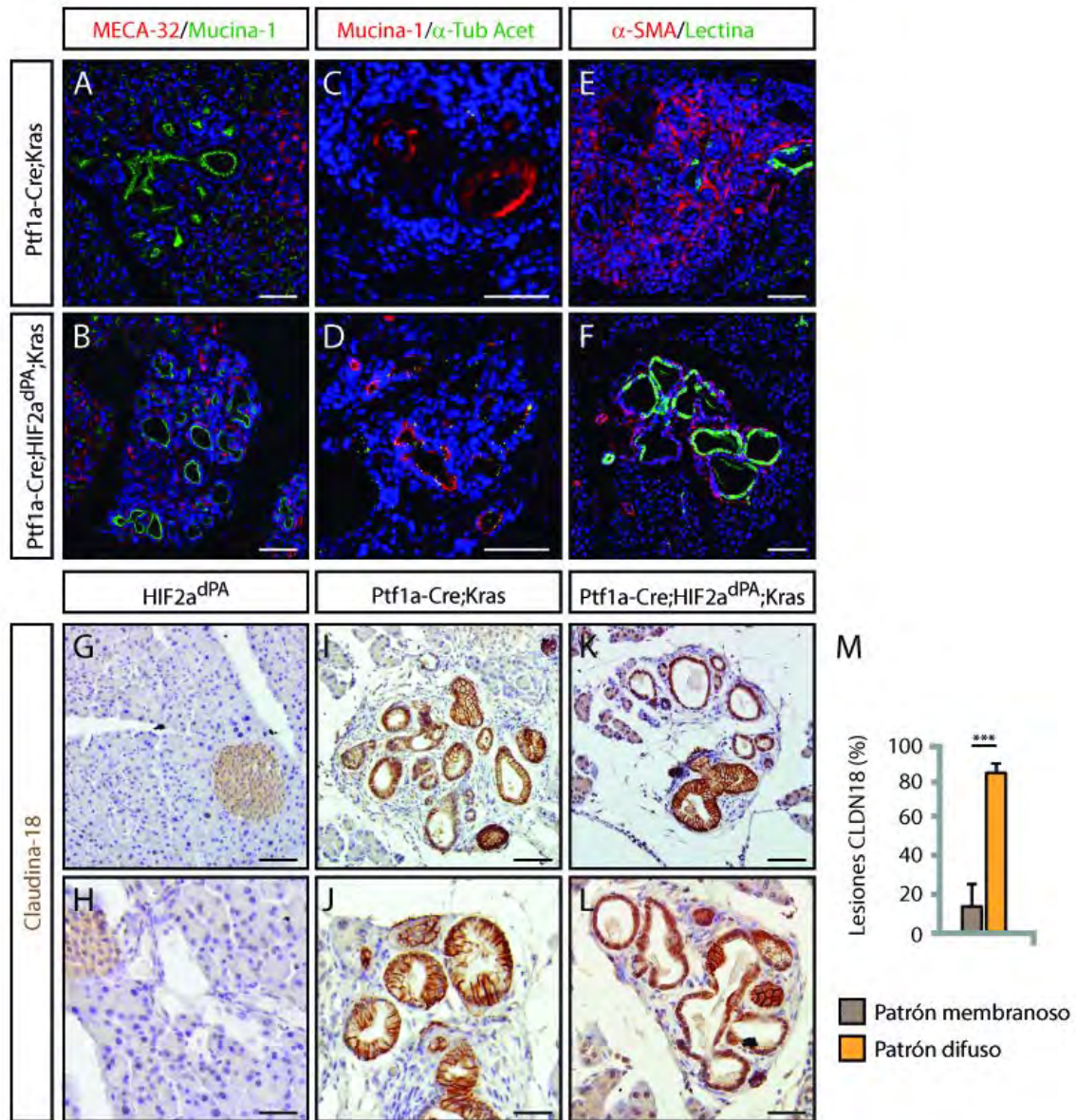


Figura R32. Caracterización de las lesiones preneoplásicas observadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* adultos. (A, B) Análisis de inmunofluorescencia de MECA-32 y mucina-1 en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. (A) Solo un limitado número de células endoteliales se observan en el estroma de las lesiones PanIN de ratones *Ptf1a-Cre;Kras*. (B) Una capa de células endoteliales rodean el epitelio de naturaleza ductal de las lesiones

descritas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* adultos. (C, D) Inmunofluorescencia con α -tubulina acetilada para teñir los cilios primarios. Se utilizó mucina-1 (en rojo) para marcar el epitelio ductal. Las lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (D) presentan cilios primarios mientras que están ausentes en las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (I). (E, F) Análisis de inmunofluorescencia de α -SMA y lectina DBA en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. (G-L) Inmunohistoquímica con Claudina-18 (CLDN18) en secciones de páncreas de ratones controles, en ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Las lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (K, L) presentan patrones diferentes de expresión de CLDN18 mientras que en las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* conservan un patrón membranoso definido (I-J). Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. (M) Cuantificación del porcentaje total de lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* con patrón membranoso o difuso. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. Barras de escala, 100 μ m. *** $P \leq 0.001$.

Uno de los eventos cruciales en etapas tempranas de la carcinogénesis pancreática, es el cambio fenotípico ocurrido en el epitelio pancreático al adquirir características típicas de epitelio gástrico²⁴⁶. Diferentes publicaciones han indicado que las lesiones PanIN y los PDAC muestran un nivel de expresión de Claudina-18 (CLDN18), una proteína de adhesión específica de estómago y pulmón, responsable de mantener la polaridad epitelio-endotelio²⁴⁷. Como era esperable, no se detectó expresión de CLDN18 en el epitelio de los ductos pancreáticos de ratones *HIF2dPA* controles, ni tampoco señal destacable en otros compartimentos pancreáticos (Fig. R32G, H). Se observó expresión de CLDN18 en la mayoría de las lesiones PanIN analizadas en los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, independientemente de su grado histológico (Fig. R32I, J). La tinción de CLDN18 se localiza en la membrana basolateral, no detectándose señal en la cara apical de la membrana ni en el citoplasma. Las células acinares, los islotes pancreáticos y los fibroblastos mesenquimales que rodean las lesiones PanIN de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* no mostraron expresión detectable para CLDN18 (Fig. R32I, J), coincidiendo con lo descrito en la literatura²⁴⁸. Las lesiones neoplásicas descritas en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraron un nivel de expresión de CLDN18 similar al observado en las lesiones PanIN características de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R32K, L). Sin embargo, CLDN18 mostró un patrón variable de expresión, pudiendo diferenciar diferentes

tipos de lesiones tubulares según la localización de CLDN18, distribuidas de manera dispersa por el tejido exocrino de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (Fig. R32K, L). Unas lesiones mostraron CLDN18, principalmente, en la membrana basolateral, sin señal detectable en la región apical ni en el citoplasma, similar al patrón típico de lesiones PanIN (Fig. R32K). Por otro lado, otras lesiones mostraron un patrón difuso de CLDN18, detectándose señal mayoritariamente en el citoplasma de las células epiteliales, deslocalizándose la señal de la membrana (Fig. R32K). Algunas lesiones mostraron un patrón mixto de expresión, encontrándose células con expresión membranosa intercaladas entre células con expresión citoplasmática difusa de CLDN18 (Fig. R32L). Se cuantificó el número de lesiones según la localización de CLDN18. En ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad, se detectó un número significativamente superior de lesiones con expresión citoplasmática difusa, siendo bajo el número de lesiones neoplásicas con un patrón membranoso bien definido de CLDN18 (Fig. R32M).

Considerando estos resultados, nos planteamos si la deslocalización citoplasmática de CLDN18 podía indicar un defecto generalizado en localización de proteínas de adhesión. Así, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra otras proteínas de adhesión y marcadores de membrana basolateral como E-cadherina y β -catenina. La expresión de E-cadherina mostró un patrón membranoso bien definido en el tejido endocrino, en las células ductales y en las células acinares tanto de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* como de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (Fig. R33A-B). Además, a diferencia de CLDN18, la tinción de E-cadherina no reveló deslocalización ni alteración sustancial de su patrón de expresión en las células epiteliales de las lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (Fig. R33B). De igual manera, las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* mostraron un patrón membranoso de E-cadherina, sin deslocalización citoplasmática aparente (Fig. R33A), confirmando su carácter epitelial.

Por otra parte, β -catenina, además de actuar de proteína de adhesión y estar implicada en la adhesión célula-célula, juega un papel fundamental en la cascada de señalización de la ruta canónica de Wnt y su desregulación es característica en múltiples tumores humanos²⁴⁹. Un análisis confocal de

inmunofluorescencia con los marcadores β -catenina y CLDN18 en los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, reveló que todas las células epiteliales, incluyendo ductos metaplásicos y lesiones PanIN, mostraban un nivel de β -catenina elevado, manteniendo una localización exclusivamente membranosa, colocalizando en su totalidad con el marcador CLDN18 (Fig. R33C-E). De igual manera, β -catenina no mostró acumulación citoplasmática en las lesiones preneoplásicas encontradas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, manteniendo su carácter membranoso incluso en las células epiteliales donde se observó deslocalización de CLDN18 (Fig. R33F-H).

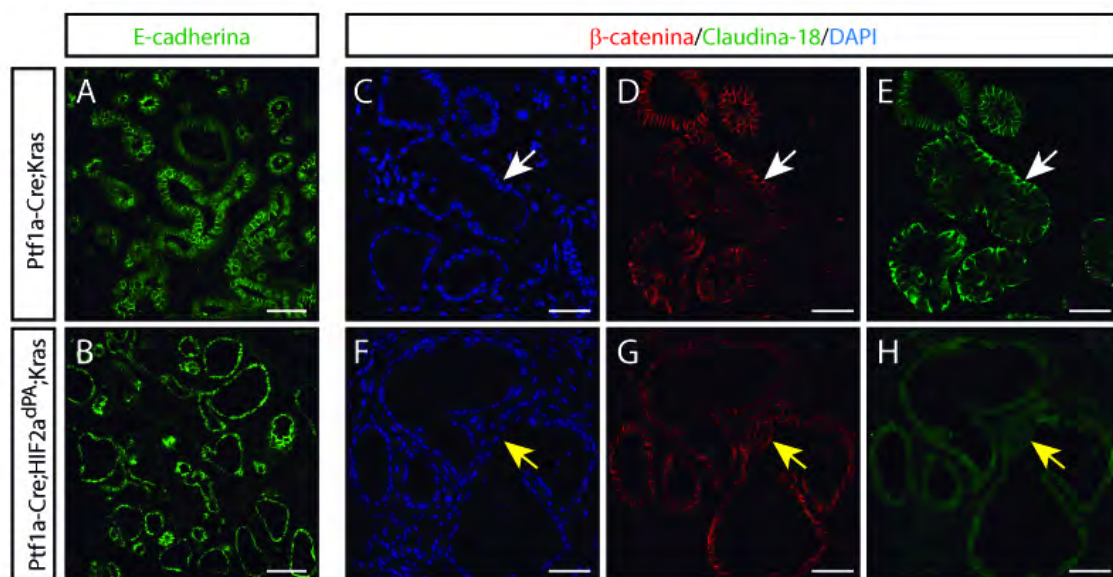


Figura R33. Las lesiones preneoplásicas observadas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* adultos muestran una deslocalización selectiva de CLDN18. (A, B) Análisis de inmunofluorescencia de E-cadherina en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. (C-H) Análisis de la colocalización de β -catenina y CLDN18 en el epitelio de las lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Se utilizó DAPI (en azul) para marcar los núcleos celulares. Las flechas blancas en C-E muestran una completa colocalización de β -catenina y CLDN18 en la membrana de las células que componen el epitelio de las lesiones PanIN en ratones *Ptf1a-Cre;Kras*. Las flechas amarillas en F-H muestran una deslocalización de CLDN18 hacia el citoplasma de las células que componen el epitelio de las lesiones preneoplásicas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, mientras que β -catenina conserva un patrón membranoso bien definido. Barras de escala en A, B, 100 μ m; en C-H, 20 μ m.

19. Rutas moleculares alteradas en las lesiones preneoplásicas tras la estabilización de HIF-2 α en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*

La proteína *Kras* activa diferentes rutas efectoras *downstream*. Como comentamos en el bloque anterior de resultados, una de las rutas efectoras más estudiadas es la cascada de señalización MAPK. Esta ruta se encuentra altamente activada en células cancerosas pancreáticas y se ha demostrado que es responsable de promover la formación de lesiones PanIN al inducir la dediferenciación de las célula acinares hacia células de naturaleza ductal que son sensible a la transformación cancerosa²³⁹. Tras una activación oncogénica de *Kras*, se desencadena una cascada de fosforilaciones en la ruta RAF-MEK1/2 que puede desembocar en la fosforilación de la quinasa regulada por señal extracelular, ERK1/2. Así, se produce la translocación de ERK1/2 al núcleo celular donde promueve la transcripción y la progresión en el ciclo celular²⁵⁰. Además, los eventos de daño pancreático, como la pancreatitis, provocan un aumento de expresión de pERK (forma fosforilada y activa de ERK, con capacidad de translocarse al núcleo) en el tejido afectado²⁵¹.

Para analizar el nivel de activación de la ruta MAPK, evaluamos el nivel de expresión de pERK en secciones de tejido pancreático de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y *Ptf1a-Cre;Kras* de 6 meses de edad. No se detectó expresión de pERK en células acinares compactas ni en células ductales de individuos controles *HIF2dPA*. Sin embargo, aunque el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* no mostró señal de pERK detectable, se observó un aumento del nivel de expresión de pERK en las células acinares adyacentes a las lesiones PanIN descritas (Fig. R34A, B). Además, un alto porcentaje de las células del epitelio de las lesiones de PanIN de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* mostraron niveles elevados de pERK en el núcleo (Fig. R34A, B). En el caso de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, se observaron dos grupos de lesiones que, aunque clasificadas con el mismo grado histológico, mostraron diferentes patrones de expresión de pERK (Fig. R34C-D). Un primero grupo de lesiones preneoplásicas, presentó un alto número de células con un nivel de expresión elevado de pERK nuclear, intercaladas con escasas células sin señal aparente (Fig. R34C). Por otro

lado, encontramos un grupo de lesiones donde el epitelio de la lesión no mostraba expresión de pERK (Fig. R34C, D). Estas lesiones carentes de expresión de pERK en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* fueron significativamente más abundantes que las lesiones que presentaban un elevado número de células epiteliales con un nivel de pERK moderado o alto (Fig. R34E).

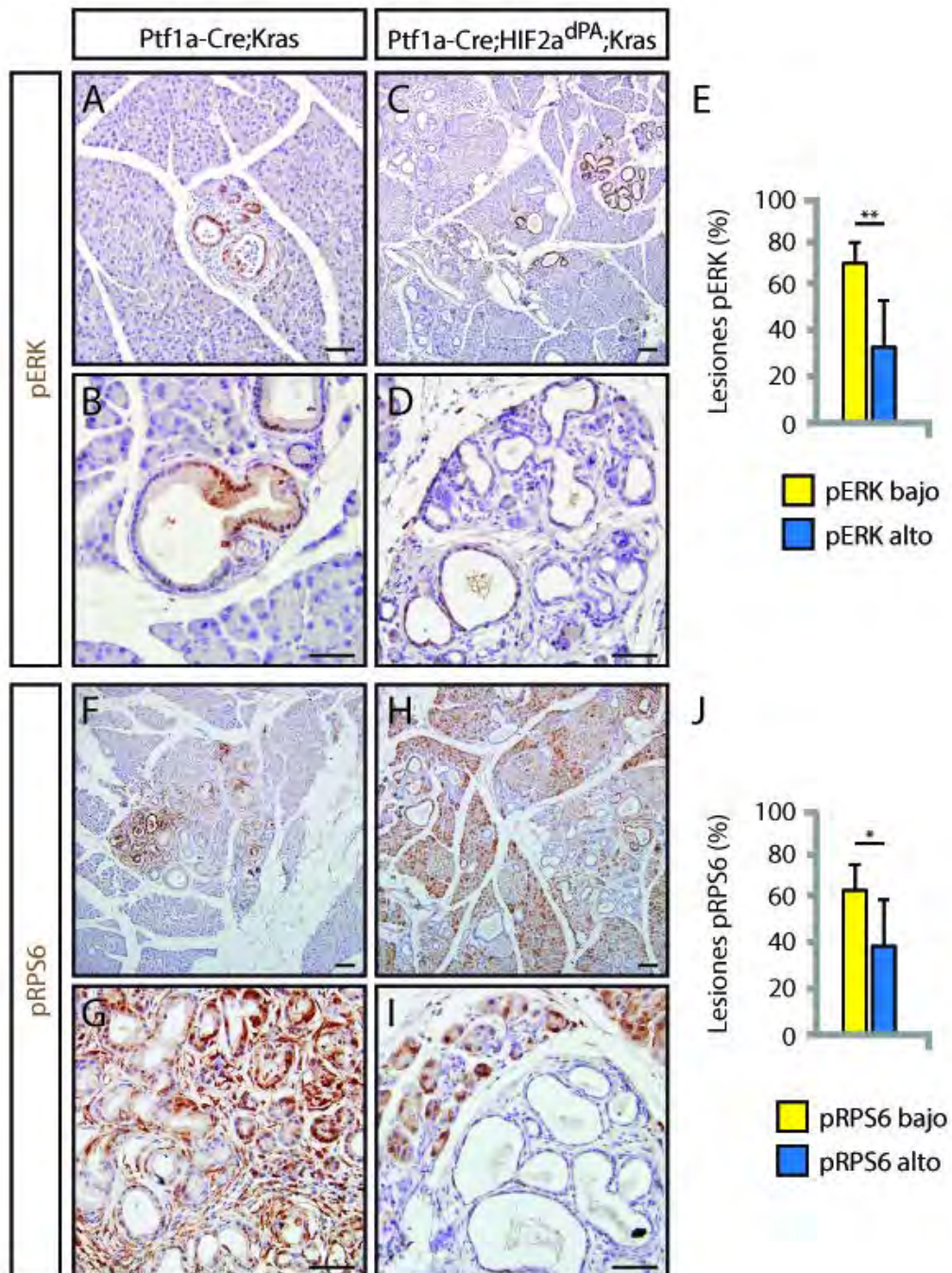


Figura R34. La estabilización específica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos del linaje exocrino en un contexto oncogénico altera múltiples rutas metabólicas en el tejido exocrino adulto. (A-D) Inmunohistoquímica de pERK en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. Las lesiones preneoplásicas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (C, D) presentan patrones diferentes de expresión de pERK mientras que en las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* conservan un nivel de pERK elevado (A-B). (M) Cuantificación del porcentaje total de lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* con nivel de expresión de pERK alto y bajo. (F-I) Inmunohistoquímica de pRPS6 en secciones de páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* de 6 meses de edad. El tejido exocrino de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (H) presentan un nivel de expresión elevado en comparación con el tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* (F). Las lesiones preneoplásicas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* (H, I) presentan patrones diferentes de expresión de pRPS6, mientras que en las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras* conservan un nivel de pRPS6 elevado en el epitelio de las lesiones y en el estroma adyacente (F-G). Se utilizó hematoxilina para contrateñir los núcleos celulares. (J) Cuantificación del porcentaje total de lesiones preneoplásicas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* con nivel de expresión de pRPS6 alto y bajo. Los datos se han representado como la media \pm desviación estándar. Barras de escala en A-L, 100 μ m. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Otra de las rutas implicadas en la compleja red de señalización que se ve alterada por una activación oncogénica de *Kras*, es la ruta PI3K/AKT. La ruta PI3K regula multitud de procesos relacionados con la progresión del cáncer, como el crecimiento celular, entrada en ciclo celular, supervivencia y metabolismo celular²⁵². Uno de los mayores efectores de la señalización mediada por PI3K es la serina/treonina quinasa mTOR. Para determinar el estado de la ruta mTOR en el páncreas de ratones *Kras* tras la activación ectópica de HIF-2 α , se tiñeron con pRPS6 (proteína ribosómica S6 fosforilada) los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* y ratones *Ptf1a-Cre;Kras* de 6 meses de edad (Fig. R34F-I). Las lesiones PanIN de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* muestran una moderada expresión de pRPS6, tanto en las células epiteliales de las lesiones como en el componente estromal, donde encontramos gran cantidad de células mesenquimales con activación de pRPS6 (Fig. R34F, G). Sin embargo, en comparación con los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraron una disminución en la expresión de pRPS6 en un conjunto de las lesiones preneoplásicas localizadas en el tejido exocrino. Esta disminución se detectó tanto en las células epiteliales de las lesiones como en el estroma adyacente (Fig. R34H, I). Cabe destacar, que se identificaron otro

conjunto de lesiones con elevada expresión de pRPS6 en las células epiteliales (Fig. R34H, I). Estas lesiones con expresión destacable de pRPS6 mostraban siempre un estroma muy reactivo a pRPS6 (Fig. R34H). Tras una cuantificación detallada, se determinó que las lesiones con baja expresión de pRPS6 eran significativamente más numerosas que las lesiones con epitelio y estroma con células positivas para pRPS6 (Fig. R34J). La mayoría de las células acinares de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraron un nivel de pRPS6 destacable (Fig. R34H), al igual que en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, mientras que las células acinares del tejido exocrino de ratones *Ptf1a-Cre;Kras* mostraron una clara reducción de la expresión de pRPS6, siendo más representativo en el tejido adyacente a las lesiones (Fig. R34F).

Todos estos resultados, en su conjunto, permiten establecer que la activación de HIF-2 α en páncreas de ratones con *Kras* mutado, induce alteraciones en el patrón de expresión de las rutas de señalización molecular MAPK y AKT/mTOR.

DISCUSIÓN

BLOQUE I. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE HIF-2 α EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO PANCREÁTICO

Estudios previos han establecido un nexo directo entre componentes de la ruta de señalización de respuesta a hipoxia y el desarrollo pancreático¹⁸⁷. La respuesta celular a hipoxia está controlada principalmente por los factores inducibles por hipoxia (HIF), que presentan diferentes subunidades funcionales, incluyendo HIF-2 α . Se ha demostrado que las diferentes subunidades HIF- α se expresan de manera endógena en las células progenitoras pancreáticas. Asimismo, la inactivación de HIF-2 α causa hipoplasia pancreática y defectos en la ramificación del epitelio pancreático de ratones¹⁸⁸. Estos resultados sugieren que HIF-2 α es necesario para el desarrollo embrionario normal del páncreas.

En esta tesis doctoral hemos demostrado que la activación ectópica de HIF-2 α en el páncreas produce graves alteraciones en la homeostasis del tejido exocrino adulto. Para desarrollar este estudio, generamos un modelo de ratón transgénico que expresa de forma específica en el páncreas una forma de HIF-2 α no degradable y estable en condiciones de normoxia. Para activar HIF-2 α específicamente en páncreas, usamos la línea transgénica *Pdx1-Cre*. *Pdx1* se expresa durante las etapas más tempranas del desarrollo pancreático. Existen diferentes líneas de ratones que expresan el gen *Cre* bajo el control del promotor *Pdx1* y cada una presenta ligeras diferencias a nivel de eficiencia y especificidad. En esta tesis, se ha utilizado la línea generada en el laboratorio del Dr. Andrew M. Lowy²⁰⁹, la cual destaca por mostrar una baja o nula expresión en el cerebro, evitando potenciales efectos extrapancreáticos no deseados²¹⁸. Esta línea *Pdx1-Cre* muestra una activación temprana durante la embriogénesis pancreática. Esto es relevante puesto que, por ejemplo, la inactivación de *Vhl* en páncreas muestra tasas de letalidad posnatal muy dispares cuando se utilizan diferentes modelos *Pdx1-Cre* de “activación temprana”¹⁹³ y de “activación más tardía”¹⁹⁴. Estas aparentes discrepancias, probablemente asociadas al momento o al nivel de expresión de la *Cre* de cada línea, muestran la importancia de la selección de un modelo *Cre* apropiado que muestre una escisión eficiente y que afecte a los tipos celulares de interés.

Los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* generados presentan una continua activación de HIF-2 α en todos los tipos celulares pancreáticos. Los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* recién nacidos no tienen defectos pancreáticos aparentes. Estos resultados indican que la sobreexpresión de HIF-2 α en células progenitoras pancreáticas no interfiere con el desarrollo embrionario del páncreas y contrastan con los defectos embrionarios descritos en ratones deficientes en HIF-2 α ¹⁸⁸. Esto demuestra la relevancia del potencial papel que juega HIF-2 α en el mantenimiento de las células progenitoras pancreáticas en un estado indiferenciado, puesto que su ausencia compromete la integridad del epitelio pancreático en desarrollo, mientras que su sobreexpresión no compromete a dichos progenitores ni a su diferenciación.

Tras el nacimiento, los páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* desarrollan múltiples defectos en el tejido exocrino postnatal incluyendo una pérdida gradual de células acinares, eventos de metaplasia acino-ductal, incremento de la vasculogénesis, fibrosis tisular y lipomatosis. A pesar de la reducción masiva del tejido acinar, los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* no presentan alteraciones en el peso corporal en etapas postnatales. Esto no es algo contradictorio puesto que, para desarrollar alteraciones fisiológicas, los niveles de síntesis de enzimas pancreáticas deben reducirse casi por completo²⁵³. Igualmente, aunque los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos muestran una extensa lipomatosis pancreática, para que esta patología resulte en una insuficiencia exocrina debe alcanzar una tasa de reemplazo casi total²⁵⁴.

Los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos desarrollan un fenotipo similar a la pancreatitis, presentando defectos histológicos como pérdida de células acinares, metaplasia acino-ductal, infiltración de células inflamatorias, fibrosis y lipomatosis. Simultáneamente a la atrofia del tejido acinar adulto, se observa un aumento significativo de estructuras tubulares similares a ductos. Estos hallazgos histológicos son similares a un proceso patológico denominado metaplasia acino-ductal (ADM), donde las células acinares se desdiferencian hacia un estadio progenitor y que se caracteriza por la aparición de lesiones tubulares y por la reactivación de factores de transcripción y rutas de señalización típicas del desarrollo embrionario²⁵⁵. Las lesiones ADM se consideran una respuesta adaptativa al daño acinar y son comunes en modelos de daño pancreático

inducidos por químicos, así como en modelos genéticos de ratones deficientes en genes necesarios para la homeostasis del tejido exocrino^{34,256}. En estos modelos murinos, la formación transitoria ADM suele ir asociada a un aumento de la proliferación de las células acinares, sugiriendo que la plasticidad acinar y su habilidad de desdiferenciarse hacia un estadio propio de células progenitoras pancreáticas son procesos clave en la regeneración pancreática. Aunque la proliferación detectada en las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* fue elevada y se detectó un aumento de expresión de múltiples factores de transcripción típicos de células progenitoras pancreáticas, no hubo regeneración tisular destacable. De hecho, los páncreas de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* de 2 meses mostraron una pérdida masiva de células acinares indicando que la sobreactivación de HIF-2 α , aunque activa la proliferación celular, no es suficiente para permitir la regeneración del tejido pancreático.

Coincidiendo con nuestros resultados, se ha descrito que muestras humanas de pancreatitis crónica con altos niveles de HIF-2 α muestran una baja expresión de HIF-1 α ²⁵⁷. Por otra parte, la estabilización de HIF-1 α en modelos murinos, utilizando diferentes líneas *Cre* específicas de páncreas, afecta a la homeostasis del tejido exocrino²⁵⁷. Todos estos resultados, unidos a la ausencia de expresión de HIF-1 α en los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, sugieren un efecto específico de la activación de la subunidad HIF-2 α y el desarrollo de la pancreatitis.

Las rutas Notch, Wnt o Hh juegan un papel esencial en la pancreatitis aguda tal y como se ha observado en diferentes modelos de animales transgénicos. Estas rutas se sobreactivan transitoriamente en las células acinares dañadas durante el desarrollo de la pancreatitis y, de hecho, la reducción de su actividad, vía eliminación genética de sus mediadores o vía inhibición farmacológica, produce defectos en la regeneración acinar^{227,236,258}. No hemos realizado un estudio pormenorizado de los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones de la plasticidad acinar detectados en ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, sin embargo, en las células acinares no se detecta sobreactivación de Hes1, factor de transcripción clave de la ruta Notch, ni se observa un aumento de la actividad nuclear de β -catenina, indicativo de la

activación de la vía canónica Wnt. Estos resultados indican que la estabilización de HIF-2 α en páncreas no estimula la activación de rutas implicadas en la regeneración acinar y que la adquisición transitoria de un estado progenitor no se debe a la desregulación de vías de señalización normalmente ausentes de las células acinares.

Estudios previos con modelos animales de daño acinar han demostrado, mediante la realización de experimentos de trazado de linaje, la existencia de eventos de transdiferenciación de células acinares a células similares a ductos¹⁰⁰. Debido a que el transgén *Pdx1-Cre* se expresa en la totalidad de los progenitores pancreáticos, no pudimos utilizar técnicas de trazado de linaje fiables para determinar si las células similares a ductos detectadas en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* tenían un origen acinar. Sin embargo, no detectamos células que coexpresaran simultáneamente marcadores acinares y ductales en los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* que pudiera sugerir un proceso de transdiferenciación activo. Estas observaciones, junto al aumento de apoptosis en células acinares y la elevada proliferación del compartimento ductal de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos, parecen indicar que la expansión del componente ductal no se debe a procesos de transdiferenciación acino-ductal, sino a un simple reemplazo de un tipo celular por otro. Sin embargo, se necesitarían estudios de trazado de linajes genéticos para concluirlo categóricamente.

El aumento de la apoptosis en las células acinares de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos podría explicar la pérdida masiva de células acinares. En este sentido, aunque algunos estudios han considerado a HIF-2 α un factor principalmente promotor de la supervivencia y la proliferación celular²²⁴, otros estudios han descrito que la sobreexpresión de HIF-2 α induce la apoptosis celular en neoplasias como carcinomas hepatocelulares²⁵⁹ o glioblastomas²⁶⁰. Sin embargo, debemos señalar que el efecto proapoptótico de la sobreexpresión de HIF-2 α en las células acinares de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* podrían ser una consecuencia indirecta al daño tisular provocado por la pancreatitis asociada. De acuerdo con esta posibilidad, observamos que en los páncreas de ratones adultos se acumula clusterina, una proteína sintetizada en respuesta al estrés celular. Esta proteína ha sido asociada a funciones biológicas contradictorias como supervivencia celular, progresión tumoral, resistencia a tratamiento o

apoptosis²⁶¹. Estas funciones aparentemente contradictorias han sido asociadas a la existencia de dos isoformas proteicas. Una de ellas, nCLU, ha sido asociada a la activación de la señalización de la apoptosis, la inhibición del crecimiento celular y la supervivencia a través de la activación de *TP53*²⁶². El anticuerpo comercial utilizado para identificar la clusterina detectada en las células acinares de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* no permite diferenciar entre sus isoformas. El estudio de *TP53* en secciones de páncreas podría aclarar el mecanismo implicado en la activación de la apoptosis pancreática.

Diferentes estudios han demostrado que HIF-2 α , al contrario que HIF-1 α , promueve el crecimiento tumoral en otras patologías como las neoplasias renales²⁶³. HIF-2 α promueve el crecimiento tumoral en estas neoplasias renales mediante la represión de diferentes inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas como p21, p27 o p16, induciendo la progresión en el ciclo celular²²⁴. Estas quinasas no son dianas directas de HIF-2 α , sin embargo, su expresión cambia a través de la modulación del protooncogén c-Myc, capaz de reprimir sus promotores^{264,265}. En los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos se detecta un aumento de la expresión de c-Myc en el núcleo de las células acinares concomitante a un aumento de la expresión de p21, pero no de p16 y p27. Estos resultados no son contradictorios, puesto que a pesar de que la activación de p21 ha sido descrita como un mecanismo clave en el arresto del ciclo celular²⁶³, su sobreexpresión también se ha asociado a la reducción de la formación de lesiones ADM *in vitro*²⁶⁶. De acuerdo con estos estudios previos, el incremento de actividad de p21 en las células acinares podría ser suficiente para limitar la transdiferenciación acinar y la progresión de las lesiones ADM. Por todo ello, y aunque sea necesario un estudio molecular más detallado, podemos sugerir la existencia de una relación entre la estabilización de HIF-2 α y la hiperproliferación del tejido exocrino mediada a través de la modulación de c-Myc. Sin embargo, no podemos obviar que el incremento de expresión de c-Myc es un fenotipo común desarrollado en la mayoría de neoplasias y que, además, c-Myc se expresa normalmente en las células acinares⁷⁴.

Las lesiones túbulo-ductales detectadas en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos se asemejan histológicamente a los adenomas quísticos o microquísticos encontrados en los páncreas de pacientes VHL²³², las cuales se caracterizan por

un incremento de la vascularización, la presencia de un marcado componente estromal y por carecer de estructuras papilares y de componentes mucinosos en su epitelio. Estas lesiones pancreáticas presentes en pacientes VHL son predominantemente asintomáticas y, a diferencia de lo que observamos en nuestro modelo *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, no están asociadas a una pérdida de tejido acinar. Solo se han informado casos puntuales de pancreatitis en pacientes VHL donde ocurre una pérdida masiva de células acinares secundaria asociada a obstrucciones del conducto pancreático principal. Estas discrepancias en el fenotipo pancreático entre el modelo transgénico y los pacientes VHL puede deberse a las diferencias en los niveles de activación de los factores HIF- α . Así, en el modelo animal conseguimos una amplia activación de HIF-2 α en todo el tejido pancreático desde estadios tempranos del desarrollo embrionario. Sin embargo, en pacientes VHL la activación indirecta de HIF- α , provocada por la inactivación de *Vhl*, ocurre de manera local en determinadas regiones del tejido pancreáticos y, probablemente, en estadios temporales diferentes. De acuerdo con esta hipótesis, el modelo animal de inactivación específica en páncreas de *Vhlh* desarrolla lesiones quistes pancreáticos, pérdida de tejido exocrino y reemplazamiento por tejido graso¹⁹³. A diferencia de nuestro modelo, estas lesiones solo fueron descritas en ratones mutantes de muy avanzada edad, nunca en individuos jóvenes. Esta aparente incongruencia podría deberse a diferencias en la especificidad y/o en los niveles de activación de HIF-2 α obtenidos en nuestro modelo o a algún efecto compensatorio producido por la sobreactivación de HIF-1 α asociada a la inactivación de *Vhlh*. También cabe destacar el sesgo de observación existente en el modelo de delección pancreática de *Vhlh*, puesto que presenta una gran letalidad perinatal, por lo que los análisis se realizaron en los pocos individuos supervivientes que alcanzaron edades avanzadas y que, probablemente, tenían niveles más leves de activación de HIF- α en el tejido exocrino¹⁹⁶. Por todo ello, sería interesante analizar el patrón de expresión de los diferentes factores HIF- α que podrían estar activados en las lesiones pancreáticas de pacientes VHL y así discernir el papel biológico de cada subunidad HIF- α .

Se ha descrito que pVHL contribuye al mantenimiento y la estabilidad de los cilios primarios en las células renales²⁶⁷. Además, los quistes renales presentes

en pacientes VHL pierden los cilios primarios²⁶⁸. Hasta el momento, no se ha descrito que exista esta ausencia de cilios en los quistes pancreáticos de pacientes VHL²⁶⁹. Los defectos en el páncreas exocrino de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos, de hecho, son similares a los observados en modelos transgénicos con defectos en la formación de cilios primarios²³³. Sin embargo, no se observaron defectos en la formación de los cilios primarios ni en las células ductales ni en las células epiteliales de las lesiones ADM de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Esto indica que la estabilización de HIF-2 α en el páncreas no compromete la integridad de los cilios primarios. Apoyando esta idea, estudios previos han descrito que es la actividad de HIF-1 α , y no la de HIF-2 α , es relevante para la formación de los cilios primarios dependiente de VHL²⁶⁸.

La caracterización molecular de los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* ha permitido asociar la desorganización acinar a alteraciones de las rutas de señalización celular MAPK y AKT/mTOR. Ambas vías de señalización juegan un papel relevante en la homeostasis de las células acinares en situaciones de respuesta a daño celular. Está bien establecido en el campo que la ruta MAPK es necesaria para la desdiferenciación de células acinares a células similares a ductos²³⁹. De acuerdo con esta hipótesis, detectamos en los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos una sobreexpresión de pERK en regiones de acinos desorganizados. Además, esta sobreexpresión de pERK también se pudo observar en el estroma de las lesiones metaplásicas, fenómeno descrito en estudios previos con presencia de fibrosis asociada a la formación de cáncer de páncreas²⁷⁰. De igual manera, detectamos alteraciones de la ruta AKT/mTOR en los páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* adultos, observándose una disminución de los niveles de pRPS6 en los acinos desorganizados. Se ha descrito que pRPS6, efector de la ruta mTOR, está implicado en la formación y expansión de las lesiones ADM²⁴⁰. Además, se ha descrito una disminución de los niveles de pRPS6 en células acinares en modelos de animales con delección de un regulador esencial de la diferenciación y función de las células acinar como *Ptf1a*²⁷¹. De hecho, los eventos de degeneración del tejido exocrino postnatal descritos en los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*, son similares a los defectos observados en los modelos de ratones deficientes en diferentes factores de transcripción

fundamentales para la formación de las células acinares y el mantenimiento de su identidad como *MIST1*, *NR5A2*, *PTF1A* o *GATA6*²⁷¹⁻²⁷⁴.

Puesto que se han publicado varios estudios que establecen una relación entre las vías de señalización celular MAPK, AKT/mTOR y HIF-2 α en distintos tipos celulares^{275,276}, podemos plantear la posibilidad de que exista un nexo causal entre la estabilización de HIF-2 α en el páncreas de ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* y la alteración de la homeostasis de las células acinares a través de estas rutas moleculares. Sin embargo, se debe considerar que todas las características asociadas a la pérdida de células acinares (disminución de la expresión de amilasa, defectos en la organización del acino, deslocalización de marcadores apicales de células acinares o incremento de los marcadores ductales) pueden ser efectos secundarios provocados por el daño acinar y por el estadio inflamatorio sistémico, al igual que en otros modelos animales de pancreatitis.

Los severos defectos del compartimento exocrino no parecen afectar al tejido endocrino de los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Estudios previos mostraron que ratones con una mutación en *Vhlh* específicamente en páncreas tienen defectos en la homeostasis de la glucosa, desarrollando una hipoglucemia severa y defectos en la secreción de insulina y glucagón^{196,277}. A pesar de que no se ha realizado una caracterización detallada de la homeostasis de la glucosa, los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mostraron niveles normales de glucosa en condiciones basales y no se detectaron defectos en la arquitectura del islote pancreático. Esta discrepancia puede deberse a las diferencias en la sobreexpresión de las distintas subunidades HIF- α existentes entre los ratones mutantes *Vhlh* y los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. Así, los defectos en el metabolismo de la glucosa de ratones con mutaciones en *Vhlh* específicamente en célula β son dependientes de HIF-1 α , puesto que su inactivación restaura la homeostasis de la glucosa^{278,279}. Estos resultados sugieren que la sobreactivación de HIF-2 α en el páncreas no altera de manera relevante la homeostasis de la glucosa, coincidiendo con estudios previos similares²¹⁹. Sin embargo, otros estudios en modelos murinos proponen que la estabilización de HIF-2 α induce el desarrollo de DT3c, una patología asociada a la pancreatitis crónica. Estos ratones, a pesar de presentar islotes morfológicamente normales, presentan

defectos en la tolerancia a la glucosa y en la secreción de insulina²⁵⁷. Estas discrepancias podrían deberse, entre otros factores, a que nuestros estudios se han concentrado en edades tempranas, pudiendo necesitarse un periodo más largo para desarrollar este fenotipo.

Nuestros estudios sugieren que la sobreactivación de HIF-2 α en páncreas podría representar un nuevo modelo de pancreatitis y atrofia acinar. Sin embargo, para discernir el papel de HIF-2 α en la homeostasis de las células acinares adultas se debería utilizar modelos inducibles para lograr la activación de HIF-2 α en diferentes etapas temporales del desarrollo de las células acinares.

BLOQUE II. EFECTO DE LA SOBREATIVACIÓN DE HIF-2 α EN UN CONTEXTO ONCOGÉNICO Y SU PAPEL EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

Los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA* no desarrollaron tumores en el páncreas lo que sugiere que la sobreactivación de HIF-2 α en el páncreas no es suficiente para desarrollar tumores pancreáticos. Sin embargo, los estudios realizados se centraron en ratones jóvenes (con un máximo de 8 semanas de edad) y, por tanto, se necesitaría analizar individuos de edad más avanzada. De forma paralela, consideramos la posibilidad de evaluar el efecto de la sobreactivación de HIF-2 α en un contexto de sensibilización oncogénica.

Para examinar esta idea, en primer lugar, generamos un modelo que permitiese el estudio del efecto de la estabilización de HIF-2 α específicamente en el compartimento exocrino, utilizando una línea transgénica *Ptf1a-Cre*. Esta línea pretende eludir los posibles fenotipos producidos por la activación tan temprana presente en la línea *Pdx1-Cre*. En este sentido, en nuestras manos, la línea *Ptf1a-Cre* no mostró actividad apreciable durante los primeros estadios del desarrollo embrionario¹⁹⁶. Sin embargo, la escisión en células acinares es muy robusta, destacando como una herramienta apropiada para evaluar el efecto de la sobreexpresión de HIF-2 α en células acinares maduras. Sorprendentemente, encontramos que los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* muestran un fenotipo muy leve

en comparación a los ratones *Pdx1-Cre;HIF2dPA*. A pesar de que se detectó una robusta acumulación de HIF-2 α en las células acinares de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA*, no se detectaron defectos apreciables en la homeostasis del tejido exocrino hasta edades avanzadas (6 meses de edad) y sólo de forma localizada. En cualquier caso, los pequeños focos de lesiones encontrados en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* reafirman que la sobreactivación de HIF-2 α en tejido exocrino produce unas lesiones túbulo-ductales similares histológicamente a los adenomas quísticos o microquísticos encontrados en pacientes VHL²³², mostrando la disposición característica del tejido endotelial típica de estas lesiones y careciendo de estructuras papilares y de componentes mucinosos. Sin embargo, la acumulación de HIF-2 α en estos ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* no se asoció ni a eventos masivos de metaplasia acino-ductal ni al desarrollo de otras características propias de pancreatitis.

Nuestros resultados indican que la activación de HIF-2 α durante el desarrollo temprano del páncreas interfiere con la homeostasis del tejido exocrino, mientras que la activación en el linaje de células acinares apenas afecta al desarrollo del tejido exocrino. Es posible que sea debido a que la activación de HIF-2 α utilizando la línea *Pdx1-Cre* se produce durante un estadio en el que las células acinares son más inmaduras y sensibles a alteraciones moleculares de la ruta HIF.

Recientemente, se ha descrito el potencial papel de HIF-2 α en la formación de cáncer pancreático. Se ha demostrado que HIF-2 α se expresa en lesiones preneoplásicas pancreáticas tempranas pero su expresión disminuye gradualmente durante la progresión a estadios cancerosos más avanzados²⁰⁸. Por otra parte, la inactivación de HIF-2 α limita la progresión de lesiones PanIN en modelos murinos de cáncer de páncreas inducido por *Kras*²⁰⁸. Estos antecedentes nos llevaron a plantear la hipótesis de que HIF-2 α podría tener un papel relevante en la iniciación o expansión temprana de la vía de señalización oncogénica de *Kras*.

Para comprobar esta hipótesis, generamos un modelo de tumorigénesis pancreática mediada por la activación oncogénica de *Kras* simultánea a una estabilización de HIF-2 α en células acinares. La sobreexpresión de HIF-2 α en

células acinares no causa un aumento en las lesiones metaplásicas provocadas por la activación de *Kras*, ya fuesen lesiones tubulares o lesiones PanIN. Tampoco se detecta un aumento de la expansión de células ductales ni eventos de transdiferenciación. Es decir, la expansión y progresión de las lesiones preneoplásicas fue similar en ratones *Kras* y ratones *Kras* con una sobreactivación de HIF-2 α . Esta incidencia en las lesiones se analizó en ratones con sobreactivación de HIF-2 α en células acinares maduras, no durante el desarrollo embrionario pancreático temprano. Como se ha comentado anteriormente, HIF-2 α juega un papel relevante durante etapas tempranas del desarrollo pancreático en la expansión del epitelio pancreático y su ramificación¹⁸⁸. Por ello, la ausencia de fenotipo en un modelo como el *Ptf1a-Cre;HIF2dPA* puede deberse a que la activación de HIF-2 α no provoca esas alteraciones durante la organogénesis y evita los posibles efectos deletéreos en el tejido acinar adulto, el cual es el origen mayoritario de las lesiones PanIN⁷⁷.

El análisis histológico preliminar de los páncreas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* revela lesiones similares a las lesiones PanIN que se encuentran en ratones *Ptf1a-Cre;Kras*. Sin embargo, estas lesiones pancreáticas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* no mostraban la acumulación típica de mucinas en el citoplasma que muestran las lesiones PanIN mediadas por la activación de *Kras*. Para identificar las lesiones PanIN se ha utilizado tradicionalmente la tinción azul alcian que tiñe las mucinas y parece ser un marcador suficientemente preciso para analizar la frecuencia de lesiones PanIN en modelos animales⁷⁷. Sin embargo, esta tinción de azul alcian puede estar presente en lesiones similares a ductos sin características neoplásicas y, al contrario, puede estar ausente en lesiones PanIN de alto grado^{100,101}. Además, el estudio pormenorizado de las imágenes obtenidas de secciones completas de páncreas de ratones, evita cualquier tipo de sesgo o diferencia que pueda erradicar en la diferente proporción de células acinares o ductales que puedan presentar los diferentes individuos.

Para descartar una posible baja sensibilidad de las tinciones utilizadas, para complementar el análisis de las lesiones PanIN, se utilizaron marcadores moleculares como CLDN18, que se expresa típicamente en estómago y pulmones, y que recientemente ha sido descrito como un marcador específico de lesiones

preneoplásicas en estadios tempranos de desarrollo²⁸⁰. Estudios previos han definido que la expresión de CLDN18 en lesiones PanIN de alto grado de displasia es limitada y con un patrón de intensidad débil²⁴⁸ y se ha relacionada la pérdida de su expresión al desarrollo agresivo de tumores gástricos²⁸¹. Sin embargo, en las lesiones ductales de nuestro modelo *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, el nivel de intensidad de CLDN18 es moderado o alto, aunque con un patrón de localización difuso. Esto confirma que las lesiones preneoplásicas halladas en los páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mantienen un componente de malignidad muy limitado y que la activación de HIF-2 α no provoca una progresión en el grado de displasia de las mismas. Sorprendentemente, estudios previos han definido que CLDN18 no muestra expresión detectable en lesiones ADM²⁴⁸, lo que lleva a concluir que las lesiones halladas en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* son de naturaleza similar a las lesiones PanIN, pero con cambios moleculares relevantes.

La activación robusta de la ruta Wnt/ β -catenina ha sido asociada con el desarrollo de PDAC²²⁷. Además, se ha observado que tanto los PDAC como las lesiones PanIN muestran acumulación de β -catenina y activación de los genes diana de la ruta Wnt²⁸². Sin embargo, a pesar de que se alteraron marcadores de membrana como CLDN18, no se detectó un cambio de patrón de expresión de β -catenina, manteniéndose íntegra y estable en la membrana de las células acinares de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*. Estos datos resultaron llamativos, puesto que se ha descrito que la inactivación de HIF-2 α limita la progresión de las lesiones PanIN modulando la expresión de la ruta Wnt, en un modelo similar al que hemos utilizado de activación oncogénica de *Kras*²⁰⁸. Curiosamente, tampoco se detecta acumulación de β -catenina en las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*. Esto puede resultar algo contradictorio puesto que se ha descrito que la pérdida de VHL es uno de los fenómenos iniciales en la progresión de las lesiones metaplásicas a lesiones PanIN de bajo grado, lo que conlleva un aumento endógeno de HIF-2 α promoviendo la expresión de β -catenina²⁸³. Sin embargo, también se ha descrito que la activación continua de HIF-2 α puede impedir que β -catenina alcance los niveles necesarios para modular la progresión de las lesiones PanIN²²⁷. Al contrario, otros grupos publicaron mientras se realizaban las investigaciones de esta tesis, que la sobreactivación de HIF-2 α en presencia del oncogén *Kras*, a través de la

activación de Wnt e independientemente a la acumulación de β -catenina, induce la formación de MCN²⁵⁷. A falta de un análisis exhaustivo de la ruta Wnt y de sus genes diana, no podemos descartar que nuestro modelo produzca una activación aberrante de la vía de señalización Wnt en edades más avanzadas y que las lesiones detectadas se diferencien a MCN u otro tipo de lesión.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los cilios primarios tienen una función más allá de su componente estructural siendo considerados en la actualidad nodos de señalización que modulan diferentes vías de señalización de factores de crecimiento²⁸⁴. En situaciones fisiopatológicas como el cáncer, las células pierden los cilios primarios. Así, se ha descrito que las células pancreáticas cancerosas y las lesiones PanIN halladas en modelos murinos de cáncer mediado por *Kras* no tienen cilios primarios²⁴⁵. Sin embargo, las lesiones ADM, tanto en pacientes con pancreatitis crónica como en diferentes modelos animales tiene cilios primarios en sus células epiteliales²³³. Contrastando con la ausencia de cilios en las lesiones PanIN de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*, las lesiones neoplásicas de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* mostraron abundantes cilios primarios morfológicamente normales. Esto podría indicar que HIF-2 α bloquea la inhibición de la formación de los cilios primarios producida por la activación oncogénica de *Kras*.

Está bien establecido que la pancreatitis crónica es un factor de riesgo para el desarrollo de PDAC²⁸⁵. De hecho, en modelos animales se ha observado que el desarrollo de pancreatitis (por ejemplo, de forma química) en presencia de la activación oncogénica de *Kras* promueve la tumorigénesis pancreática²²⁷. Los eventos inflamatorios asociados a pancreatitis en diferentes modelos animales *in vivo*, promueven una sobreexpresión de la ruta MAPK en células acinares²⁸⁶. La activación de la ruta MAPK en páncreas, detectada mediante el análisis de la fosforilación de su efector ERK, es transitoria y se reduce durante la regeneración acinar tras la pancreatitis²⁸⁷. En nuestro caso, encontramos una reducción drástica de la expresión de pERK en el páncreas de ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*, en comparación con la elevada expresión observada en los páncreas de los ratones *Ptf1a-Cre;Kras*. Sin embargo, esta reducción de la ruta MAPK no resulta en una regresión en la diferenciación de las lesiones preneoplásicas ni afecta a la expansión de las mismas, a diferencia del fenotipo

descrito en modelos de cáncer de páncreas donde se inhibe directamente la ruta MAPK en páncreas²³⁹. Además, la reducción de los niveles de pERK en el epitelio de las lesiones tubulares de los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* no se ve compensada por una activación de pERK en el estroma adyacente, el cual se encuentra claramente disminuido en ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras*. Esta activación de MAPK en el estroma, provocada por un incremento de la actividad de células mieloides, se ha descrito que es necesaria para inducir los procesos de regeneración pancreática²⁷⁰. Por todo ello, nuestros datos demuestran que HIF-2 α no inhibe la ruta MAPK de manera suficiente para alterar la progresión de las lesiones preneoplásicas ni provoca un microambiente inflamatorio que promueva la transformación cancerosa mediada por la ruta ERK²⁴¹.

Del mismo modo, encontramos defectos en la expresión del efector de la ruta mTOR, pRPS6, en los ratones *Ptf1a-Cre;HIF2dPA;Kras* a edades avanzadas. Algunos estudios han mostrado que pRPS6 está implicado en el desarrollo de cáncer de páncreas²⁴⁰. El patrón de expresión de pRPS6 detectado en nuestros ratones *Ptf1a-Cre;Kras* difiere ligeramente de lo descrito en la literatura, mostrando una tinción uniforme en el tejido acinar pero con una intensidad moderada. Además, pRPS6 muestra un moderado nivel de activación en las lesiones ADM, en lesiones PanIN y, sobre todo, en el estroma adyacente²⁸⁸. Esto indica que la activación oncogénica de *Kras* activa la ruta mTOR en este compartimento, fosforilando sus efectores. Sin embargo, la sobreexpresión de HIF-2 α en el páncreas de ratones sensibilizados por *Kras* reduce la expresión epitelial de pRPS6, indicando que HIF-2 α no promueve la activación de la ruta mTOR en un contexto oncogénico. Estos resultados pueden ir en sintonía con estudios previos que describen que, aunque la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α son dependientes de mTOR en neoplasias renales, muestran diferente relación con los componentes de mTOR, mTORC1 y mTORC2²⁷⁶. En el caso de estas neoplasias renales, HIF-2 α está relacionada preferentemente con mTORC2, mientras que HIF-1 α es dependiente de ambos complejos. Por este motivo, puede que el uso del anticuerpo comercial frente a pRPS6, que detecta actividad de la rama mTORC1, no nos permita evaluar de manera fiable la posible alteración que provoque HIF-2 α en la ruta mTOR. Deberíamos evaluar otros marcadores que detecten actividad de la rama mTORC2.

Aunque no se detectaron defectos masivos en la homeostasis del compartimento exocrino ni hiperproliferación celular en los ratones con estabilización de HIF-2 α y la activación oncogénica de *Kras*, se detectaron ciertas alteraciones en diferentes reguladores del ciclo celular como p16, el cual se encuentra sobreexpresado. El inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p16 ha sido propuesto como una barrera frente a la progresión del desarrollo de PDAC mediado por *Kras*²⁴³. También se ha descrito un aumento de p16 en las lesiones PanIN resultantes de una delección de factores del complejo Rictor de mTORC2 *in vivo*, mientras que no se alteraban los niveles de p21 ni p27²⁸⁹. En este mismo estudio, los autores muestran que los niveles de p21 y p27 aumentaron significativamente en ratones de edades avanzadas, por lo que no podemos descartar un desarrollo similar en las lesiones de los ratones *Ptfa-Cre;HIF2dPA;Kras*. Estos resultados pueden explicar los niveles limitados de proliferación y de progresión hacia estadios de malignidad elevada.

Todos estos datos en conjunto indican que la sobreactivación de HIF-2 α en un contexto prooncogénico no induce la expansión, la diferenciación ni la formación de lesiones preneoplásicas en el páncreas exocrino. Por el contrario, HIF-2 α induce una serie de alteraciones moleculares en las lesiones preneoplásicas produciendo un cambio en su identidad. Para profundizar en el desarrollo de estas lesiones y en su progresión se deberían analizar ratones de edades más avanzadas. En particular, esto permitiría establecer de forma concluyente si estas lesiones similares a las PanIN también inducen la formación de carcinomas.

CONCLUSIONES

1. La activación ectópica de HIF-2 α en progenitores pancreáticos no afecta a la diferenciación o formación del páncreas durante el desarrollo embrionario, pero interfiere con el desarrollo posnatal del tejido exocrino.
2. La sobreactivación de HIF-2 α en el páncreas causa un fenotipo similar a la pancreatitis, incluyendo pérdida masiva de células acinares, desarrollo de metaplasia acino-ductal, infiltración de células inflamatorias, fibrosis tisular y lipomatosis.
3. La estabilización de HIF-2 α en células progenitoras aumenta la vascularización del tejido exocrino pancreático adulto.
4. La activación ectópica de HIF-2 α causa lesiones en el tejido exocrino que son histológicamente similares a los adenomas microquísticos serosos que se pueden encontrar en páncreas de pacientes VHL.
5. La activación de HIF-2 α interfiere con la polaridad apical-basal de las células acinares.
6. La sobreexpresión de HIF-2 α en el páncreas produce alteraciones en los niveles de las rutas MAPK y AKT/mTOR en las regiones afectadas del tejido exocrino, así como la activación de proteínas de respuesta a estrés celular.
7. La estabilización de HIF-2 α en progenitores pancreáticos no afecta a la formación o función del páncreas endocrino.
8. La activación ectópica de HIF-2 α específicamente en el linaje de células acinares no afecta de forma severa a la homeostasis del tejido exocrino adulto.

9. La activación ectópica de HIF-2 α simultánea a la activación del gen *Kras* en el linaje de células acinares no promueve el desarrollo de lesiones cancerosas.

10. La acumulación de HIF-2 α afecta a la formación de lesiones PanIN inducidas por *Kras*, de tal manera que, aunque morfológicamente son similares a las lesiones PanIN clásicas, no expresan marcadores típicos de estas lesiones preneoplásicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y. & Han, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **48**, e219 (2016).
2. Villasenor, A., Chong, D. C., Henkemeyer, M. & Cleaver, O. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development* **137**, 4295–4305 (2010).
3. Merino, P. L. H. & Slack, J. M. W. Developmental biology of the pancreas. *Cell Biochem. Biophys.* **40**, 127–142 (2004).
4. Tosti, L. *et al.* Single-Nucleus and In Situ RNA–Sequencing Reveal Cell Topographies in the Human Pancreas. *Gastroenterology* **160**, 1330–1344.e11 (2021).
5. Egozi, A., Bahar Halpern, K., Farack, L., Rotem, H. & Itzkovitz, S. Zonation of Pancreatic Acinar Cells in Diabetic Mice. *Cell Rep.* **32**, 108043 (2020).
6. Krapp, A. *et al.* The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J.* **15**, 4317–4329 (1996).
7. Lemercier, C., To, R. Q., Swanson, B. J., Lyons, G. E. & Konieczny, S. F. Mist1: A novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern. *Dev. Biol.* **182**, 101–113 (1997).
8. Böck, P., Abdel-Moneim, M. & Egerbacher, M. Development of pancreas. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 374–383 (1997).
9. Grapin-Botton, A. Ductal cells of the pancreas. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 504–510 (2005).
10. Kobayashi, H. *et al.* Lectin as a marker for staining and purification of embryonic pancreatic epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 691–697 (2002).
11. Bouwens, L. Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. *J. Pathol.* **184**, 234–239 (1998).
12. Inada, A. *et al.* Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19915–19919 (2008).
13. Reichert, M. & Rustgi, A. K. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J. Clin. Invest.* **121**, 4572–4578 (2011).
14. Delaspre, F. *et al.* Centroacinar cells are progenitors that contribute to endocrine pancreas regeneration. *Diabetes* **64**, 3499–3509 (2015).
15. Ghaye, A. P. *et al.* Progenitor potential of nkx6.1-expressing cells throughout zebrafish life and during beta cell regeneration. *BMC Biol.* **13**, 1–24 (2015).
16. Beer, R. L., Parsons, M. J. & Rovira, M. Centroacinar cells: At the center of pancreas regeneration. *Dev. Biol.* **413**, 8–15 (2016).
17. Dorrell, C. *et al.* Human islets contain four distinct subtypes of β cells. *Nat. Commun.* **7**, 1–9 (2016).
18. Cabrera, O. *et al.* The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2334–2339 (2006).
19. Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K. & Hara, M. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* **2**, 135–145 (2010).
20. Puri, S. & Hebrok, M. Cellular plasticity within the pancreas--lessons

- learned from development. *Dev. Cell* **18**, 342–356 (2010).
21. Sussel, L. *et al.* Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic β cells. *Development* **125**, 2213–2221 (1998).
 22. Kataoka, K. *et al.* MafA is a glucose-regulated and pancreatic β -cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 49903–49910 (2002).
 23. Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T. & Edlund, H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*. **385**, 257–260 (1997).
 24. St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. & Gruss, P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature*. **387**, 406–409 (1997).
 25. Dolenšek, J., Rupnik, M. S. & Stožer, A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* **7**, 2–9 (2015).
 26. Watanabe, T., Yaegashi, H., Koizumi, M., Toyota, T. & Takahashi, T. The lobular architecture of the normal human pancreas: A computer-assisted three-dimensional reconstruction study. *Pancreas* **15**, 48–52 (1997).
 27. Watanabe, S., Abe, K., Anbo, Y. & Katoh, H. Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation: A qualitative and quantitative histological study. *Arch. Histol. Cytol.* **58**, 365–374 (1995).
 28. Rahier, J., Goebbels, R. M. & Henquin, J. C. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* **24**, 366–371 (1983).
 29. Jo, J., Moo, Y. C. & Koh, D. S. Size distribution of mouse Langerhans islets. *Biophys. J.* **93**, 2655–2666 (2007).
 30. Erlandsen, S. L., Hegre, O. D., Parsons, J. A., McEvoy, R. C. & Elde, R. P. Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the d cell. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 883–897 (1976).
 31. Cook, M. *The anatomy of the laboratory mouse*. (Academic Press, 1965).
 32. Murakami, T. *et al.* The Insulo-Acinar Portal and Insulo-Venous Drainage Systems in the Pancreas of the Mouse, Dog, Monkey and Certain Other Animals: A Scanning Electron Microscopic Study of Corrosion Casts. *Archives of Histology and Cytology*. **56**, 127–147 (1993).
 33. Treuting, P. M., Clifford, C. B., Sellers, R. S. & Brayton, C. F. Of mice and microflora: Considerations for genetically engineered mice. *Vet. Pathol.* **49**, 44–63 (2012).
 34. Murtaugh, L. C. & Keefe, M. D. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 229–249 (2015).
 35. Jennings, R. E. *et al.* Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes* **62**, 3514–3522 (2013).
 36. Zorn, A. M. & Wells, J. M. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 221–251 (2009).
 37. Hald, J. *et al.* Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development. *J. Histochem. Cytochem.* **56**, 587–595 (2008).
 38. Gittes, G. K. Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Dev. Biol.* **326**, 4–35 (2009).

39. Pan, F. C. & Wright, C. Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Dev. Dyn.* **240**, 530–565 (2011).
40. Zhou, Q. *et al.* A Multipotent Progenitor Domain Guides Pancreatic Organogenesis. *Dev. Cell* **13**, 103–114 (2007).
41. Seymour, P. A. *et al.* SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1865–1870 (2007).
42. Maestro, M. A. *et al.* Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3307–3314 (2003).
43. Gu, G., Dubauskaite, J. & Melton, D. A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447–2457 (2002).
44. Benitez, C. M., Goodyer, W. R. & Kim, S. K. Deconstructing pancreas developmental biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–17 (2012).
45. Cano, D. A., Soria, B., Martín, F. & Rojas, A. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2383–2402 (2014).
46. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).
47. Offield, M. F. *et al.* PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**, 983–995 (1996).
48. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. & Edlund, H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. **371**, 606–609 (1994).
49. Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K. & Edlund, H. β -cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the β -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* **12**, 1763–1768 (1998).
50. Kawaguchi, Y. *et al.* The role of the transcriptional regulator *Ptf1a* in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* **32**, 128–134 (2002).
51. Sarwar, N. *et al.* Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* **375**, 2215–2222 (2010).
52. Willcox, A., Richardson, S. J., Bone, A. J., Foulis, A. K. & Morgan, N. G. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **155**, 173–181 (2009).
53. Notkins, A. L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J. Biol. Chem.* **277**, 43545–43548 (2002).
54. Florez, J. C., Hirschhorn, J. & Altshuler, D. The Inherited Basis of Diabetes Mellitus: Implications for the Genetic Analysis of Complex Traits. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* **4**, 257–291 (2003).
55. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2643–2653 (2005).
56. Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. & Michels, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet* **383**, 69–82 (2014).

57. Soriguer, F. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: The Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88–93 (2012).
58. Eckel, R. H., Scott M Grundy & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 1415–1428 (2005).
59. Canivell, S. & Gomis, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun. Rev.* **13**, 403–407 (2014).
60. Zeggini, E. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **40**, 638–645 (2008).
61. Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D. & Brunetti, A. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *J. Endocrinol. Invest.* **40**, 899–909 (2017).
62. Thanabalasingham, G. & Owen, K. R. Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). *BMJ* **343**, 1–9 (2011).
63. Maassen, J. A. *et al.* Mitochondrial diabetes and its lessons for common Type 2 diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 819–823 (2006).
64. Hart, P. A. *et al.* Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 226–237 (2016).
65. Yadav, D. & Lowenfels, A. B. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* **144**, 1252–1261 (2013).
66. Lankisch, P. G., Apte, M. & Banks, P. A. Acute pancreatitis. *Lancet* **386**, 85–96 (2015).
67. Kleeff, J. *et al.* Chronic pancreatitis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 1–18 (2017).
68. Beyer, G., Habtezion, A., Werner, J., Lerch, M. M. & Mayerle, J. Chronic pancreatitis. *The Lancet.* **396**, 499–512 (2020).
69. Gardner, T. B. *et al.* ACG Clinical Guideline: Chronic Pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **115**, 322–339 (2020).
70. Pinho, A. V. *et al.* Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut* **60**, 958–966 (2011).
71. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D. A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature* **455**, 627–632 (2008).
72. Li, W. *et al.* In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *Elife* **2014**, 1–20 (2014).
73. Shen, C. N., Horb, M. E., Slack, J. M. W. & Tosh, D. Transdifferentiation of pancreas to liver. *Mech. Dev.* **120**, 107–116 (2003).
74. Bonal, C. *et al.* Pancreatic Inactivation of c-Myc Decreases Acinar Mass and Transdifferentiates Acinar Cells Into Adipocytes in Mice. *Gastroenterology* **136**, 309–319.e9 (2009).
75. Means, A. L. *et al.* Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* **132**, 3767–3776 (2005).
76. Storz, P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 296–304 (2017).
77. Kopp, J. L. *et al.* Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic

- Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 737–750 (2012).
78. Brune, K. *et al.* Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 1067–1076 (2006).
79. Nagtegaal, I. D. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* **76**, 182–188 (2020).
80. Rahemtullah, A., Misdraji, J. & Pitman, M. B. Adenosquamous Carcinoma of the Pancreas: Cytologic Features in 14 Cases. *Cancer* **99**, 372–378 (2003).
81. Tarabay, J., Li, X. & Chandan, V. S. Adenosquamous carcinoma of the pancreas. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **44**, 796–798 (2020).
82. Hruban, R. H. & Adsay, N. V. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum. Pathol.* **40**, 612–623 (2009).
83. Scholten, L., Van Huijgevoort, N. C. M., Van Hooft, J. E., Besselink, M. G. & Del Chiaro, M. Pancreatic cystic neoplasms: Different types, different management, new guidelines. *Visc. Med.* **34**, 173–177 (2018).
84. Bramis, K. *et al.* Serous cystadenocarcinoma of the pancreas: Report of a case and management reflections. *World J. Surg. Oncol.* **10**, 51 (2012).
85. Van Dyke, T. J., Johlin, F. C., Bellizzi, A. M. & Howe, J. R. Serous Cystadenocarcinoma of the Pancreas: Clinical Features and Management of a Rare Tumor. *Dig. Surg.* **33**, 240–248 (2016).
86. Lowery, M. A. *et al.* Acinar Cell Carcinoma of the Pancreas: New Genetic and Treatment Insights into a Rare Malignancy. *Oncologist* **16**, 1714–1720 (2011).
87. Al-Hader, A., Al-Rohil, R. N., Han, H. & Von Hoff, D. Pancreatic acinar cell carcinoma: A review on molecular profiling of patient tumors. *World J. Gastroenterol.* **23**, 7945–7951 (2017).
88. Jiao, Y. *et al.* Whole-exome sequencing of pancreatic neoplasms with acinar differentiation. *J. Pathol.* **232**, 428–435 (2014).
89. Ren, B., Liu, X. & Suriawinata, A. A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. *American Journal of Pathology.* **189**, 9–21 (2019).
90. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T. & Takaori, K. Pancreatic cancer. *Lancet* **388**, 73–85 (2016).
91. Puleo, F. *et al.* Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* **155**, 1999–2013.e3 (2018).
92. Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H. & Lucas, A. L. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World J. Gastroenterol.* **20**, 11182–11198 (2014).
93. Lynch, H. T., Brand, R. E., Deters, C. A. & Fusaro, R. M. Update on familial pancreatic cancer. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **3**, 121–128 (2001).
94. De Lechene La Porte, P. *et al.* Involvement of tubular complexes in pancreatic regeneration after acute necrohemorrhagic pancreatitis. *Pancreas* **6**, 298–306 (1991).
95. Willemer, S. & Adler, G. Histochemical and ultrastructural characteristics of tubular complexes in human acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **34**, 46–55 (1989).
96. Bockman, D. E., Boydston, W. R. & Anderson, M. C. Origin of tubular complexes in human chronic pancreatitis. *Am. J. Surg.* **144**, 243–249

- (1982).
97. Bockman, D. E. *et al.* Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rats. *Lab. Investig.* **83**, 853–859 (2003).
 98. Kong, B. *et al.* Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut* **67**, 146–156 (2018).
 99. Esposito, I. *et al.* Hypothetical progression model of pancreatic cancer with origin in the centroacinar-acinar compartment. *Pancreas* **35**, 212–217 (2007).
 100. Strobel, O. *et al.* In Vivo Lineage Tracing Defines the Role of Acinar-to-Ductal Transdifferentiation in Inflammatory Ductal Metaplasia. *Gastroenterology* **133**, 1999–2009 (2007).
 101. Hruban, R. H. *et al.* Pancreatic intraepithelial neoplasia: A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, 579–586 (2001).
 102. Basturk, O. *et al.* A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 1730–1741 (2015).
 103. Hruban, R. H. *et al.* An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 977–987 (2004).
 104. Andea, A., Sarkar, F. & Adsay, V. N. Clinicopathological Correlates of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A Comparative Analysis of 82 Cases With and 152 Cases Without Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* **16**, 996–1006 (2003).
 105. Kim, J. Y. & Hong, S. M. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **41**, 603–610 (2018).
 106. Aichler, M. *et al.* Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: A comparative study in transgenic mice and human tissues. *J. Pathol.* **226**, 723–734 (2012).
 107. Adsay, N. V. *et al.* The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: Differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis. *Modern Pathology.* **15**, 1087–1095 (2002).
 108. Basturk, O. *et al.* Distinct pathways of pathogenesis of intraductal oncocytic papillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Virchows Arch.* **469**, 523–532 (2016).
 109. Maitra, Anirban & Hruban, R. H. Pancreatic cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **3**, 157–188 (2008).
 110. Burk, K. S., Knipp, D. & Sahani, D. V. Cystic Pancreatic Tumors. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* **26**, 405–420 (2018).
 111. Fernández-Del Castillo, C. Mucinous cystic neoplasms. *J. Gastrointest. Surg.* **12**, 411–413 (2008).
 112. Morita, K., Mito, K., Niki, T. & Fukushima, N. Is an atypical flat lesion (AFL) a precursor lesion of the pancreatic ductal adenocarcinoma in human? *Pathol. Int.* **68**, 491–493 (2018).
 113. Gresch, E. E. Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *J. Occup. Environ. Med.* **31**, 815 (1989).
 114. Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J. & Kern, S. E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2969–2972 (2000).

115. Hruban, R. H., Maitra, A. & Goggins, M. Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Definitions* **1**, 306–316 (2008).
116. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 459–465 (2003).
117. Real, F. X. A ‘catastrophic hypothesis’ for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* **124**, 1958–1964 (2003).
118. Real, F. X., Cibrián-Uhalte, E. & Martinelli, P. Pancreatic Cancer Development and Progression: Remodeling the Model. *Gastroenterology* **135**, 724–728 (2008).
119. Faiyaz Notta, Michelle Chan-Seng-Yue, Mathieu Lemire, Yilong Li, Gavin W Wilson, Ashton A Connor, Rob E Denroche, Sheng-Ben Liang, Andrew MK Brown, Jaeseung C Kim, and S. G. A renew model of pancreas cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* **538**, 378–382 (2016).
120. Waddell, N., Pajic, M., Ann-Marie Patch, Biankin, A. V. & Grimmond, S. M. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501 (2015).
121. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
122. Ruan, K., Song, G. & Ouyang, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J. Cell. Biochem.* **107**, 1053–1062 (2009).
123. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
124. Polyak, K., Haviv, I. & Campbell, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* **25**, 30–38 (2009).
125. Vaupel, P., Multhoff, G., Vaupel, P. & Multhoff, G. Hypoxia-/HIF-1 α -Driven Factors of the Tumor Microenvironment Impeding Antitumor Immune Responses and Promoting Malignant Progression Ecto 5'-nucleotidase CD8 + Cytotoxic T cell DC Dendritic cell ENT-1 Equilibrative nucleoside transporter 1 GPR81 G-protein r. **81** (2018).
126. Bhandari, V. *et al.* Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nat. Genet.* **51**, 308–318 (2019).
127. Cassavaugh, J. & Lounsbury, K. M. Hypoxia-mediated biological control. *J. Cell. Biochem.* **112**, 735–744 (2011).
128. Semenza, G. L. Life with oxygen. *Science.* **318**, 62–64 (2007).
129. Taylor, C. T. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem. J.* **409**, 19–26 (2008).
130. Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 285–296 (2008).
131. Pouyssegur, J. & López-Barneo, J. Hypoxia in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **47–48**, 1–2 (2016).
132. Ortega-Sáenz, P. & López-Barneo, J. Physiology of the Carotid Body: From Molecules to Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 127–149 (2020).
133. Mole, D. R. & Ratcliffe, P. J. Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr. Nephrol.* **23**, 681–694 (2008).
134. Semenza, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 551–78 (1999).
135. Kaelin, W. G. & Ratcliffe, P. J. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* **30**, 393–402 (2008).

136. López-Barneo, J. & Simon, M. C. Cellular adaptation to oxygen deficiency beyond the Nobel award. *Nat. Commun.* **11**, 10–12 (2020).
137. Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* **16**, 1151–1162 (2002).
138. Jain, S., Maltepe, E., Lu, M. M., Simon, C. & Bradfield, C. A. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech. Dev.* **73**, 117–123 (1998).
139. Tian, H., McKnight, S. L. & Russell, D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**, 72–82 (1997).
140. Wiesener, M. S. *et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* **17**, 271–273 (2003).
141. Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L. & Bradfield, C. A. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr.* **7**, 205–213 (1998).
142. Bruick, R. K. & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* **294**, 1337–1340 (2001).
143. Ivan, M. *et al.* Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13459–13464 (2002).
144. Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M. & Lee, F. S. Sequence Determinants in Hypoxia-inducible Factor-1 α for Hydroxylation by the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* **277**, 39792–39800 (2002).
145. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
146. Berra, E., Roux, D., Richard, D. E. & Pouyssegur, J. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: Nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep.* **2**, 615–620 (2001).
147. Ema, M. *et al.* Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* **18**, 1905–1914 (1999).
148. Cano, D. A. Célula beta, diabetes y la ruta de hypoxia inducible factor. *Av. en Diabetol.* **29**, 44–49 (2013).
149. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5514 (1995).
150. Ema, M. *et al.* A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4273–4278 (1997).
151. Duan, C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: Complexities and emerging

- themes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **310**, C260–C269 (2016).
152. Michaud, J. L., Derossi, C., May, N. R., Holdener, B. C. & Fan, C. M. ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.* **90**, 253–261 (2000).
153. Keith, B., Adelman, D. M. & Simon, M. C. Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6692–6697 (2001).
154. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399–408 (2012).
155. Schödel, J. *et al.* High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* **117**, 207–218 (2011).
156. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. & Semenza, G. L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 17771–17778 (1996).
157. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613 (1996).
158. Papatreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **3**, 187–197 (2006).
159. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 207–14 (2012).
160. Yamamoto, Y. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **110**, 465–475 (2008).
161. I. Evan, G. & H. Vousden, K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342–348 (2001).
162. Willam, C. *et al.* Peptide blockade of HIF α degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **99**, 10423–10428 (2002).
163. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* **20**, 5197–5206 (2001).
164. Zhou, C. H., Zhang, X. P., Liu, F. & Wang, W. Modeling the interplay between the HIF-1 and p53 pathways in hypoxia. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
165. Linehan, W. M., Lerman, M. I. & Zbar, B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) Gene. Its Role in Renal Cancer. **273**, 564–570 (1995).
166. Clifford, S. C. & Maher, E. R. Von hippel-lindau disease: Clinical and molecular perspectives. *Adv. Cancer Res.* **82**, 85–105 (2001).
167. Safran, M. & Kaelin, W. G. J. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway Find the latest version : HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. **111**, 779–783 (2003).
168. Maher, E. R. *et al.* Clinical features and natural history of von hippel-lindau disease. *Qjm* **77**, 1151–1163 (1990).
169. Traen, S., Seynaeve, P., Cardoen, L., Carels, K. & Lecluyse, C. Central nervous system lesions in von Hippel-Lindau syndrome. *JBR-BTR* **94**, 140–141 (2011).

170. Lonser, R. R. *et al.* Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* **361**, 2059–2067 (2003).
171. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684 (2003).
172. Jagannathan, J., Lonser, R. R., Smith, R., DeVroom, H. L. & Oldfield, E. H. Surgical management of cerebellar hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease. *J. Neurosurg.* **108**, 210–222 (2008).
173. Pause, A., Lee, S., Lonergan, K. M. & Klausner, R. D. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **95**, 993–998 (1998).
174. Gnarr, J. R. *et al.* Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10589–10594 (1996).
175. Ohh, M. *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell* **1**, 959–968 (1998).
176. Iyer, N. V. *et al.* Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* **12**, 149–162 (1998).
177. Compernelle, V. *et al.* Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* **8**, 702–710 (2002).
178. Gnarr, J. R. *et al.* Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9102–9107 (1997).
179. Takeda, K. *et al.* Placental but Not Heart Defects Are Associated with Elevated Hypoxia-Inducible Factor α Levels in Mice Lacking Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8336–8346 (2006).
180. Kim, W. Y. *et al.* Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor α phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J.* **25**, 4650–4662 (2006).
181. Haase, V. H., Glickman, J. N., Socolovsky, M. & Jaenisch, R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel – Lindau tumor suppressor. **98**, (2001).
182. Rankin, E. B., Tomaszewski, J. E. & Haase, V. H. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res.* **66**, 2576–2583 (2006).
183. Webster, W. S. & Abela, D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **81**, 215–228 (2007).
184. Okazaki, K. & Maltepe, E. Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regen. Med.* **1**, 71–83 (2006).
185. Shah, S. R. *et al.* Embryonic mouse blood flow and oxygen correlate with early pancreatic differentiation. *Dev. Biol.* **349**, 342–349 (2011).
186. Richardson, B. S. & Bocking, A. D. Metabolic and circulatory adaptations to chronic hypoxia in the fetus. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **119**, 717–723 (1998).
187. Heinis, M. *et al.* Oxygen tension regulates pancreatic β -cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1 β . *Diabetes* **59**, 662–669 (2010).
188. Chen, H. *et al.* Impaired pancreatic development in Hif2-alpha deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 440–445 (2010).
189. Carlsson, P.-O. & Palm, F. Oxygen tension in isolated transplanted rat

- islets and in islets of rat whole-pancreas transplants. *Transpl. Int.* **15**, 581–585 (2002).
190. Cheng, K. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α regulates β cell function in mouse and human islets. *J. Clin. Invest.* **120**, 2171–2183 (2010).
 191. Lalwani, A. *et al.* β Cell Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Required for the Prevention of Type 1 Diabetes. *Cell Reports*. **27**, 2370–2384.e6 (2019).
 192. Heinis, M. *et al.* HIF1 α and pancreatic β -cell development. *FASEB J.* **26**, 2734–2742 (2012).
 193. Shen, H. C. J. *et al.* Deciphering von hippel-lindau (VHL/Vhl)-associated pancreatic manifestations by inactivating Vhl in specific pancreatic cell populations. *PLoS One* **4**, (2009).
 194. Cantley, J. *et al.* Deletion of the von Hippel-Lindau gene in pancreatic β cells impairs glucose homeostasis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. **119**, 125–135 (2009).
 195. Gannon, M., Shiota, C., Postic, C., Wright, C. V. E. & Magnuson, M. Analysis of the Cre-mediated recombination driven by rat insulin promoter in embryonic and adult mouse pancreas. *Genesis* **26**, 139–142 (2000).
 196. Puri, S., García-Núñez, A., Hebrok, M. & Cano, D. A. Elimination of Von Hippel-Lindau Function Perturbs Pancreas Endocrine Homeostasis in Mice. *PLoS One* **8**, (2013).
 197. Binkovitz, L. A., Johnson, C. D. & Stephens, D. H. Islet cell tumors in von Hippel-Lindau disease: Increased prevalence and relationship to the multiple endocrine neoplasias. *Am. J. Roentgenol.* **155**, 501–505 (1990).
 198. Chittiboina, P. & Lonser, R. R. *Von Hippel-Lindau disease. Handbook of Clinical Neurology.* **132** (Elsevier B.V., 2015).
 199. Hough, D. M., Stephens, D. H., Johnson, C. D. & Binkovitz, L. A. Pancreatic lesions in von Hippel-Lindau disease: Prevalence, clinical significance, and CT findings. *Am. J. Roentgenol.* **162**, 1091–1094 (1994).
 200. Neumann, H. P. H. *et al.* Pancreatic lesions in the von Hippel-Lindau syndrome. *Gastroenterology* **101**, 465–471 (1991).
 201. Mohr, V. H. *et al.* Histopathology and molecular genetics of multiple cysts and microcystic (serous) adenomas of the pancreas in von Hippel-Lindau patients. *Am. J. Pathol.* **157**, 1615–1621 (2000).
 202. Kim, W. Y. & Kaelin, W. G. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4991–5004 (2004).
 203. Mandriota, S. J. *et al.* HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* **1**, 459–468 (2002).
 204. Giatromanolaki, A. *et al.* Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br. J. Cancer* **85**, 881–890 (2001).
 205. Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. HIF-1 α and HIF-2 α sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat. Rev. cancer* **12**, 9–22 (2012).
 206. Lin, F. *et al.* Diagnostic utility of S100P and von Hippel-Lindau gene product (pVHL) in pancreatic adenocarcinoma - With implication of their roles in early tumorigenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 78–91 (2008).
 207. Kizaka-Kondoh, S. *et al.* Selective killing of hypoxia-inducible factor-1-active cells improves survival in a mouse model of invasive and metastatic

- pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3433–3441 (2009).
208. Criscimanna, A. *et al.* PanIN-specific regulation of Wnt signaling by HIF2 α during early pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res.* **73**, 4781–4790 (2013).
 209. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
 210. Ryan, H. E. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Research.* **60**, 4010–4015 (2000).
 211. Lee, K. E. *et al.* Hif1 α deletion reveals pro-neoplastic function of B cells in pancreatic neoplasia. *Cancer Discov.* **6**, 256–269 (2016).
 212. Morris IV, J. P., Wang, S. C. & Hebrok, M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* **10**, 683–695 (2010).
 213. Guerra, C. *et al.* Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* **4**, 111–120 (2003).
 214. Michael W, P. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2002–2007 (2001).
 215. Muñoz-Bravo, J. L. *et al.* Loss of pancreas upon activated Wnt signaling is concomitant with emergence of gastrointestinal identity. *PLoS One* **11**, 1–22 (2016).
 216. Flores-Martínez, A., García-Núñez, A., Rojas, A. & Cano, D. A. Stabilization of HIF-2 α impacts pancreas growth. *Scientific Reports.* **8**, (2018).
 217. Magnuson, M. A. & Osipovich, A. B. Pancreas-specific Cre driver lines and considerations for their prudent use. *Cell Metab.* **18**, 9–20 (2013).
 218. Song, J., Xu, Y., Hu, X., Choi, B. & Tong, Q. Brain expression of Cre recombinase driven by pancreas-specific promoters. *Genesis* **48**, 628–634 (2010).
 219. Brunt, J. J. *et al.* Overexpression of HIF-2 α in pancreatic β cells does not alter glucose homeostasis. *Islets* **6**, 5–6 (2014).
 220. Hruban, R. H. *et al.* Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: Consensus report and recommendations. *Cancer Res.* **66**, 95–106 (2006).
 221. Rebours, V. *et al.* Hypoxia Pathways and Cellular Stress Activate Pancreatic Stellate Cells: Development of an Organotypic Culture Model of Thick Slices of Normal Human Pancreas. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).
 222. Kennedy, R. H. *et al.* Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. *Pancreas* **2**, 61–72 (1987).
 223. Qing, G. & Simon, M. C. Hypoxia inducible factor-2 α : a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Current Opinion in Genetics and Development.* **19**, 60–66 (2009).
 224. Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A. & Simon, M. C. HIF-2 α Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* **11**, 335–347 (2007).
 225. Abe, K. *et al.* Different patterns of p16INK4A and p53 protein expressions in intraductal papillary-mucinous neoplasms and pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* **34**, 85–91 (2007).
 226. Rosty, C. *et al.* p16 Inactivation in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (PanINs) Arising in Patients with Chronic Pancreatitis. *Am. J. Surg. Pathol.* **27**, 1495–1501 (2003).

227. Morris IV, J. P., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C. & Hebrok, M. β -catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 508–520 (2010).
228. Keefe, M. D. *et al.* B-Catenin Is Selectively Required for the Expansion and Regeneration of Mature Pancreatic Acinar Cells in Mice. *DMM Dis. Model. Mech.* **5**, 503–514 (2012).
229. Thrower, E. C. *et al.* The novel protein kinase C isoforms δ and ϵ modulate caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, 1344–1353 (2008).
230. Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L. & Fong, G. H. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8386–8391 (2000).
231. Gruber, M. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. 6–9.
232. Safo, A. O. F. & Pambuccian, S. E. Pancreatic manifestations of von Hippel-Lindau disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **134**, 1080–1083 (2010).
233. Cano, D. A., Sekine, S. & Hebrok, M. Primary Cilia Deletion in Pancreatic Epithelial Cells Results in Cyst Formation and Pancreatitis. *Gastroenterology* **131**, 1856–1869 (2006).
234. Prévot, P. P. *et al.* Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut* **61**, 1723–1732 (2012).
235. Jensen, J. Gene Regulatory Factors in Pancreatic Development. *Dev. Dyn.* **229**, 176–200 (2004).
236. Siveke, J. T. *et al.* Notch Signaling Is Required for Exocrine Regeneration After Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* **134**, 544–555 (2008).
237. Shi, G. *et al.* Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* **32**, 1950–1958 (2013).
238. Houbracken, I. *et al.* Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* **141**, 731-741.e4 (2011).
239. Collins, M. A., Yan, W., Sebolt-Leopold, J. S. & Pasca Di Magliano, M. MAPK signaling is required for dedifferentiation of acinar cells and development of pancreatic intraepithelial neoplasia in mice. *Gastroenterology* **146**, 822-834.e7 (2014).
240. Khalaileh, A. *et al.* Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res.* **73**, 1811–1820 (2013).
241. Krah, N. M. *et al.* The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Elife* **4**, 1–25 (2015).
242. Klein, W. M., Hruban, R. H., Klein-Szanto, A. J. P. & Wilentz, R. E. Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (panIN): Additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod. Pathol.* **15**, 441–447 (2002).
243. Aguirre, A. J. *et al.* Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **17**, 3112–3126 (2003).
244. Matsuyama, M. *et al.* Evaluation of pancreatic intraepithelial neoplasia and mucin expression in normal pancreata. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* **19**, 242–248 (2012).

245. Seeley, E. S., Carrière, C., Goetze, T., Longnecker, D. S. & Korc, M. Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia. *Cancer Res.* **69**, 422–430 (2009).
246. Prasad, N. B. *et al.* Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* **65**, 1619–1626 (2005).
247. Tsukita, S. & Furuse, M. Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell Biol.* **149**, 13–16 (2000).
248. Tanaka, M. *et al.* Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 942–952 (2011).
249. Gregorieff, A. & Clevers, H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: From endoderm to cancer. *Genes Dev.* **19**, 877–890 (2005).
250. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–3290 (2007).
251. Halbrook, C. J. *et al.* Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Activity Maintains Acinar-to-Ductal Metaplasia and Is Required for Organ Regeneration in Pancreatitis. *Cmgh* **3**, 99–118 (2017).
252. Cully, M., You, H., Levine, A. J. & Mak, T. W. Beyond PTEN mutations: The PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 184–192 (2006).
253. DiMagno, E. P., Go, V. L. W. & Summerskill, W. H. J. Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N. Engl. J. Med.* **288**, 813–815 (1988).
254. Coulier, B. Pancreatic lipomatosis: An extensive pictorial review. *Jbr-Btr* **100**, 1–20 (2016).
255. Jensen, J. N. *et al.* Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* **128**, 728–741 (2005).
256. Lerch, M. M. & Gorelick, F. S. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **144**, 1180–1193 (2013).
257. Schofield, H. K. *et al.* Pancreatic HIF2 α Stabilization Leads to Chronic Pancreatitis and Predisposes to Mucinous Cystic Neoplasm. *Cmgh* **5**, 169–185.e2 (2018).
258. Fendrich, V. *et al.* Hedgehog Signaling Is Required for Effective Regeneration of Exocrine Pancreas. *Gastroenterology* **135**, 621–631 (2008).
259. Yang, S. L. *et al.* Downregulation and pro-apoptotic effect of hypoxia-inducible factor 2 alpha in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 34571–34581 (2016).
260. Acker, T. *et al.* Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2 α . *Cancer Cell* **8**, 131–141 (2005).
261. Shannan, B. *et al.* Challenge and promise: Roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ.* **13**, 12–19 (2006).
262. Criswell, T., Klokov, D., Beman, M., Lavik, J. P. & Boothman, D. A. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 372–380 (2003).
263. Koshiji, M. *et al.* HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* **23**, 1949–1956 (2004).

264. Adhikary, S. & Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 635–645 (2005).
265. Nilsson, J. A. & Cleveland, J. L. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* **22**, 9007–9021 (2003).
266. Grabliauskaite, K. *et al.* P21WAF1/Cip1 limits senescence and acinar-to-ductal metaplasia formation during pancreatitis. *J. Pathol.* **235**, 502–514 (2015).
267. Lutz, M. S. & Burk, R. D. Primary cilium formation requires von Hippel-Lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res.* **66**, 6903–6907 (2006).
268. Esteban, M. A., Harten, S. K., Tran, M. G. & Maxwell, P. H. Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1801–1806 (2006).
269. Van Asselt, S. J. *et al.* Pancreatic cyst development: Insights from von Hippel-Lindau disease. *Cilia* **2**, 1 (2013).
270. Zhang, Y. *et al.* Epithelial-Myeloid cell crosstalk regulates acinar cell plasticity and pancreatic remodeling in mice. *Elife* **6**, 1–24 (2017).
271. Hoang, C. Q. *et al.* Transcriptional Maintenance of Pancreatic Acinar Identity, Differentiation, and Homeostasis by PTF1A. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 3033–3047 (2016).
272. Dizenzo, D. *et al.* Induced Mist1 expression promotes remodeling of mouse pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **143**, 469–480 (2012).
273. Martinelli, P. *et al.* Gata6 is required for complete acinar differentiation and maintenance of the exocrine pancreas in adult mice. *Gut* **62**, 1481–1488 (2013).
274. Von Figura, G., Morris IV, J. P., Wright, C. V. E. & Hebrok, M. Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut* **63**, 656–664 (2014).
275. Zhao, J., Du, F., Shen, G., Zheng, F. & Xu, B. The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell Death Dis.* **6**, 1–9 (2015).
276. Toschi, A., Lee, E., Gadi, N., Ohh, M. & Foster, D. A. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *J. Biol. Chem.* **283**, 34495–34499 (2008).
277. Puri, S., Cano, D. A. & Hebrok, M. A role for von hippel-lindau protein in pancreatic β -cell function. *Diabetes* **58**, 433–441 (2009).
278. Cantley, J., Selman, C. & Shukla, D. Deletion of the von Hippel-Lindau gene in pancreatic β cells impairs glucose homeostasis in mice. *119:125-135* (2009).
279. Zehetner, J. *et al.* pVHL is a regulator of glucose metabolism and insulin secretion in pancreatic β cells. *Genes Dev.* **22**, 3135–3146 (2008).
280. Karanjawala, Z. E. *et al.* New Markers of Pancreatic Cancer Identified Through Differential Gene Expression Analyses: Claudin 18 and Annexin A8. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 188–196 (2008).
281. Hagen, S. J. *et al.* Loss of Tight Junction Protein Claudin 18 Promotes Progressive Neoplasia Development in Mouse Stomach. *Gastroenterology* **155**, 1852–1867 (2018).
282. Pasca di Magliano, M. *et al.* Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* **2**, 1–9 (2007).
283. Zhang, Y. *et al.* Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic

-
- Carcinogenesis. *Cancer Res.* **73**, 4909–4922 (2013).
284. Fonte, V. G., Searls, R. L. & Robert Hilfer, S. The relationship of cilia with cell division and differentiation. *J. Cell Biol.* **49**, 226–229 (1971).
285. Lowenfels, A. B. *et al.* Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1433–1437 (1993).
286. Mazzon, E., *et al.* Effects of mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibition on the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas* **41**, 560–570 (2012).
287. Collisson, E. A. *et al.* A Central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discovery.* **2**, 685–693 (2012).
288. Payne, S. N. *et al.* PIK3CA mutations can initiate pancreatic tumorigenesis and are targetable with PI3K inhibitors. *Oncogenesis* **4**, (2015).
289. Driscoll, D. R. *et al.* mTORC2 signaling drives the development and progression of pancreatic cancer. *Cancer Res.* **76**, 6911–6923 (2016).

ANEXOS

ANEXO I: Tabla MM4

Lista de anticuerpos primarios empleados

Tabla MM4. Lista de anticuerpos primarios empleados

Anticuerpo	Especie	Dilución	Tinción	Referencia
Anti-HIF-2 α	Conejo	1:100*	IF	Novus (NB110-122)
Anti-Mucina-1	Hámster	1:200	IF	Thermo Scientific (HM-1630)
Anti-HA	Conejo	1:500	WB	Roche (1167423001)
Anti- β -actina	Ratón	1:1000	WB	Abcam (AB8226)
Anti-Insulina	Cobaya	1:800	IF, IHQ	Sigma-Aldrich (I-8510)
Anti-Glucagón	Ratón	1:8000	IF	Sigma-Aldrich (G2654)
Anti-Somatostatina	Conejo	1:200	IF	Sigma-Aldrich (SAB4502861)
Anti-HIF-1 α	Conejo	1:500	IHQ	Novus (NB110-449)
Anti-Amilasa	Ratón	1:200	IF	Santa Cruz Biotechnology (sc-46657)
Anti-KRT19	Rata	1:100	IF	Developmental Studies Hybridoma Bank (TROMA-III)
Anti-Vimentina	Conejo	1:1000	IF	Sigma-Aldrich (AB92547)
Anti- α -SMA	Ratón	1:1000	IF	Sigma-Aldrich (A-5228)
Anti-Nestina	Ratón	1:500	IF	Merck Millipore (MAB5326)
Anti-E-cadherina	Ratón	1:200	IF	BD Pharmigen (610181)
Anti-CD11b	Conejo	1:200	IHQ	Novus (NB110-89474)
Anti-F4/80	Rata	1:50	IHQ	BMA Biomedicals (T-2006)
Anti-Ki67	Conejo	1:800	IF, IHQ	Thermo Scientific (RM-9061)
Anti-Caspasa-3 esc.	Conejo	1:50	IHQ	Cell Signaling Technology (9661)
Anti-c-Myc	Conejo	1:200	IF	Cell Signaling Technology (D84C12)
Anti-p21	Ratón	1:200	IHQ	BD Pharmigen (556431)
Anti-p27	Ratón	1:200	IHQ	BD Pharmigen (610241)
Anti-p16	Ratón	1:200	IHQ	Santa Cruz Biotechnology (sc-1661)
Anti-CPA1	Conejo	1:200	IF	AbD Serotec (1810-0006)
Anti-Laminina	Conejo	1:500	IF	Sigma-Aldrich (L-9393)
Anti- β -Catenina	Ratón	1:200, 1:1000	IF, WB	BD Pharmigen (610153)
Anti-ZO-1	Conejo	1:100	IF	Invitrogen (40-42300)
Anti-PKC ϵ	Conejo	1:100	IF	Santa Cruz Biotechnology (sc-214)
Anti-MECA-32	Rata	1:300	IF	BD Pharmigen (553849)
Anti- α -Tubulina Acetilada	Ratón	1:10000	IF	Sigma-Aldrich (T-6793)
Anti-Sox9	Conejo	1:3000	IF	Merck Millipore (AB5535)
Anti-Pdx1	Cobaya	1:200	IF	Abcam (AB7308)

Anti-Hes1	Conejo	1:200	IHQ	Abcam (AB71559)
Anti-pERK	Conejo	1:100, 1:500	IF, IHQ, WB	Cell Signaling Technology (4370)
Anti-ERK	Conejo	1:1000	WB	Cell Signaling Technology (9102)
Anti-pRPS6	Conejo	1:75, 1:500	IF, IHQ, WB	Cell Signaling Technology (4858)
Anti-RPS6	Conejo	1:1000	WB	Cell Signaling Technology (2217)
Anti- α -Tubulina	Conejo	1:1000	WB	Abcam (AB52866)
Anti-Clusterina	Cabra	1:200	IF	Santa Cruz Biotechnology (sc-6419)
Anti-Claudina-18	Conejo	1:200	IF, IHQ	Abcam (AB222512)

IF, inmunofluorescencia; IHQ, inmunohistoquímica; WB, *western blot*; * TSA.

ANEXO II: Publicación relacionada con la tesis doctoral

Flores-Martínez, A., García-Núñez, A., Rojas, A. & Cano, D. A. *Stabilization of HIF-2 α impacts pancreas growth. Scientific Reports*, vol. 8 (2018)

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Stabilization of HIF-2 α impacts pancreas growth

Alvaro Flores-Martínez¹, Alejandro García-Núñez¹, Anabel Rojas^{2,3} & David A. Cano¹

Received: 9 May 2018
Accepted: 16 August 2018
Published online: 12 September 2018

Hypoxia inducible factors (HIFs) are critical regulators of the response to oxygen deficiency by activating target genes involved in a variety of biological functions. HIFs have been implicated in the pathophysiology of numerous pathologies including cancer. Patients with mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene, an essential regulator of HIF activity, develop tumors in several organs including the pancreas. Previous functional studies of HIF activation in the pancreas have used *Vhlh* (the murine homolog of *VHL*) deficient mice. However, the role of each specific HIF transcription factors in the pancreas has not been thoroughly examined. We derived mice that constitutively express a normoxia-stable form of HIF2 α in the pancreas. Activation of HIF2 α in the pancreas severely impairs postnatal exocrine pancreas. Mice with pancreas-specific activation of HIF2 α develop histological features reminiscent of pancreatitis including loss of acinar cells, ductal dilation and fibrosis. Moreover, we provide evidence that signaling pathways important for acinar cell homeostasis are altered in HIF2 α -overexpressing pancreata.

Hypoxia inducible factors (HIFs) are critical regulators of the response to oxygen deficiency by activating target genes involved in a variety of biological functions including energy metabolism, proliferation, apoptosis, and angiogenesis^{1,2}. HIFs are heterodimeric transcription factors, comprising a constitutively expressed HIF β subunit and an oxygen-regulated HIF α subunit. Three isoforms of HIF α have been identified (HIF1 α , HIF2 α , and HIF3 α) being HIF1 α and HIF2 α the most extensively studied. Under normal oxygen conditions, prolyl hydroxylases hydroxylate specific proline residues of HIF α subunits^{3,4}. HIF α subunits are thus recognized by the protein von Hippel-Lindau (pVHL) and consequently targeted for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway^{5,6}. Under hypoxia, HIF α is not degraded and thus translocates to the nucleus activating the expression of downstream target genes.

HIFs and the HIF signaling pathway have been implicated in the pathophysiology of numerous pathologies, most prominently cancer^{1,7}. The involvement of the HIF pathway in disease is well illustrated by the von Hippel-Lindau (VHL) disease, caused by a germline mutation in the *VHL* gene^{8,9}. In the absence of pVHL, HIF α -target genes are aberrantly activated despite normal oxygen levels. Patients with VHL disease develop benign and malignant tumors in multiple organs including the central nervous system, kidney and pancreas^{8,9}. Thus, about 70% of VHL patients develop pancreatic pathologies including neuroendocrine tumors, simple cysts and serous microcystic adenomas^{10,11}.

The role of HIFs in normal and pathological conditions of the pancreas has recently gained considerable interest. Several studies have revealed that both impairment and activation of the HIF pathway results in pancreatic endocrine dysfunction highlighting the crucial role of this pathway for proper endocrine function^{12–18}. Also, HIFs activation has been reported in pancreatitis and pancreatic cancer^{19,20}. The effects of HIF activation on pancreas formation have been mostly evaluated through pancreas-specific inactivation of *Vhlh* (the murine homolog of *VHL*) in mice. *Vhlh* mutant mice are born without any apparent pancreatic abnormalities. However, *Vhlh* mutant mice exhibit elevated perinatal lethality due to defects in pancreatic endocrine function^{15,21}. The very few surviving *Vhlh* mutant mice develop pancreatic lesions reminiscent of the pancreatic manifestations in VHL patients, although only after a long latency (more than 16 months)²¹.

Other pVHL functions independent of HIFs have been described. These include, among others, regulation of apoptosis, cell adhesion and maintenance of primary cilium²². Here, we aim to directly examine the effect of

¹Unidad de Gestión de Endocrinología y Nutrición. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. ²Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa CABIMER- Universidad Pablo de Olavide- Universidad de Sevilla- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sevilla, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain. Alvaro Flores-Martínez and Alejandro García-Núñez contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.A.C. (email: dcano-ibis@us.es)

the activation of HIF pathway on pancreas formation. To this end, we derived mice that constitutively express HIF2 α in the pancreas. We focused on HIF2 α given the prominent role of this HIF factor on proliferation, apoptosis and tumor formation²³. Also, HIF2 α appears to play a critical role in pancreas embryonic development²⁴. We show that activation of HIF2 α in the pancreas severely impairs postnatal exocrine homeostasis. Mice with pancreas-specific activation of HIF2 α display histological features reminiscent of pancreatitis including loss of acinar cells, ductal dilation and fibrosis. Moreover, we provide evidence that signaling pathways important for acinar cell homeostasis are altered in HIF2 α -overexpressing pancreas.

Results

Specific activation of HIF2 α in the pancreas. To investigate the role of HIF2 α in pancreas formation, we specifically activated HIF2 α in the pancreas by crossing mice expressing Cre recombinase under control of the pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*) promoter (*Pdx1-Cre* mice)²⁵ with *HIF2dPA* mice (*Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice). In *HIF2dPA* mice²⁶, a form of human HIF2 α that escapes recognition by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (i.e. it is not degraded under normal oxygen conditions) is expressed upon Cre recombination. *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice were born at the expected Mendelian ratio and reached adulthood without any sign of compromised health. No differences in total body weight were found between *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice and littermate control mice at both 2 and 8 weeks of age (Fig. 1A). However, a substantial reduction in total pancreatic mass of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice was found as early as 2 weeks of age, even when pancreatic weight was normalized to body weight (Fig. 1A). Western Blot (Fig. 1B) and immunofluorescence analysis (Fig. 1D) confirmed the efficient accumulation of HIF2 α in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreas. In control pancreas, endogenous HIF2 α expression was found in islets but not in the exocrine compartment (Fig. 1C), as previously reported²⁰.

Exocrine cell atrophy and ductal dilation in postnatal *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. Gross morphology inspection and analysis of Haematoxylin and Eosin-stained tissue of newborn (P0) *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata did not reveal any apparent defects (Fig. 1E,F). However, loss of acinar cells and increased dilation of duct-like structures was observed at 2 weeks of age (Fig. 1I,J). These lesions rapidly progressed, and by 8 weeks of age most of the *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acinar tissue had been replaced by duct-like tubular structures, stroma and adipose tissue (Fig. 1M,N). To further characterize the pancreatic exocrine defects of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice we performed double immunohistochemistry for a ductal marker, duct-specific cytokeratin 19 (KRT19), and an acinar cell marker, amylase. The *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata appeared normal at P0 (Fig. 1G,H) but beginning at 2 weeks of age amylase expression was substantially reduced concomitant with expansion of duct-like tubular structures (Fig. 1K,L). The acinar architecture appeared disorganized in two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice, marked by the loss of the typical round morphology of the acini as well as the dilation of the intracinar lumen (Fig. 1L) and concomitant increase of KRT19-positive epithelial cells. This acinar-ductal metaplasia, broadly defined as replacement of acinar cells by ductal-like cells, did not seem to involve transdifferentiation of acinar cells into ductal-like cells since intermediate cells co-expressing acinar and ductal markers were not observed (Fig. 1L and Supplementary Fig. 1). By 8 weeks of age, the *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata appeared severely atrophic with extensive loss of acinar cells and dilated ducts; only residual clusters of acinar cells could be observed (Fig. 1O,P). Islets of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice displayed a morphology similar to those observed in control mice (Supplementary Fig. 1). Indeed, blood glucose levels in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice were normal compared to control mice (Supplementary Fig. 1). These results indicate that ectopic HIF2 α stabilization in the pancreas leads to extensive loss of acinar cells and expansion of duct-like cells.

HIF2 α activation leads to pancreatic abnormalities reminiscent of pancreatitis. Loss of acinar cells and ductal expansion are histological hallmarks of pancreatitis. We examined whether other classical features of pancreatitis were also present in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* postnatal pancreata. Haematoxylin and Eosin staining showed increased stroma in 8-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (Fig. 1M,N). Gomori trichrome staining revealed a marked increase in connective tissue in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (Fig. 2A,B). *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreatic tissue exhibited a substantial increase in cells expressing smooth muscle actin (SMA), a fibroblast activation marker (Fig. 2C,D) and vimentin, a mesenchymal marker (Fig. 2E–G), thus confirming the formation of pancreatic fibrosis. An increase in inflammatory cells was also apparent in 8-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice, as evidenced by CD11b immunohistochemistry, a marker of leukocytes (macrophages, neutrophils and granulocytes) (Fig. 2H–J) and F4/80 immunohistochemistry, a specific marker of macrophages (Fig. 2K–M). Thus, HIF2 α activation results in fibrosis and increased inflammatory cells in the pancreas, histological features of pancreatitis.

Increased acinar cell apoptosis and proliferation in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice. To elucidate the underlying cause of the massive acinar loss in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice, we assessed acinar cell proliferation, apoptosis and differentiation in two-week-old mice, an age in which *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata exhibit areas with preserved acinar tissue. Apoptosis was measured using TUNEL assay. *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata showed a marked increase in apoptotic cells compared to control pancreata (Fig. 3A–C). Immunohistochemistry for cleaved caspase-3 confirmed the increase in apoptotic cells of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (Fig. 3D,E). Cell proliferation was assessed by Ki-67 immunohistochemistry. Control mice displayed substantial pancreatic cell proliferation, as expected at this early postnatal age. However, both acinar (Fig. 3F,G,J) and ductal cell (Fig. 3H,I,J) proliferation was significantly higher in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. Thus, despite extensive acinar cell loss, pancreatic cell proliferation was prominent in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice.

Remodeling of pancreatic acini upon HIF2 α activation. Although the *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata appeared largely unaffected at birth, a substantial replacement of acinar cells by cells expressing ductal markers was observed as early as two weeks of age. We analyzed whether acinar cell dedifferentiation could

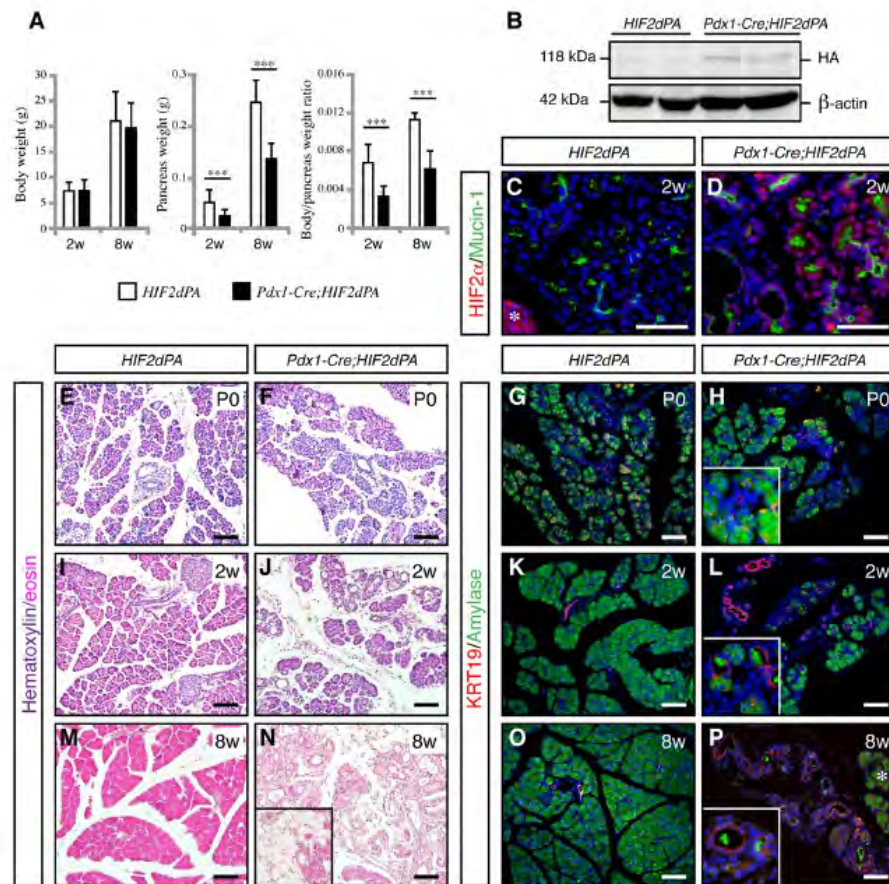


Figure 1. HIF2 α stabilization results in exocrine cell atrophy and expansion of duct-like tubular structures. (A) Body weight (left panel), pancreas weight (middle panel) and body/pancreas weight ratio (right panel) in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* and control mice at 2 and 8 weeks of age. Data are presented as mean \pm SD. (B) HIF2 α accumulation in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* analyzed by Western blot with anti-HA antibody. Two independent two-week-old control and mutant mice are shown. β -actin protein was used for loading control. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 2. (D) Immunofluorescence analysis of HIF2 α in two-week-old control pancreata. Endogenous HIF2 α expression is observed in islets (marked by a white asterisk) but not in exocrine tissue. (D) Robust HIF2 α accumulation in the pancreas of two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice. Hematoxylin/Eosin-stained pancreatic sections from P0 (E,F), two- (I,J) and eight-week-old (M,N) *Pdx1-Cre;HIF2dPA* and control mice. Inset in N shows an area with adipose tissue in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. Immunofluorescence of amylase and KRT19 shows no differences between *Pdx1-Cre;HIF2dPA* and control mice at P0 (G,H). Duct-like tubular structures and loss of amylase immunoreactivity in two- (K,L) and eight-week-old (O,P) *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice compared to control mice. Note areas with normal acini in 8-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (white asterisk in O). Insets in (H,L and P) show higher magnification pictures. DAPI staining is shown in blue in (C,D,G,H,K,L,O and P). Scale bars = 50 μ m for (C,D); 100 μ m for (E–P). *** $P < 0.001$.

also play a role in this postnatal exocrine pancreatic degeneration. Close examination of acini in two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice revealed that dilation of intracinar ducts was associated with reduction of amylase immunoreactivity (Fig. 1L and Supplementary Fig. 1). A key characteristic of the mature exocrine pancreas is the architecture of acini consisting of individual acinar cells that exhibit apical-basal cellular polarity and secrete digestive enzymes into a central lumen. Disruption of acinar cell organization and apical-basal polarity has been associated with postnatal pancreatic exocrine degeneration in various mutant mouse strains^{27–29}. Thus, we decided to analyze the accumulation of several markers of acinar cell organization in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice at two weeks of age when substantial acinar tissue was still preserved. The localization of the basal marker laminin (Fig. 4A,B) as well as basolateral markers β -catenin (Fig. 4C,D) and E-cadherin (Fig. 4E–L) was not largely affected in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acini. In control acinar cells, carboxypeptidase A1 (CPA1) is localized close

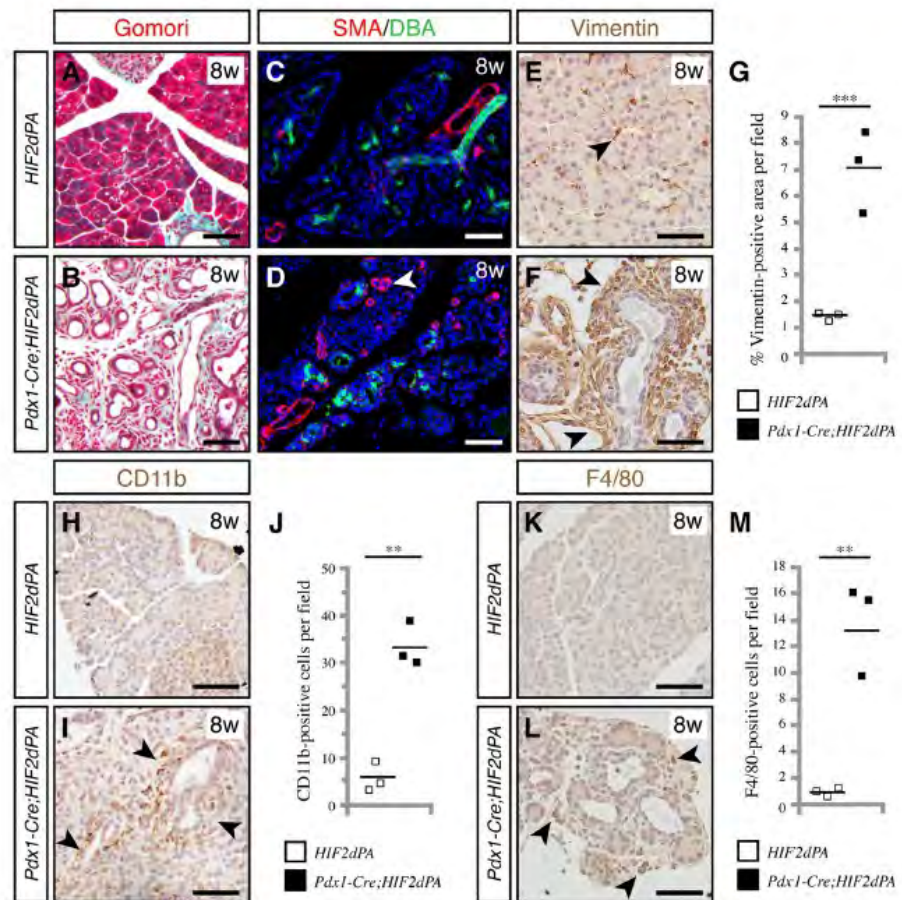


Figure 2. HIF2 α stabilization causes pancreatic abnormalities reminiscent of pancreatitis. Gomori trichome staining reveals increased connective tissue (stained in blue) in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (B) compared to control pancreata (A) at 8 weeks of age. Increase in smooth muscle actin (SMA) positive cells (white arrowhead) in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (D) compared to control pancreata (C) at 8 weeks of age. Ducts are marked by staining with lectin *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA). Increase of the mesenchymal marker vimentin in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (F, black arrowheads) at 8 weeks of age. Only a few scattered cells are positive for vimentin in control pancreata (E, black arrowhead). (G) Quantification of vimentin-positive area per total pancreatic area. CD11b immunohistochemistry in control (H) and *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (I, black arrowheads) at eight weeks of age. (J) Quantification of CD11b-positive cells per field. F4/80 immunohistochemistry in control (K) and *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (L, black arrowheads) at eight weeks of age. (M) Quantification of F4/80-positive cells per field. Data points represent values for each individual mouse. The mean value is indicated as a horizontal line. Scale bars = 50 μ m. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

to the lumen of the acini (Fig. 4E). However, CPA1 did not show a clear apical localization in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acinar cells (Fig. 4F). Immunofluorescence for apical markers mucin-1 (Fig. 4G,H) and PKC ϵ (Fig. 4I,J) confirmed the mislocalization of apical markers in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice. Mucin-1 and PKC ϵ were localized exclusively at the apical surface of control acinar cells (Fig. 4G,I). While these proteins still displayed an apical localization in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acinar cells, a marked cytoplasmic accumulation was observed (Fig. 4H,J). Immunofluorescence for mucin-1 also revealed the dilation of acini lumens in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (Fig. 4H) compared to the small lumens found in control acini (Fig. 4G). The increase in lumen size of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acini was confirmed by immunofluorescence analysis of the tight junction protein ZO-1 (Fig. 4K,L). Therefore, HIF2 α stabilization leads to extensive acini disorganization including intracinar lumen dilation and mislocalization of apical markers while basal markers are appropriately localized.

Ductal metaplasia and increased vascularization in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. One of the most notable features of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata was the marked increase in duct-like tubular structures.

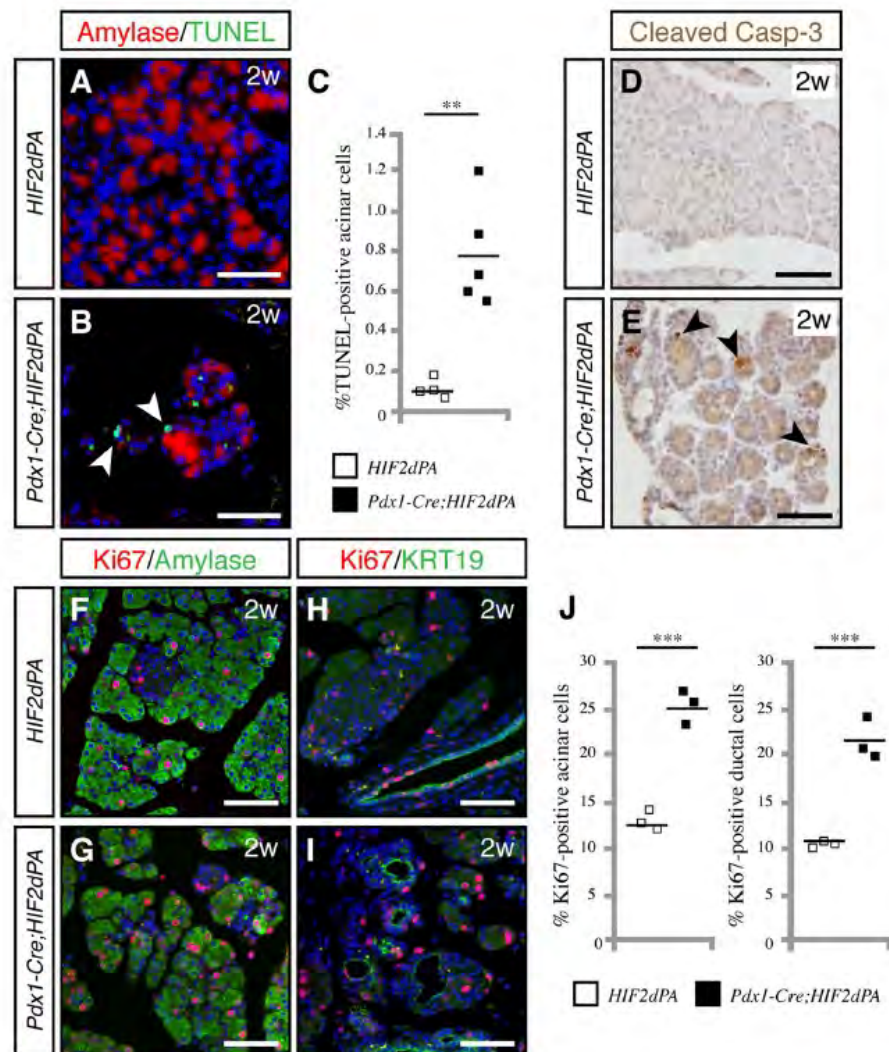


Figure 3. Increased acinar cell apoptosis and proliferation in HIF2 α -overexpressing pancreata. (A,B) TUNEL staining shows an increase in apoptotic acinar cells in the pancreas of two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (B, white arrowheads) compared with wild-type (A) mice. (C) Quantification of apoptotic cells measured as TUNEL positive-cells per total number of amylase-positive cells. Individual data points are presented. The mean value is indicated as a horizontal line. (D,E) Immunohistochemistry for cleaved caspase-3 confirms the increase in apoptotic cells in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (E, black arrowheads) compared to control pancreata (D). Increased acinar cell proliferation in two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (G) compared to control pancreata (F), as shown by double amylase/Ki-67 immunofluorescence. Increased ductal cell proliferation in two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (I) compared to control pancreata (H), as shown by double KRT19/Ki-67 immunofluorescence. (J) Quantification of acinar (left graph) and ductal (right graph) proliferating cells, measured as the average number of Ki67-positive cells per amylase- or KRT19-positive cells. Data points represent values for each individual mouse. The mean value is indicated as a horizontal line. Scale bars = 50 μ m for A,B,D and E; 100 μ m for F–I. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

VHL patients commonly exhibit pancreatic lesions that include cysts and microcystic adenomas^{10,11}. These lesions display prominent fibrous stroma and endothelial cells¹¹. Also, epithelial cells lack the characteristic papillary structures and mucin found in pancreatic mucinous cystic neoplasms¹¹. Similar to the pancreatic lesions of VHL patients, the duct-like tubular structures of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata did not exhibit

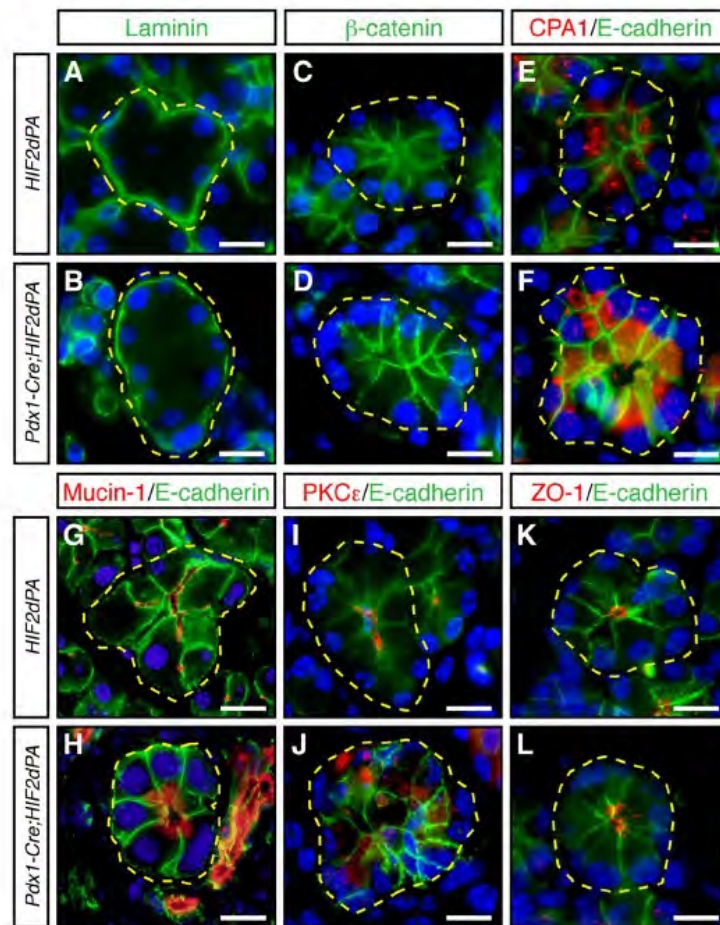


Figure 4. Acini disorganization in HIF2 α -overexpressing mice. No changes in the expression or localization of laminin (A,B), β -catenin (C,D), and E-cadherin (E–L) between acini of two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* and control mice. Carboxypeptidase A1 (CPA1) is localized close to the lumen of control acini (E). CPA1 does not show a clear apical localization in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acinar cells (F). Intracellular accumulation of mucin-1 (H), and PKC ϵ (J), in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acini while markers are normally localized at the apical region in control acini (G,I). Zonula occludens 1 (ZO-1) immunofluorescence show lumen dilation in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (L) acini compared to control acini (K). Nuclei are stained with DAPI (blue). Individual acini are outlined in yellow. Scale bars = 20 μ m.

mucin-producing papillary structures, as revealed by alcian blue (Fig. 5A,B) and PAS staining (Fig. 5C,D). Indeed, *Pdx1-Cre;HIF2dPA* duct-like epithelial cells expressed markers of ductal cells including KRT19 (Fig. 1L,P) and duct binding lectin *Dolichos biflorus* agglutinin (Fig. 2C,D). Also, cilia, which are normally present in control ductal cells^{30,31} but not in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions and pancreatic cancer cells³², were found in pancreatic duct-like epithelial cells of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (Fig. 5E,F). *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata displayed increased vascularization (Fig. 5G–K). MECA32-positive endothelial cells were closely intermixed with mucin-1-positive epithelial cells (Fig. 5I,J), as described in pancreatic cysts of VHL patients¹¹. In agreement with the increased vascularization, an upregulation of the expression of the HIF-target gene VEGF was found in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (Fig. 5K). Thus, HIF2 α stabilization in the pancreas leads to the formation of pancreatic lesions similar to those found in the pancreas of VHL patients.

Altered signaling pathways in exocrine pancreas upon HIF2 α activation. The expression of ductal transcription factors such as Sox9 is increased during acinar-ductal metaplasia in models of pancreatic injury^{33–35}. In agreement with this, we observed prominent Sox9 expression in both disorganized acini and well-defined duct-like tubular structures of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (Fig. 5L,M). The MAPK signaling pathway plays an important role in acinar cell homeostasis in response to injury. During pancreatitis the MAPK pathway is

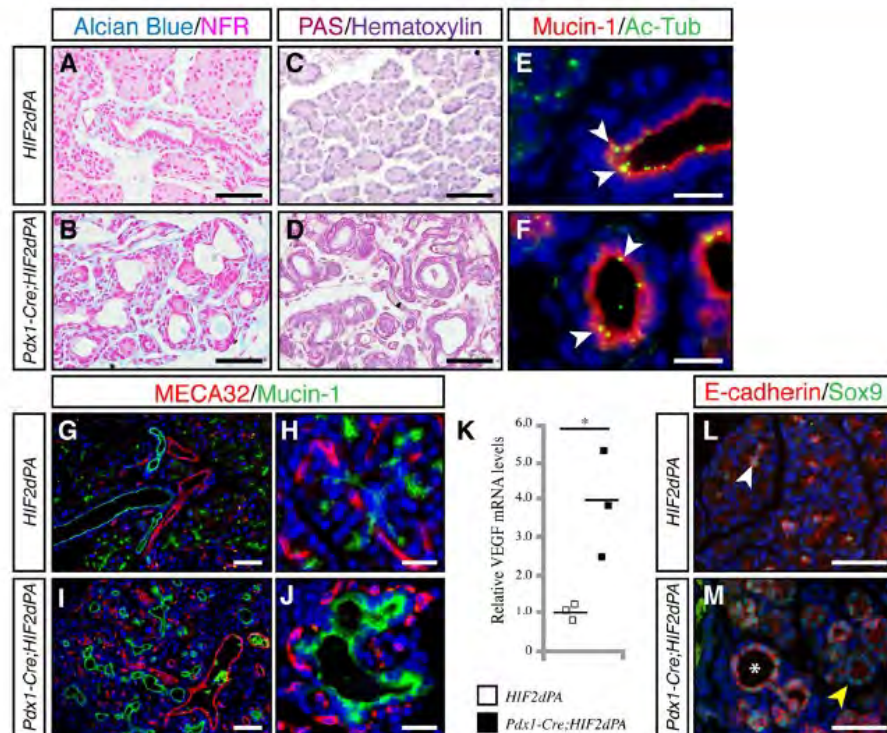


Figure 5. Increased ductal-like structures and vascularization in HIF2 α -overexpressing mice. Staining for Alcian Blue/nuclear fast red (NFR) (A,B) and PAS (C,D) in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* (B,D) and control pancreata (A,C) at 2 weeks of age. (E,F) Primary cilia, marked by acetylated tubulin (Ac-Tub, white arrowheads) are present in pancreatic ducts of control mice (E) and duct-like tubular structures of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (F). Increased vascularization (marked by MECA32 immunostaining) in two-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (I,J) compared to control pancreata (G,H). Note MECA32-positive endothelial cells surrounding duct-like structures in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreas (J). (K) qPCR analysis of VEGF expression in two-week-old pancreata. Data points represent values for each individual mouse. The mean value is indicated as a horizontal line. In two-week-old control pancreata, Sox9 is expressed in scattered centroacinar cells (L, white arrowhead). Strong Sox9 expression is found in disorganized acini (M, yellow arrowhead) as well as in duct-like tubular structures (M, asterisk). Nuclei are stained with DAPI (blue) in (E–J and L,M). Scale bars = 50 μ m for (A–D,G,I,L and M); 20 μ m for (E,F,H and J). * $P < 0.05$.

up-regulated^{43,37} and it has been shown to be necessary for acinar-ductal metaplasia^{38,39}. We evaluated activation of the MAPK pathway, as assessed by immunofluorescence of phosphorylated ERK (pERK). In control pancreata, only a few scattered cells were positive for pERK (Fig. 6A, top panels). In stark contrast, strong nuclear pERK signal was observed in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* acinar cells. This activation of MAPK pathway was largely limited to disorganized acini (Fig. 6A, bottom panels), the preserved acini in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice did not show substantial pERK signal (Fig. 6A, bottom panels). Of note, prominent MAPK activity was also observed in the stromal cells of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (Fig. 6A, bottom panels). The AKT/mTOR pathway has also been implicated in acinar-ductal metaplasia^{40–42}. Thus, we evaluated the phosphorylation status of the ribosomal protein S6 (RPS6), a downstream target of the AKT/mTOR signaling pathway. As previously shown^{42,43}, RPS6 was phosphorylated in acinar (Fig. 6B, top panels), but not ductal cells of control pancreata (Fig. 6C, top panels). In the pancreas of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice, phosphorylated RPS6 (pRPS6) was easily detected in well-preserved acini (Fig. 6B, bottom panels). However, a dramatic decrease in pRPS6 was observed in areas with disorganized acini (Fig. 6B, bottom panels). Interestingly, we observed an induction of the stress protein clusterin in disorganized acini (Fig. 6D, bottom panels). No expression of clusterin was detected in normal acini of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice (Fig. 6D, bottom panels) as well as in acini of control mice (Fig. 6D, top panels). Thus, HIF2 α activation in the pancreas affects signaling pathways important for exocrine pancreas homeostasis.

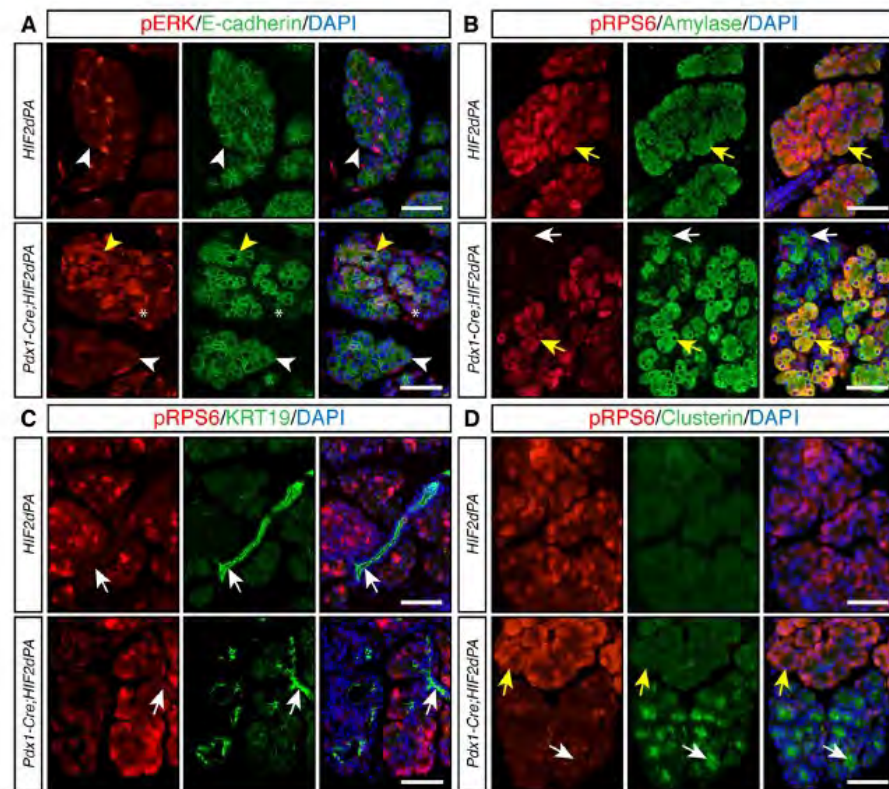


Figure 6. Altered components of MAPK and AKT/mTOR signaling pathways in HIF2 α -overexpressing pancreata. (A) Periacinar cells positive for phosphorylated-ERK (pERK) are found in 2-week-old control pancreata but acinar cells are negative for pERK (white arrowheads, top panels). Increased pERK accumulation is observed in 2-week-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (yellow arrowheads, bottom panels). Note that the increased expression was limited to areas with acinar-ductal metaplasia (yellow arrowheads, bottom panels). Acini with preserved morphology do not show extensive pERK accumulation (white arrowheads, bottom panels). pERK-positive stromal cells are also observed in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (asterisks, bottom panels). E-cadherin immunofluorescence was performed to visualize the pancreatic epithelium. (B) Double immunofluorescence analysis of phosphorylated RSP6 (pRSP6) and amylase in 2-week-old mice. pRSP6 (yellow arrows) is detected in amylase-positive acinar cells of control pancreata (top panels). In *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata, pRSP6 is detected in well-preserved acini (bottom panels, yellow arrows). However, areas with acinar-ductal metaplasia display decreased expression of pRSP6 (white arrows). (C) Double immunofluorescence analysis of pRSP6 and KRT19 in 2-week-old mice. Ductal cells (white arrows) are not positive for pRSP6 in both control pancreata (top panels) and *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata (bottom panels). (D) Clusterin is not expressed in control pancreas (top panels). Areas with acinar-ductal metaplasia in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata display decreased expression of pRSP6 and activation of clusterin expression (white arrows). Yellow arrows indicate acini with normal morphology. Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars = 50 μ m.

Discussion

Here, we show that specific activation of HIF2 α in the pancreas severely disrupts homeostasis of the exocrine pancreas. We derived transgenic mice that specifically expressed a normoxia-stable form of HIF2 α in the pancreas. Continuous activation of HIF2 α in pancreatic cells resulted in severe abnormalities in the postnatal pancreas including loss of acinar cells, acinar-ductal metaplasia, increased vascularization, and fibrosis.

To specifically activate HIF2 α in the pancreas, we used the *Pdx1-Cre* transgenic line. *Pdx1* is expressed during early stages of the developing pancreatic epithelium and HIF2 α is expressed in pancreatic progenitor cells²⁴. Indeed, HIF2 α inactivation causes pancreatic hypoplasia indicating an important role for HIF2 α in pancreas development²⁴. However, newborn *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata did not display apparent pancreatic abnormalities thus indicating the HIF2 α overactivation do not overtly affect embryonic development of the pancreas. After birth, a gradual loss of acinar cells was observed in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. Indeed, *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice develop features reminiscent of chronic pancreatitis including acinar cell loss, acinar-ductal metaplasia,

inflammatory cell infiltration, fibrosis and lipomatosis. Despite the extensive acinar cell loss, *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice did not display loss of body weight after birth. However, it should be noted that the loss of pancreatic enzyme synthesis needs to be almost complete to cause overt physiological defects^{44,45}.

Concomitant with the acinar cell loss, a marked increase in duct-like tubular structures was observed in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. Acinar-ductal metaplasia is commonly observed in chemical models of pancreatic injury as well as in several mutant mice deficient in genes critical for exocrine cell homeostasis and it is considered an adaptive response to acinar cell injury^{46,47}. Although increased acinar cell proliferation was prominent in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice, this did not result in tissue regeneration. Indeed, two-month-old *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice displayed a massive loss of acinar cells indicating that sustained HIF2 α was detrimental to acinar cell regeneration. Lineage tracing experiments have demonstrated transdifferentiation of acinar cells into ductal-like cells in several animal models of acinar cell injury (reviewed in^{47,48}). In our study, lineage tracing could not be utilized to determine the acinar origin of ductal-like cells in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata because the *Pdx1-Cre* transgene is expressed in common pancreatic progenitors. We did not detect intermediate cells co-expressing acinar and ductal markers in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata that could suggest acinar-duct transdifferentiation but this is just circumstantial evidence. We did observe increased cell apoptosis in postnatal *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata. Thus, apoptosis could account for the severe loss of acinar cells although we cannot rule out an additional contribution from transdifferentiation of acinar cells into ductal-like cells. Although HIF2 α usually promote cell survival and proliferation, a role of HIF2 α in inducing cell apoptosis has also been reported. For example, HIF2 α overexpression in hepatocellular carcinoma⁴⁹ and glioblastoma cells⁵⁰ increases tumor cell apoptosis. The proapoptotic effect of HIF2 α overexpression on acinar cells could also be indirect as a response to acinar cell injury, as observed in pancreatitis. In agreement with this notion, we observed expression of the injury marker clusterin in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata.

The duct-like tubular structures of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice are reminiscent of the cysts and microcystic adenomas commonly found in VHL patients^{10,11}, which are characterized by increased vascularization and prominent fibrous stroma. However, most pancreatic lesions in VHL patients are asymptomatic and no extensive acinar cell loss is usually found. Only rare cases of pancreatitis have been reported and these appear to be secondary to obstruction of the main pancreatic duct of cysts. A potential explanation for the difference in pancreatic phenotypes between VHL patients and *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice is that HIF α activation (by VHL inactivation) occurs locally in VHL patients (second hit hypothesis of hereditary cancer) while broad HIF α activation in the pancreas is achieved in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice. In agreement with this notion, pancreas-specific *Vhlh* (the murine homolog of *VHL*) inactivation in mice results in the formation pancreatic cysts, loss of exocrine pancreas and fat replacement²¹. Interestingly, these pancreatic lesions were observed only in older *Vhlh* mutant mice, not in young mice²¹, as we observed in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice. This apparent discrepancy might be related to the specificity and/or levels of HIF2 α activation obtained in our mouse genetic model. Nonetheless, it is important to note that *Vhlh* mutant mice display severe perinatal lethality^{15,21} and thus, the analysis of pancreata in older *Vhlh* mutant mice was limited to few surviving mice²¹, which could have not achieved full HIF activation on exocrine pancreas. In this regard, it would be interesting to determine which specific HIF transcription factors are activated in the pancreatic lesions of VHL patients. *Vhlh* mutant mice exhibit impaired glucose homeostasis including severe hypoglycemia and defective insulin and glucagon secretion. Although we did not perform a complete characterization of glucose homeostasis, *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice showed normal fed glucose levels. This apparent discrepancy might be due to differences in the specific HIF α overactivated between *Pdx1-Cre;HIF2dPA* and *Vhlh* mutant mice. In support of this hypothesis, the abnormal glucose homeostasis of β -cell-specific *Vhlh* mutant mice is HIF1 α -dependent since deletion of HIF1 α restores impaired glucose homeostasis^{12,16}. Thus, our results suggest that HIF2 α overactivation in the pancreas do not markedly alter glucose homeostasis.

The pancreatic defects of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice are similar to those observed in mice with defects in primary cilia formation and it has been shown that pVHL contributes to cilia maintenance and stability in kidney cells^{51–53}. Indeed, cilia are lost in kidney cysts from VHL patients⁵³. To the best of our knowledge, it has not been reported whether pancreatic cysts in VHL patients lack primary cilia⁵⁴. However, primary cilia were clearly present on the ductal cells of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata indicating that HIF2 α overactivation does not overtly compromise primary cilia integrity. Interestingly, it has been reported that only HIF1 α (not HIF2 α) activity is important for cilia formation⁵³.

The loss of acini organization in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice was associated with alteration of the MAPK and AKT/mTOR signaling pathways. These pathways play a pivotal role in acinar cell homeostasis in response to injury. Thus, MAPK signaling is required for the dedifferentiation of acinar cells into duct-like cells³⁹. In concordance with this notion, upregulation of pERK signal was observed in acinar cells located in disorganized acini of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice. Interestingly, we also observed prominent MAPK activity in the stromal cells of *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata, a phenomenon also reported in fibrosis associated to pancreas cancer formation⁵⁵. Disorganization of acini structure was also accompanied by decreased levels of phosphorylated RPS6, a downstream target of the AKT/mTOR signaling pathway that has been implicated in acinar-ductal metaplasia^{40–42}. Crosstalk between these signaling pathways and HIFs have been reported^{23,56}, thus providing a potential causal link between HIF2 α overactivation and impairment of acinar cell homeostasis.

Depletion of *Ptf1a*, a master regulator of acinar differentiation and function in adult mice also results in decreased levels of phosphorylated RPS6 in acinar cells concomitant with loss of acinar cell identity⁴³. Indeed, the postnatal pancreatic exocrine degeneration observed in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice is similar to defects observed in mutant mice deficient in transcription factors critical for acinar cell formation and identity such as MIST1, NR5A2, GATA6 and PTF1A^{28,29,43,57}. *Pdx1-Cre;HIF2dPA* pancreata displayed features compatible with loss of acinar cell identity including decreased expression of amylase, disruption of acini organization, mislocalization of acinar cell apical markers and increased expression of ductal markers. However, these phenotypes could be secondary effects of acinar cell injury, as reported in animal models of pancreatitis. Temporal, synchronous activation of HIF2 α in adult acinar cells would be necessary to elucidate the direct role of HIF2 α in acinar cell homeostasis.

A potential role for HIF2 α in pancreatic cancer formation has been recently described. HIF2 α is highly expressed in preneoplastic lesions but is downregulated during malignant progression of pancreatic cancer²⁰. HIF2 α inactivation impairs the progression of cancerous lesions in the Kras-mediated mouse model of pancreatic cancer²⁰. We did not observe tumor formation in *Pdx1-Cre;HIF2dPA* mice but our analysis was limited to relatively young mice (two-month-old mice). Future studies in genetic models of pancreatic cancer will help to determine the effect of HIF2 α activation in pancreatic cancer.

Methods

Mice. Mice were housed in a pathogen-free facility at the Institute of Biomedicine of Seville (IBIS). All procedures involving experimental animals were performed in accordance with European and local animal welfare laws, guidelines and policies. All animal studies were approved by the IBIS-Virgen del Rocio Ethics Committee. *Pdx1-Cre* and *Hif2dPA* (*Rosa26Sor^{2mt(Hif2A*)Kacfl}*) mice carrying a floxed allele of human *HIF2a* have been previously described^{25,26}. *Hif2dPA* mice were purchased from Jackson Labs.

Histological and immunohistochemical analyses. Histological (including alcian blue, periodic acid-Schiff and Gomori's one-step trichrome staining) as well as immunohistochemical analyses were performed as previously described^{58,59}. Fluorescent and bright-field images were captured using a BX-61 microscope (Olympus) and LTC SP2 confocal microscope (Leica). All photomicrographs shown are representative of at least 3 independent samples of the indicated genotype. Primary antibodies were used at the indicated dilution: Rabbit anti-cleaved caspase-3 (1:50, 9661), rabbit anti-phosphorylated-ERK (1:300, 4370) and rabbit anti-phosphorylated-S6 ribosomal protein (1:75, 4858) from Cell Signaling Technology; rabbit anti-carboxypeptidase A (1:200, 1810-0006) from AbD Serotec; mouse anti-E-cadherin (1:200, 610181), rat anti-panendothelial cell antigen (MECA32) (1:300, 553849) and mouse anti- β -catenin (1:300, 610153) from BD Pharmingen; rat anti-F4/80 (1:50, T-2006; BMA Biomedicals); rat anti-cytokeratin 19 (1:100, TROMA-III; Developmental Studies Hybridoma Bank); rabbit anti-ZO-1 (1:100, 40-2300; Invitrogen); rabbit anti-Sox-9 (1:3000, AB5535; Merck Millipore); rabbit anti-CD11b (1:200, NB110-89474) and rabbit anti-HIF2 α diluted 1:100 (NB100-122) from Novus; mouse anti-amylase (1:200; Sc-46657) goat anti- α -clusterin (1:200, sc-6419) and rabbit anti-PKC ϵ (1:100, sc-214) from Santa Cruz Biotechnology; mouse anti-acetylated tubulin (1:10000, T-6793), mouse anti- α -smooth muscle actin (1:1000, A-5228), rabbit anti-laminin (1:500, L-9393) and rabbit anti-vimentin (1:1000, AB92547) from Sigma-Aldrich and armenian hamster anti-Mucin-1 (1:200, HM-1630; Thermo Scientific). The biotin conjugate of the lectin *Dolichos biflorus* agglutinin was obtained from Vector Laboratories and detected with streptavidin-conjugated FITC (Jackson ImmunoResearch).

To quantify cell proliferation, following double immunofluorescence for the proliferation marker Ki-67 (RM-9061; Thermo Scientific) and amylase or KRT19, positive cells were then counted from 10 non-overlapping fields at 200x magnification from 3 control and 3 *Pdx1-Cre;Hif2dPA* mice. Cell apoptosis was detected using *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) according to the manufacturer's protocol in 10 non-overlapping fields at 200x magnification from 4 control and 5 *Pdx1-Cre;Hif2dPA* mice. Pancreatic sections treated with DNase I (Sigma-Aldrich) were used as positive control. Acinar cell apoptosis was quantified by averaging the number of TUNEL-positive cells per total number of amylase-positive cells. Morphometric analysis of vimentin, CD11b and F4/80 were performed by using ImageJ software. For CD11b and F4/80, the number of positive cells per field was calculated. The extent of vimentin accumulation was measured as the percentage of vimentin-positive area per total pancreatic area. For each group, 10 randomly selected low-power fields from pancreatic sections at least 60 μ m apart in three mice were analyzed.

Western Blot analysis. Tissue samples were lysed and homogenized in lysis solution (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) and Complete Ultra protease inhibitors (Roche). Protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). After SDS-PAGE separation, samples were transferred to PVDF membranes (BioRad), processed for immunoblotting against anti-HA (1:500, 1167423001; Roche) and anti β -actin (1:1000, ab8226; Abcam) antibodies, developed using HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson) and Western ECL Substrate (Bio-Rad). ImageQuant LAS 4000 Mini Gold (GE Healthcare) was used for imaging the blots.

RNA isolation and Quantitative Real Time PCR. RNA isolation was performed using RNeasy Kit (Qiagen) with deoxyribonuclease treatment, following manufacturer's instruction. Total RNA purity and concentration was assessed using Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA), and subsequently reverse-transcribed using random hexamer primers and the cDNA Omniscript reverse transcriptase (Qiagen). Quantitative PCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) using a 7900HT real-time PCR system (Applied Biosystems). Relative quantification of RNA levels was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method. Cyclophilin A (peptidylprolyl isomerase A-Mouse Genome Informatics) was used as housekeeping gene⁵⁹. The results were expressed as fold relative to levels in control pancreata (value of 1). Primer sequences for cyclophilin A and VEGF were as follows: CycloA-forward 5'-TCACAGAATTATCCAGGATTCATG-3'; CycloA-reverse 5'-TGCCGCCAGTGCCATT-3'; VEGF-forward 5'-CCAGCACATAGGAGAGATGAGCTT-3'; VEGF-reverse 5'-TCTGCTTTCTTTGGTCTGCATT-3'.

Statistical analysis. Significance was determined using two-tailed Student's t-test, and one-way ANOVA (post-hoc Tukey HSD test). $P < 0.05$ was considered significant. Data are presented as mean \pm SD.

Data Availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

References

1. Semenza, G. L. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* **365**, 537–547, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011165> (2011).
2. Kaelin, W. G. Jr. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **30**, 393–402, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009> (2008).
3. Ivan, M. *et al.* HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464–468, <https://doi.org/10.1126/science.1059817> (2001).
4. Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468–472, <https://doi.org/10.1126/science.1059796> (2001).
5. Ohh, M. *et al.* Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**, 423–427, <https://doi.org/10.1038/35017054> (2000).
6. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275, <https://doi.org/10.1038/20459> (1999).
7. Schito, L. & Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2**, 758–770, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.016> (2016).
8. Kaelin, W. G. Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol* **2**, 145–173, <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.092049> (2007).
9. Lonsler, R. R. *et al.* von Hippel-Lindau disease. *Lancet* **361**, 2059–2067 (2003).
10. Safo, A. O. & Pambuccian, S. E. Pancreatic manifestations of von Hippel-Lindau disease. *Arch Pathol Lab Med* **134**, 1080–1083, <https://doi.org/10.1043/2009-0172-RS.1> (2010).
11. Mohr, V. H. *et al.* Histopathology and molecular genetics of multiple cysts and microcystic (serous) adenomas of the pancreas in von Hippel-Lindau patients. *Am J Pathol* **157**, 1615–1621, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64799-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64799-2) (2000).
12. Cantley, J. *et al.* Deletion of the von Hippel-Lindau gene in pancreatic beta cells impairs glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest* **119**, 125–135 (2009).
13. Puri, S., Akiyama, H. & Hebrok, M. VHL-mediated disruption of Sox9 activity compromises beta-cell identity and results in diabetes mellitus. *Genes Dev* **27**, 2563–2575, <https://doi.org/10.1101/gad.227785.113> (2013).
14. Puri, S., Cano, D. A. & Hebrok, M. A role for von Hippel-Lindau protein in pancreatic beta-cell function. *Diabetes* **58**, 433–441, <https://doi.org/10.2337/db08-0749> (2009).
15. Puri, S., Garcia-Nunez, A., Hebrok, M. & Cano, D. A. Elimination of von Hippel-Lindau function perturbs pancreas endocrine homeostasis in mice. *PLoS One* **8**, e72213, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072213> (2013).
16. Zehetner, J. *et al.* pVHL is a regulator of glucose metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Genes Dev* **22**, 3135–3146, <https://doi.org/10.1101/gad.496908> (2008).
17. Gunton, J. E. *et al.* Loss of ARNT/HIF1 β mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* **122**, 337–349 (2005).
18. Cheng, K. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest* **120**, 2171–2183 (2010).
19. Gomez, G., Englander, E. W., Wang, G. & Greeley, G. H. Jr. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1 α , p48, and the Notch signaling cascade during acute pancreatitis in mice. *Pancreas* **28**, 58–64 (2004).
20. Criscimanna, A. *et al.* PanIN-specific regulation of Wnt signaling by HIF2 α during early pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res* **73**, 4781–4790, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0566> (2013).
21. Shen, H. C. *et al.* Deciphering von Hippel-Lindau (VHL/Vhl)-associated pancreatic manifestations by inactivating Vhl in specific pancreatic cell populations. *PLoS One* **4**, e4897, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004897> (2009).
22. Li, M. & Kim, W. Y. Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J Cell Mol Med* **15**, 187–195, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01238.x> (2011).
23. Zhao, J., Du, F., Shen, G., Zheng, F. & Xu, B. The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell Death Dis* **6**, e1600, <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.565> (2015).
24. Chen, H. *et al.* Impaired pancreatic development in Hif2- α deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **399**, 440–445, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.111> (2010).
25. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
26. Kim, W. Y. *et al.* Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor α phenocopies VHL inactivation *in vivo*. *Embo J* **25**, 4650–4662, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601300> (2006).
27. Bombardelli, L. *et al.* Pancreas-specific ablation of beta1 integrin induces tissue degeneration by disrupting acinar cell polarity. *Gastroenterology* **138**, 2531–2540, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.043> (2010).
28. Dizenzo, D. *et al.* Induced Mist1 expression promotes remodeling of mouse pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **143**, 469–480, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.011> (2012).
29. Martinelli, P. *et al.* Gata6 is required for complete acinar differentiation and maintenance of the exocrine pancreas in adult mice. *Gut* **62**, 1481–1488, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303328> (2013).
30. Cano, D. A., Sekine, S. & Hebrok, M. Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology* **131**, 1856–1869 (2006).
31. Cano, D. A., Murcia, N. S., Pazour, G. J. & Hebrok, M. orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Development* **131**, 3457–3467 (2004).
32. Seeley, E. S., Carriere, C., Goetze, T., Longnecker, D. S. & Korc, M. Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia. *Cancer Res* **69**, 422–430, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1290> (2009).
33. Prevot, P. P. *et al.* Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut* **61**, 1723–1732, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300266> (2012).
34. Morris, J. P., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C. & Hebrok, M. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* **120**, 508–520 (2010).
35. Kopp, J. L. *et al.* Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 737–750, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.025> (2012).
36. Duan, R. D., Guo, Y. J. & Williams, J. A. Conversion to Ca²⁺-independent form of Ca²⁺/calmodulin protein kinase II in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 368–373, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1238> (1994).
37. Mazzon, E. *et al.* Effects of mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibition on the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas* **41**, 560–570, <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31823acd56> (2012).
38. Shi, G. *et al.* Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* **32**, 1950–1958, <https://doi.org/10.1038/onc.2012.210> (2013).

39. Collins, M. A., Yan, W., Sebolt-Leopold, J. S. & Pasca di Magliano, M. MAPK signaling is required for dedifferentiation of acinar cells and development of pancreatic intraepithelial neoplasia in mice. *Gastroenterology* **146**, 822–834 e827, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.052> (2014).
40. Eser, S. *et al.* Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell* **23**, 406–420, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.023> (2013).
41. Baer, R. *et al.* Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110alpha. *Genes Dev* **28**, 2621–2635, <https://doi.org/10.1101/gad.249409.114> (2014).
42. Khalaileh, A. *et al.* Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res* **73**, 1811–1820, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2014> (2013).
43. Hoang, C. Q. *et al.* Transcriptional Maintenance of Pancreatic Acinar Identity, Differentiation, and Homeostasis by PTF1A. *Mol Cell Biol* **36**, 3033–3047, <https://doi.org/10.1128/MCB.00358-16> (2016).
44. DiMagno, E. P., Go, V. L. & Summerskill, W. H. Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N Engl J Med* **288**, 813–815, <https://doi.org/10.1056/NEJM197304192881603> (1973).
45. Gaskin, K. J., Durie, P. R., Lee, L., Hill, R. & Forstner, G. G. Colipase and lipase secretion in childhood-onset pancreatic insufficiency. Delineation of patients with steatorrhea secondary to relative colipase deficiency. *Gastroenterology* **86**, 1–7 (1984).
46. Murtaugh, L. C. & Keefe, M. D. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu Rev Physiol* **77**, 229–249, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071727> (2015).
47. Puri, S., Folias, A. E. & Hebrok, M. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. *Cell Stem Cell* **16**, 18–31, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.001> (2015).
48. Stanger, B. Z. & Hebrok, M. Control of cell identity in pancreas development and regeneration. *Gastroenterology* **144**, 1170–1179, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.074> (2013).
49. Yang, S. L. *et al.* Downregulation and pro-apoptotic effect of hypoxia-inducible factor 2 alpha in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 34571–34581, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8952> (2016).
50. Acker, T. *et al.* Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell* **8**, 131–141, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.07.003> (2005).
51. Schermer, B. *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein controls ciliogenesis by orienting microtubule growth. *J Cell Biol* **175**, 547–554, <https://doi.org/10.1083/jcb.200605092> (2006).
52. Lutz, M. S. & Burk, R. D. Primary cilium formation requires von hippel-lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res* **66**, 6903–6907, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0501> (2006).
53. Esteban, M. A., Harten, S. K., Tran, M. G. & Maxwell, P. H. Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1801–1806, <https://doi.org/10.1681/ASN.2006020181> (2006).
54. van Asselt, S. J. *et al.* Pancreatic cyst development: insights from von Hippel-Lindau disease. *Cilia* **2**, 3, <https://doi.org/10.1186/2046-2530-2-3> (2013).
55. Zhang, Y. *et al.* Epithelial-Myeloid cell crosstalk regulates acinar cell plasticity and pancreatic remodeling in mice. *Elife* **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.27388> (2017).
56. Masson, N. & Ratcliffe, P. J. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab* **2**, 3, <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-3> (2014).
57. von Figura, G., Morris, J. P., Wright, C. V. & Hebrok, M. Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut* **63**, 656–664, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304287> (2014).
58. Munoz-Bravo, J. L. *et al.* GDNF is required for neural colonization of the pancreas. *Development* **140**, 3669–3679, <https://doi.org/10.1242/dev.091256> (2013).
59. Munoz-Bravo, J. L. *et al.* Loss of Pancreas upon Activated Wnt Signaling Is Concomitant with Emergence of Gastrointestinal Identity. *PLoS One* **11**, e0164714, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164714> (2016).

Acknowledgements

D.A.C. was supported by the “Nicolás Monardes” program of the Andalusian Ministry of Health (C-0015-2014) and by grants from the Andalusian Ministry of Science and Innovation (CTS-7478), Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2011-26805) and the ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación co-funded with Fondos FEDER (PI16/00175). A.R. was supported by grants from ISCIII cofunded by Fondos FEDER (PI14/0804), Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2017-82479-P) and the “Ramón y Cajal” program from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (RYC-2013-14533). A.G.-N. was supported by a fellowship from the Andalusian Regional Government (P08-CVI-3727).

Author Contributions

A.F.-M. and A.G.-N. participated in the design of the study, performed the experiments, analyzed the data and commented on the manuscript. D.A.C. and A.R. participated in the design of the study, supervised the project, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32054-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

ANEXO III: Otras publicaciones realizadas durante la tesis doctoral

- Muñoz-Bravo, J. L.#, **Flores-Martínez, Á.#**, Herrero-Martin, G., Puri, S., Taketo, M. M., Rojas, A., Hebrok, M., & Cano, D. A. (2016). Loss of pancreas upon activated Wnt signaling is concomitant with emergence of gastrointestinal identity. *PLoS ONE*, **11**(10), 1–22.
- Ramírez, S., Gómez-Valadés, A. G., Schneeberger, M., Varela, L., Haddad-Tóvolli, R., Altirriba, J., Noguera, E., Drougard, A., **Flores-Martínez, Á.**, Imbernón, M., Chivite, I., Pozo, M., Vidal-Itriago, A., Garcia, A., Cervantes, S., Gasa, R., Nogueiras, R., Gama-Pérez, P., M., ... Claret, M. (2017). Mitochondrial Dynamics Mediated by Mitofusin 1 Is Required for POMC Neuron Glucose-Sensing and Insulin Release Control. *Cell Metabolism*, **25**(6), 1390-1399.e6.
- Venegas-Moreno, E., Vazquez-Borrego, M. C., Dios, E., Gros-Herguido, N., **Flores-Martínez, Á.**, Rivero-Cortés, E., Madrazo-Atutxa, A., Japón, M. A., Luque, R. M., Castaño, J. P., Cano, D. A., & Soto-Moreno, A. (2018). Association between dopamine and somatostatin receptor expression and pharmacological response to somatostatin analogues in acromegaly. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **22**(3), 1640–1649.
- Venegas-Moreno, E., **Flores-Martínez, Á.**, Dios, E., Vazquez-Borrego, M. C., Ibañez-Costa, A., Madrazo-Atutxa, A., Japón, M. A., Castaño, J. P., Luque, R. M., Cano, D. A., & Soto-Moreno, A. (2019). E-cadherin expression is associated with somatostatin analogue response in acromegaly. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **23**(5), 3088–3096.
- Daly, A. F., Cano, D. A., Venegas-Moreno, E., Petrossians, P., Dios, E., Castermans, E., **Flores-Martínez, Á.**, Bours, V., Beckers, A., & Soto-Moreno, A. (2019). Aip and men1 mutations and aip immunohistochemistry in pituitary adenomas in a tertiary referral center. *Endocrine Connections*, **8**(4), 338–348.
- Martín-Rodríguez, J. F., Ramos-Herrero, V. D., Parras, G. G., **Flores-Martínez, Á.**, Madrazo-Atutxa, A., Cano, D. A., Gruart, A., Delgado-García, J. M., Leal-Cerro, A., & Leal-Campanario, R. (2019). Chronic adult-onset of growth hormone/IGF-I hypersecretion improves cognitive functions and LTP and promotes neuronal differentiation in adult rats. *Acta Physiologica*, **229**(2), 1–18.

Herguido, N. G., Fuentes, E. D., Venegas-Moreno, E., Maorad, L. B., **Flores-Martínez, Á.**, Ruiz, P. R., Dueñas, M. C., Roldán, F., Fajardo, E., Ruiz-Valdepeñas, E. C., Kaen, A., Martín Schrader, I., Cano, D. A., & Soto-Moreno, A. (2019). Surgical Outcome and Treatment of Thyrotropin-Secreting Pituitary Tumors in a Tertiary Referral Center. *World Neurosurgery*, **130**, e634–e639.

García-Martínez, A., Cano, D. A., **Flores-Martínez, Á.**, Gil, J., Puig-Domingo, M., Webb, S. M., Soto-Moreno, A., & Picó, A. (2019). Why don't corticotroph tumors always produce Cushing's disease? *European Journal of Endocrinology*, **181**(3), 351–361.

Flores-Martínez, Á., Venegas-Moreno, E., Dios, E., Remón-Ruiz, P., Gros-Herguido, N., Vázquez-Borrego, M. C., Madrazo-Atutxa, A., Japón, M. A., Kaen, A., Cárdenas-Valdepeñas, E., Roldán, F., Castaño, J. P., Luque, R. M., Cano, D. A., & Soto-Moreno, A. (2020). Quantitative Analysis of Somatostatin and Dopamine Receptors Gene Expression Levels in Non-functioning Pituitary Tumors and Association with Clinical and Molecular Aggressiveness Features. *Journal of Clinical Medicine*, **9**(9), 3052.

ABREVIATURAS

ADM: metaplasia acino-ductal, del inglés, <i>Acinar-to-Ductal Metaplasia</i>	PanIN: neoplasia pancreática intraepitelial, del inglés, <i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>
AFL: lesión aplanada atípica, del inglés, <i>Atypical flat lesion.</i>	PanNET: tumores neuroendocrinos pancreáticos, del inglés, <i>Pancreatic Neuroendocrine Tumor</i>
BC: quistes serosos benignos, del inglés, <i>Benign Cysts</i>	PC: pancreatitis crónica
CLDN18: claudina-18	PDAC: adenocarcinoma ductal pancreático, del inglés, <i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
DM: diabetes mellitus	PDGF: del inglés, <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
DT1: diabetes tipo 1	Pdx1: del inglés, <i>Pancreas and duodenal homeobox gene-1</i>
DT2: diabetes tipo 2	pERK: del inglés, <i>phosphorylated-Extracellular-signal Related Kinase 1/2</i>
DT3c: diabetes tipo 3c	pO₂: presión parcial de oxígeno
EGFR: receptor de EGF, del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>	PP: polipéptidos pancreáticos
EPO: eritropoyetina	pRPS6: del inglés, <i>phosphorylated-Ribosomal Protein S6</i>
FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos 2	PSC: células estrelladas del páncreas, del inglés, <i>Pancreatic Stellated Cells</i>
HA: hemaglutinina	Ptfla/p48: del inglés, <i>Pancreatic transcription factor-1</i>
HE: hematoxilina y eosina	RCC: carcinoma de células renales del inglés, <i>Renal Cell Carcinoma</i>
Hh: Hedgehog	RT: temperatura ambiente, del inglés, <i>room temperature</i>
HIF: factores de transcripción inducibles por hipoxia, del inglés, <i>Hypoxia Inducible factors</i>	TC: complejos tubulares, del inglés, <i>Tubular Complexes</i>
IPMN: neoplasia papilar intraductal mucinosa, del inglés, <i>Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm</i>	TGFα: del inglés, <i>Transforming Growth Factor α</i>
KRT19: citoqueratina 19	VEGF: del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
MCA: adenomas microquísticos serosos, del inglés, <i>Mucinous Cystic Adenoma</i>	VHL: von Hippel-Lindau
MCN: neoplasia quística mucinosa, del inglés, <i>Pancreatic Mucinous Cystic Neoplasm</i>	ZO-1: proteína <i>zonula occludens 1</i>
MM: metaplasia mucinosa, del inglés, <i>Mucinous Metaplasia</i>	
MPC: del inglés, <i>Multipotent Pancreatic Cells</i>	
NFR: <i>nuclear fast red</i>	
OMS: Organización Mundial de la Salud	