

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

*Papel del activador tisular del plasminógeno (tPA) en
el desarrollo y progresión tumoral pancreática
en modelos murinos*

Memoria presentada por Susana Aguilar Izquierdo
para optar al grado de Doctora
por el *Departament de Ciències Experimentals i de la Salut*,
Universitat Pompeu Fabra

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de los doctores
Pilar Navarro Medrano y Francisco X. Real Arribas
Unidad de Biología Celular y Molecular
Institut Municipal d'Investigació Mèdica

Programa de Doctorado en
Ciències de la Salut i de la Vida del
Departament de Ciències Experimentals i de la Salut
Universitat Pompeu Fabra (1999-2001)

Pilar Navarro Medrano
Directora de tesis

FX Real Arribas
Director de tesis

Susana Aguilar Izquierdo
Doctoranda

UNIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Institut Municipal d'Investigació Mèdica

*Papel del activador tisular del plasminógeno (tPA) en el
desarrollo y progresión tumoral pancreática
en modelos murinos*

TESIS DOCTORAL

SUSANA AGUILAR IZQUIERDO
2004

Dipòsit legal: B.14868-2004

ISBN: 84-688-6239-8

ÍNDICE

Anexo

ABREVIATURASI
 RESUMEN.....III

INTRODUCCIÓN

1.- EL PÁNCREAS

1.1.- Características fisiológicas e histológicas1
 1.1.1.- Páncreas exocrino1
 1.1.2.- Páncreas endocrino.....2
 1.2.- Patología pancreática
 1.2.1.- *Diabetes mellitus*.....3
 1.2.2.- Pancreatitis
 Aguda.....4
 Crónica5

2.- MODELO DE PROGRESIÓN TUMORAL.....6

3.- CÁNCER DE PÁNCREAS11

3.1.- Características histológicas11
 3.2.- Características moleculares13
 3.2.1.- Genes alterados13
 3.2.2.- Otros factores alterados17
 3.3.- Modelo de progresión tumoral pancreática19
 3.4.- Metaplasia acinar-ductal en el desarrollo del cáncer de páncreas21
 3.5.- Modelos murinos de tumorigénesis pancreática21
 3.5.1.- Inducción de carcinomas pancreáticos mediante
 agentes químicos22
 3.5.2.- Modelos de ratones transgénicos de cáncer de páncreas23

4.- SISTEMA DEL PLASMINÓGENO31

4.1.- Características del sistema del plasminógeno
 4.1.1- Plasminógeno y plasmina32
 4.1.2.- Activadores del plasminógeno: uPA y tPA33
 4.1.3.- Inhibidores del sistema del plasminógeno35
 4.1.4.- Receptores.....36

4.2.- El sistema de activación del plasminógeno en procesos fisiológicos: evidencia a partir de ratones con deficiencias específicas en los genes.....	41
4.2.1.- Reproducción y desarrollo embrionario.....	42
4.2.2.- Fibrinólisis, curación de heridas, formación de la neoíntima y migración de macrófagos.....	42
4.2.3.- Desarrollo, plasticidad sináptica y muerte neuronal en el Sistema Nervioso Central (SNC).....	43
4.3.- El sistema del plasminógeno en situaciones patológicas y transformación neoplásica.	
4.3.1.- El sistema uPA-uPAR en la migración y la invasión de las células tumorales.....	44
4.3.2.- Expresión de tPA y sus receptores en tumores humanos y contribución a la invasión tumoral.....	45
OBJETIVOS.....	48
 MATERIALES Y MÉTODOS	
1.- Ratones genéticamente modificados.....	49
1.1.- Condiciones de estabulación.....	50
1.2.- Genotipado de los ratones	
1.2.1.- Extracción de DNA a partir de la cola de ratón.....	50
1.2.2.- Amplificación del DNA genómico por PCR.....	50
2.- Generación de animales “híbridos” transgénicos-<i>knock out</i> (Ela1-TAg o Ela1-myc y tPA <i>-/-</i>, uPA<i>-/-</i> o Plg<i>-/-</i>).....	51
3.- Caracterización de los ratones híbridos Ela1-TAg o Ela1-myc y tPA <i>-/-</i>, uPA<i>-/-</i> o Plg <i>-/-</i>	
3.1.- Análisis de los tumores de los ratones Ela1-TAg o Ela1-myc y tPA <i>-/-</i>	
3.1.1.- Procesamiento de los tumores para el estudio histológico e immunolocalización.....	52
3.1.2.- Análisis histopatológico de los tumores.....	53
3.1.3.- Análisis inmunohistoquímico.....	53
3.2.- Estudios de supervivencia.....	55
3.3. Análisis estadístico.....	55
3.4. Análisis de expresión génica diferencial entre los ratones transgénicos Ela1-myc y Ela1-myc:tPA <i>-/-</i> (<i>Microarrays</i>).....	55
3.4.1.- Obtención, amplificación y marcaje del RNA.....	56
3.4.2.- Prehibridación e hibridación de los soportes de vidrio	

con los oligonucleótidos.....	56
3.4.3. Exploración de las imágenes y análisis.....	57
4.- Ratones transgénicos Ela1-tPA y CK19-tPA	
4.1.- Obtención de la construcción Ela1-htPA	
4.1.1.- Selección de la línea celular tumoral pancreática humana para la amplificación del cDNA del tPA mediante RT-PCR.....	58
4.1.2.- Clonaje del tPA humano mediante amplificación por RT-PCR.....	59
4.1.3.- Construcción del plásmido elastasa1-htPA-β-globina- Bluescript.....	59
4.2.- Obtención y genotipado de los ratones Ela1-tPA	
4.2.1- <i>Southern-blot</i>	60
4.2.2.- Análisis de la progenie mediante PCR.....	61
4.3.- Análisis de la expresión de tPA en el transgénico Ela1-tPA mediante RT-PCR.....	61
4.4.- Análisis histológico del páncreas de los ratones Ela1-tPA.....	61
4.5.- Análisis de expresión génica diferencial entre los ratones transgénicos Ela1-tPA y ratones control (<i>Microarrays</i>)	
4.5.1.- Obtención, amplificación y marcaje del RNA.....	62
4.5.2.- Prehibridación e hibridación.....	62
4.5.3.- Exploración de las imágenes y análisis.....	62
4.6.- Construcción del plásmido citoqueratina 19-htPA-β-globina-Bluescript	
4.6.1.- Clonaje del tPA humano.....	63
4.6.2.- Construcción del plásmido CK19-htPA-β-globina-Bluescript.....	63
4.7.- Obtención y genotipado de los ratones Ela1-tPA.....	63
4.7.1.- <i>Southern-blot</i>	64
4.7.2.- Análisis de la progenie mediante PCR.....	64
 RESULTADOS	
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE tPA EN MODELOS MURINOS DE TUMORIGÉNESIS PANCREÁTICA	
1.- Estudio de la expresión de tPA durante la progresión tumoral pancreática murina	65
 2.- Expresión del receptor de tPA, anexina A2, en páncreas normal y tumores pancreáticos murinos.....	69

3.- Efecto de la ausencia de tPA (ratón KO tPA^{-/-}) en la tumorigénesis pancreática murina

3.1.- Cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-TAg y ratones KO tPA^{-/-}.....72

3.2.- Cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-myc y ratones KO tPA^{-/-}.....73

4.-Análisis de expresión génica diferencial entre tumores de ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA^{-/-}.....80

5.- Papel de otros componentes del sistema del plasminógeno en la progresión tumoral pancreática murina

5.1.- Efecto de la ausencia de plasminógeno: cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-myc y ratones KO Plg^{+/-}.....82

5.2.- Efecto de la ausencia de uPA: cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-myc y ratones KO uPA^{-/-}.....84

SOBREEXPRESIÓN DE tPA EN PÁNCREAS MURINO: TRANSGÉNICOS Ela1-tPA y CK19-tPA.

1.-Transgénico Ela1-tPA

1.1- Generación de los ratones Ela1-tPA y análisis de la expresión del transgén

1.1.1.- Selección de la línea celular para clonaje del tPA humano.....85

1.1.2.- Construcción del plásmido elastasa-htPA-β-globina-Bluescript (pEla1-htPA).....85

1.1.3.- Análisis de la integración y expresión del tPA en los ratones transgénicos Ela1-tPA.....86

1.2.- Caracterización del ratón transgénico Ela1-tPA: análisis histológico pancreático.....88

1.3.- Estudio de los genes modificados por la sobreexpresión de tPA en páncreas murino mediante análisis de expresión génica diferencial.....89

2.- Transgénico CK19-tPA

2.1- Generación de los ratones CK19-tPA y análisis de la expresión del transgén

2.1.1.- Obtención de la construcción CK19-htPA-β-globin Bluescript.....91

2.1.2.- Análisis de la integración y expresión del tPA en los ratones transgénicos CK19-tPA.....92

DISCUSIÓN

1.- Expresión de tPA en el carcinoma pancreático murino.....	93
2.- Efecto de la deficiencia de tPA en la progresión tumoral y mecanismos de acción del tPA.....	96
3.- Expresión de la anexina A2 en los tumores de páncreas murinos.....	104
4.- El uPA en los tumores pancreáticos murinos.....	105
5.- Efecto de la sobreexpresión del tPA en el páncreas murino.....	106
CONCLUSIONES	108
BIBLIOGRAFÍA	109

ABREVIATURAS

α_2 -AP: alpha2-Anti Plasmin (alfa2-antiplasmina)
 α_2 -M: alpha2-Macroglobulin (alfa2-macroglobulina)
 α_2 -MR/LRP: alpha2-Macroglobulin/LRP (alfa2-macroglobulina/LRP)
 α_2 -PI: alpha2-Plasminogen Inhibitor (alfa2-inhibidor del plasminógeno)
 α_1 -AT: alpha1-Anti Trypsin (alfa1-anti tripsina)
aa-UTP: aminoallyl-UTP
ACDP: AdenoCarcinoma Ductal Pancreático
ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia (Leucemia linfoblástica aguda)
AML: Acute Myeloblastic Leukemia (Leucemia mieloblástica aguda)
AnxA2: Anexina A2
APL: Acute Promyelocytic Leukemia (Leucemia promielocítica aguda)
APC: *Adenomatous Poliposis coli (Poliposis coli adenomatosa)*
AR: Amphiregulin (anfiregulina)
BMP: Bone Morphogenetic Proteins (Proteínas morfogenéticas óseas)
BOP: N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (N-nitrosobis(2-oxopropil) amina)
BRCA: Breast Cancer susceptibility genes (genes de susceptibilidad a cáncer de mama)
BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino)
CA19-9: Carbohydrate Antigen 19-9 (Antígeno Carbohidrato 19-9)
cAMP: cyclic Adenosin 3'-5' Monophosphate (Adenosín monofosfato cíclico)
CCK2: Colecistoquinina
CEA: Carcinoembryonic Antigen (Antígeno carcinoembrionario)
CK: CitoKeratin (citoqueratina)
Cy: Fluorocromo rojo (Cy-3) o verde (Cy-5)
DAB: 3-3'diaminobencidina
DMBA: 7,12- dimetilbenz(a)antraceno
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DEPC: Di-Etil PiroCarbonato
DMSO: DiMetilSulfoxido
DNA: Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxiribonucleico)
ECM: Extracellular Matrix (Matriz extracelular)
EDTA: Ethylene Diamine Tetracetic Acid (Ácido etileno diamino tetracético)
EGF: Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidérmico)
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)
Ela-1 : Elastasa 1
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS: Fetal Bovine Serum (Suero fetal bovino)
FGF: Fibroblast Growth Factor (Factor de crecimiento fibroblástico)
GPI: Glycosil-Phosfatidil-Inositol
HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (Factor de crecimiento hepatocitario)
HLA: Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitario Humano)
HMG1 : High Mobility Group 1 protein (proteínas de alta movilidad del grupo 1)
HPOP: N-nitrosol(2-hidroxipropil)(2-oxopropil)amine
LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

LDR: LDL receptor-related protein (Proteína relacionada con el receptor de LDL)
LLC: Lung Lewis Carcinoma (Carcinoma pulmonar de Lewis)
MMP: Matrix Metallo Proteinases (Metaloproteasas de matriz)
MNU: N-metil-N-nitrosourea
MUC: Mucinas
MSP: Macrophage Stimulating Protein (Proteína estimuladora de los macrófagos)
MT-MMP: Membrane-Type MMP (MMPs de membrana)
MT-TGF α : Metalotioneina-I -TGF α
NNK: 4-(metinitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanona
NSH-Cy: N-hydroxysuccinimide ester-Cy™
PAI: Plasminogen Activator Inhibitor (Inhibidor del activador del plasminógeno)
PanIN: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (Neoplasia pancreática intraepitelial)
PAs: Plasminogen Activators (Activadores del plasminógeno)
PBS: Phosphate-Buffered Saline (Tampón fosfato salino)
PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción de la polimerasa en cadena)
PDFs: Productos de Degradación de la Fibrina
PI3: Inositol-3-fosfato
PDL: Pancreatic Duct Ligation (ligamiento del conducto pancreático)
PIg: Plasminógeno
RAGE: Receptor of Advanced Glycation End products (Receptor de productos de glicación)
RNA: Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
RT-PCR: Retro transcriptase-Polimerase Chain Reaction
sc-tPA/sc-uPA: single chain tPA/ single chain uPA (tPA o uPA de cadena única)
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SERPINAS: Serine Protease Inhibitors (Inhibidores de serín proteasas)
SNC: Sistema Nervioso Central
SSC: Tampón Cloruro Sódico Acetato Sódico
ssDNA: salmon sperm DNA
SV40: Simian Virus 40
TAg: T Antigen (Antígeno T)
tc-tPA/tc-uPA: two chain tPA/ two chain uPA (tPA o uPA de doble cadena)
TE: Tris HCl-EDTA
TIMP: Tissue Inhibitors of MMPs (Inhibidores tisulares de las MMPs)
TGF: Transforming Growth Factor (Factor de crecimiento transformante)
tPA: tissue type Plasminogen Activator (Activador tisular del plasminógeno)
uPA: urokinase type Plasminogen Activator (Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa)
uPAR: urokinase type Plasminogen Activator Receptor (Receptor del uPA)
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento del endotelio vascular)
VSMCs: Vascular Smooth Muscle Cells (Células musculares lisas vasculares)

RESUMEN

El cáncer de páncreas es la quinta causa de muerte en el mundo occidental y uno de los tumores más agresivos: menos del 5% de los pacientes sobreviven más de doce meses, presentando una supervivencia media entre 4 y 6 meses. En cuanto a las características microscópicas, más del 90% de los tumores pancreáticos humanos se definen como adenocarcinomas ductales.

El sistema del plasminógeno juega un papel importante en la trombólisis intravascular y en procesos biológicos que requieren de la migración celular como son la angiogénesis, reacciones inflamatorias, remodelación de tejidos y la progresión tumoral. La activación del plasminógeno a plasmina, mediada por el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), resulta en la degradación de fibrina y otros componentes de la matriz extracelular, así como en la activación de MMPs, factores de crecimiento latentes y la proteólisis de glicoproteínas de membrana, favoreciendo el desarrollo y diseminación del tumor. Existen muchas evidencias de que el sistema del uPA, incluyendo su receptor de membrana (uPAR) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), contribuyen a la tumorigénesis en diferentes tipos de tejidos. No obstante, hay pocas evidencias en relación al tPA y a su receptor putativo, la anexina A2.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha observado la sobreexpresión de tPA en un alto porcentaje de líneas celulares y tumores pancreáticos exocrinos. Además, se ha detectado que la inhibición del tPA utilizando anticuerpos neutralizantes o agentes químicos comporta una disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales. Por otra parte, tPA es capaz de estimular la proliferación celular y la angiogénesis en tumores pancreáticos exocrinos humanos xenoinyectados en ratones inmnodeprimidos. Nuestro grupo propuso que, en el páncreas, el sistema del tPA tiene un papel importante en la progresión tumoral mientras que uPA tendría un papel dominante en la pancreatitis. Estos datos abrían nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de este tumor tan agresivo. Sin embargo, para analizar estas posibles aplicaciones es necesario recurrir a modelos animales que nos permitan aproximaciones experimentales no factibles en humanos.

El objetivo del trabajo de la presente tesis doctoral ha sido estudiar el papel del tPA en la progresión tumoral *in vivo* mediante el uso de modelos murinos de cáncer de páncreas y analizar su mecanismo de acción. Como modelo de ratones que forman tumores pancreáticos se han utilizado los animales transgénicos Ela1-TAg y Ela1-myc, que sobreexpresan un fragmento (1-127) del antígeno T de SV40 o el oncogén c-myc respectivamente bajo el promotor de la elastasa 1. Asimismo se han utilizado los animales transgénicos Ela1-CCK2 y MT-TGF α , como modelos de estudio de metaplasia acinar-ductal y formación de complejos ductales. Todos estos animales han sido utilizados para caracterizar mediante análisis

inmunohistoquímico la expresión de tPA y de su receptor, anexina A2. Los resultados obtenidos muestran que tPA no se detecta en ningún tipo celular epitelial en el páncreas normal ni en ductos metaplásicos ni en células acinares tumorales, mientras que se encuentra sobreexpresado en los ductos neoplásicos pancreáticos. Este patrón de expresión concuerda con el que había sido descrito inicialmente en tejidos humanos, validando el modelo murino para el estudio de la patología humana. Por otro lado, anexina A2 se detecta en el dominio apical del epitelio de ductos normales y complejos ductales y se encuentra sobreexpresada y despolarizada en los ductos neoplásicos indicando que, si bien puede actuar como receptor para tPA en ductos tumorales, puede también desempeñar otras funciones en las áreas ductales no tumorales.

Para determinar como afecta la inactivación del tPA al desarrollo de los tumores de los ratones Ela1-TAg y Ela1-myc se cruzaron estos animales transgénicos con ratones *knock out* para *tPA* (*tPA*^{-/-}). Los ratones híbridos Ela1-myc:*tPA*^{-/-} desarrollan también tumores pancreáticos y la proporción de tumores con componente ductal no se modifica, indicando que tPA no participa en la metaplasia acinar-ductal. Sin embargo, se observó un incremento de la supervivencia en los animales que no expresan tPA, indicando que esta proteasa favorece la progresión del tumor. Para profundizar en el mecanismo de acción de tPA en este proceso se analizaron factores relacionados con progresión tumoral: los tumores de los ratones Ela1-myc:*tPA*^{-/-} muestran menor vascularización y tasa de proliferación, mientras que la invasión no se ve afectada. Estos resultados indican que la expresión de tPA podría favorecer la progresión del tumor en el adenocarcinoma ductal pancreático promoviendo la angiogénesis y la proliferación celular. Además, una caracterización a nivel molecular, analizando diferencias de expresión génica entre los tumores de los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:*tPA*^{-/-} mediante la utilización de microarrays ha permitido identificar algunos genes relacionados con progresión e invasión candidatos a ser dianas de acción del tPA, aunque es necesaria un estudio más exhaustivo.

Finalmente, con el objetivo de estudiar los efectos directos de la expresión de tPA en el páncreas, bien en células acinares o ductales, se han generado ratones transgénicos que sobreexpresan esta proteína bajo el control del promotor de elastasa 1 (Ela1-tPA) o citoqueratina 19 (CK19-tPA) respectivamente. Los resultados iniciales obtenidos en el análisis de los ratones transgénicos Ela1-tPA muestran que la sobreexpresión del tPA en las células acinares pancreáticas no afecta al desarrollo normal del animal ni provoca alteraciones en el páncreas. No obstante es necesario un estudio más exhaustivo del fenotipo que se encuentra actualmente en curso.

En conjunto, nuestros resultados apoyan un papel relevante para el tPA durante la progresión tumoral pancreática y refuerzan la utilización de modelos murinos tumorales como aproximación a la patología humana, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento del cáncer de páncreas.

INTRODUCCIÓN

1.- EL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano glandular lobulado de color marrón-rosado oscuro que se localiza anatómicamente en el cuadrante superior de la cavidad retroperitoneal del abdomen, extendiéndose desde la concavidad del duodeno hasta el bazo por detrás del estómago. El conducto principal pancreático de drenaje de las secreciones exocrinas se extiende paralelamente junto con el ducto biliar penetrando la pared del duodeno donde se forma la ampolla de Váter. El páncreas de un humano adulto mide 16 centímetros de largo, 6 de ancho y 2.5 de grosor y se diferencia en cuatro regiones: cabeza, cuello, cuerpo y cola (ver Figura 1a). En el ratón presenta un aspecto menos compacto, en forma de lóbulos asociados entre sí.

1.1.- Características fisiológicas e histológicas

El páncreas se caracteriza por presentar gran cantidad de tejido conectivo que penetra en forma de septos dando lugar a la segmentación del órgano en lóbulos macroscópicos. Cada uno de los lóbulos está compuesto por multitud de lobulillos microscópicos que corresponden al componente exocrino pancreático. Por su parte, cada lobulillo consta de un gran número de ramilletes de células, denominados acinos, que sintetizan enzimas digestivos y un componente mucho más pequeño de células intralobulares que transportan los enzimas al intestino y que constituyen el sistema ductal. El otro compartimento fundamental es el páncreas endocrino, que representa un porcentaje más pequeño y consiste en cuatro poblaciones celulares que se agrupan formando los islotes de Langerhans los cuales se distribuyen dispersos entre el tejido exocrino y se caracterizan por secretar hormonas a la circulación sanguínea. Los islotes están irrigados con la sangre que proviene de las arteriolas lobulares. Toda la sangre que drena los islotes atraviesa, mediante los capilares, el tejido exocrino antes de salir de los lóbulos a través de las venas lobulares. Existe pues, una interacción funcional y fisiológica entre el componente exocrino y endocrino (Bockman D.E., 1993; Urrutia P. y Di Magno E.P., 1996).

1.1.1.- Páncreas exocrino

El componente exocrino del páncreas constituye el 85 % del total de las células de la glándula. Este tejido está constituido por una elevada cantidad de células acinares que se caracterizan morfológicamente por ser ricas en retículo endoplasmático rugoso (RER) y gránulos de zimógeno reflejando su carácter secretor. Al nivel molecular las células acinares producen y secretan una gran variedad de precursores enzimáticos que facilitan la digestión. Algunos de los precursores secretados son proteolíticos (tripsinógeno, quimiotripsinógeno y proelastasa), otros son de carácter lipolítico (profosfolipasa y prolipasa) y también pueden

secretar amilasa, colesterol esterasa y nucleasas. Estos enzimas se acumulan en los gránulos de zimógeno y cuando las células reciben el estímulo correspondiente son secretados al lumen acinar. A través de los conductos intralobulares, que confluyen en los conductos interlobulares, los enzimas se secretan finalmente, al conducto principal pancreático por el que son transportados al duodeno (Bockman D.E., 1993).

En el páncreas exocrino existe otra población celular, en menor proporción pero igualmente importante, que corresponde a las células ductales que constituyen el sistema ductal pancreático. Estas células epiteliales forman los conductos pancreáticos intralobulares y los ductos intercalados entre los acinos, constituyendo una red ductal muy ramificada que transporta hacia el intestino iones bicarbonato y los enzimas secretados por las células acinares (ver Figura 1b).

1.1.2.- Páncreas endocrino

Representa tan sólo el 1% de la masa total del páncreas, localizándose en los denominados islotes de Langerhans donde se agrupan las cuatro poblaciones de células que lo forman (Figura 1c).

- Células β : Representan el 68-80% de las células del islote, distribuidas en el centro, y son las secretoras de insulina.
- Células α : Suponen un 14-20% del total del islote y son las encargadas de secretar glucagón.
- Células δ : Constituyen el 5-10% de las células de los islotes y producen la hormona somatostatina.
- Células PP: Constituyen el 1% de las células de los islotes y se caracterizan por secretar el polipéptido pancreático (Slack J.M., 1995).

Las hormonas insulina y glucagón juegan un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa y la función de ambas ha sido ampliamente estudiada debido a su implicación en la principal enfermedad pancreática de nuestra sociedad, la *diabetes mellitus*.

La insulina es secretada por las células β en respuesta al aumento de los niveles sanguíneos de glucosa tras la ingesta de comida. Este aumento sirve como señal para los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) para utilizar la glucosa. Adicionalmente, la insulina secretada inhibe la producción de glucosa por parte del hígado. La secreción de glucagón, por el contrario, se estimula cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, movilizandando las reservas de glucógeno del hígado. Así pues, insulina y glucagón tienen funciones antagónicas. Por otro lado, la somatostatina inhibe la secreción de insulina y el polipéptido pancreático tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de enzimas digestivos por parte de las células acinares del componente exocrino (Wilson J.D., 1991).

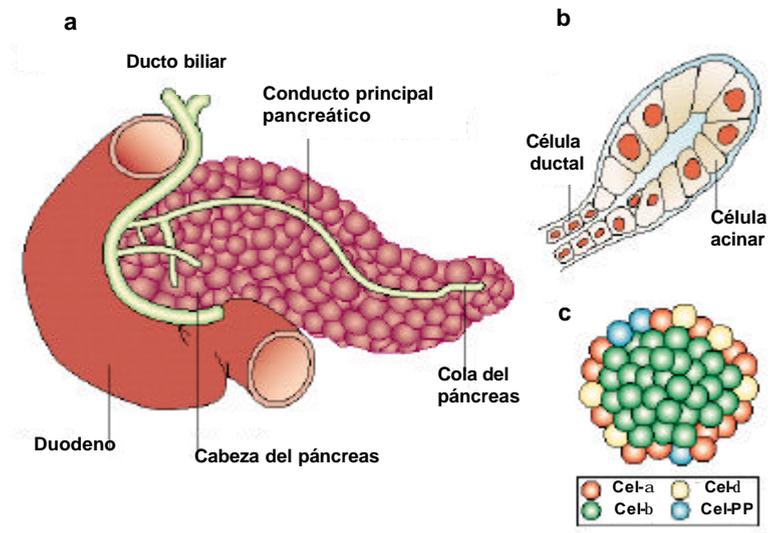


Figura 1.- El páncreas: un órgano mixto endocrino y exocrino.

(a) Partes diferenciadas del órgano maduro, que está adyacente al duodeno. (b) Tipos celulares del páncreas exocrino, las células acinarias secretan enzimas digestivos que son transportados al intestino a través del sistema ductal. (c) El páncreas endocrino está formado por 4 poblaciones celulares que secretan insulina (células β , verdes), glucagón (células α , rojas), somatostatina (células δ , amarillas) y péptido PP (células PP, azules). (Figura adaptada de Edlund H., 2002).

1.2.- Patología pancreática

1.2.1.- Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más común, siendo muy importante tanto por su incidencia como por la pérdida de la calidad de vida de los pacientes y el coste socio-económico que representa. Esta enfermedad consiste en un defecto en la regulación del metabolismo de la glucosa resultando en hiperglucemia, poliuria, alteraciones del metabolismo de lípidos y proteínas, neuropatía, fallo vascular y retinopatía. Existen dos tipos de diabetes, la de tipo 1 o insulino-dependiente y la de tipo 2 o insulino-independiente. La diabetes de tipo 1 aparece durante la niñez o adolescencia y está causada por la destrucción de las células β de los islotes de Langerhans, lo que conlleva una ausencia total de secreción de insulina. Tal destrucción es provocada por una reacción autoinmune mediada por los linfocitos T, y se desencadena por una infección vírica o por predisposición genética. Se ha observado que una asociación de este tipo de diabetes con algunos alelos de los antígenos HLA de clase II. La terapia básica más empleada es la administración diaria de insulina. Respecto a la diabetes de tipo 2, suele aparecer en personas de edad media obesas como consecuencia de una resistencia a la insulina por parte de los tejidos diana periféricos. En estos individuos no existe asociación genética con los antígenos de HLA y en general no es necesaria la administración

de insulina ya que los niveles de secreción son normales. La terapia consiste en un control calórico de la dieta y la práctica de ejercicio junto con medicación (Grenberger N., Toskes P. y Isselbacher K.J., 1991).

1.2.2.-Pancreatitis

La pancreatitis es una enfermedad inflamatoria del páncreas que se puede clasificar en dos tipos en base al criterio de si se reestablece la función normal de la glándula, pancreatitis aguda, o si por el contrario, queda un daño residual permanente, pancreatitis crónica.

Pancreatitis aguda

La pancreatitis aguda presenta una incidencia que varía entre los diferentes países pero que oscila entre 10-20 casos por cada 100.000 habitantes y año. Los factores de riesgo más importantes asociados a esta patología son el alcoholismo y los cálculos obstructivos del conducto biliar. No obstante, se asocia también a infecciones virales (ej: micoplasma, hepatitis), fármacos (ej: sulfonamidas, furosemida, estrógenos, tetraciclina), alteraciones metabólicas (ej: hipertrigliceridemia, hipercalcemia, fallo renal) y trauma postoperatorio abdominal entre otros. Las principales alteraciones asociadas a esta patología son consecuencia de la activación de los enzimas pancreáticos dentro del mismo órgano antes de liberarse al lumen intestinal. Dichos enzimas provocan la autodestrucción del tejido pancreático, proteólisis, edema, hemorragia intersticial por la destrucción de los vasos sanguíneos, reacción inflamatoria, necrosis de las células parenquimales y necrosis grasa por acción de los enzimas lipolíticos. El mecanismo por el cual se produce la activación en el páncreas de los enzimas pancreáticos no se conoce bien pero algunas causas que lo explicarían son:

- La obstrucción del conducto pancreático principal que provocaría un aumento de la presión ductal favoreciendo la acumulación del líquido intersticial rico en enzimas proteolíticos (ej: tripsinógeno, quimiotripsinógeno, proelastasa y fosfolipasa A). Éstos provocarían la necrosis inicial del tejido pancreático así como la reacción inflamatoria y el edema.
- La lesión primaria que se produce en las células acinares podría ser la causa de las pancreatitis producidas por virus, fármacos o traumatismos directos.
- La formación anómala de los granos de zimógeno en las células acinares facilitaría que los proenzimas pancreáticos estén en contacto con los enzimas de los lisosomas en el citoplasma provocando su activación.
- Una hiperestimulación de la secreción pancreática provocaría una gran producción de enzimas pancreáticos dentro de la célula acinar.

Pancreatitis crónica

La mayor parte de los episodios de pancreatitis crónica son secundarios a la ingesta de alcohol. En conjunto, el 70% de los casos mundiales de pancreatitis crónica son del tipo calcificante inducidas por alcohol. Este porcentaje puede ascender hasta el 90% si se consideran sólo países con alta ingesta de alcohol sin desnutrición generalizada de la población. Es difícil conocer datos exactos sobre la incidencia y la prevalencia de la pancreatitis crónica, ya que es posible la existencia de casos de pancreatitis crónica no diagnosticados, debido a que las manifestaciones clínicas de la enfermedad no son siempre evidentes ni precoces.

La pancreatitis calcificante, que es la forma más frecuente de la pancreatitis crónica, presenta dos variantes etiológicas (tropical y alcohólica), por lo demás son idénticas en cuanto al aspecto histológico. La variante tropical afecta a niños y adultos jóvenes no alcohólicos de áreas donde existe desnutrición poblacional. El papel de la malnutrición en la etiopatogenia de la pancreatitis tropical parece sólidamente establecido. En el caso de la pancreatitis crónica alcohólica existe una sólida evidencia acumulada sobre la capacidad del alcohol para inducir lesión pancreática directa mediante diversos mecanismos, pero también es importante considerar los factores dietéticos. El alcohol es, además, capaz de producir lesión pancreática directa mediada por hipotonía del esfínter de Oddi, lesión celular directa y modificaciones de la secreción pancreática, con precipitaciones de proteínas que taponan el conducto en ausencia de una proteína inhibidora de la precipitación.

Otras causas menos frecuentes provocan tipos raros de pancreatitis crónica: Pancreatitis crónica asociada a la hipercalcemia, descrita en el hiperparatiroidismo, siendo la hipercalcemia un poderoso estimulante de la secreción pancreática. La consecuencia es la aparición de precipitados cálcicos capaces de iniciar un mecanismo patogénico semejante al de la pancreatitis crónica alcohólica. La pancreatitis crónica obstructiva es consecuencia de la obstrucción del conducto pancreático principal, ya sea por tumores, estenosis benigna de la papila, lesiones cicatriciales por traumatismos o pseudoquistes. Existe una rara variante de pancreatitis hereditaria de tipo autosómico dominante. Y finalmente un grupo de pancreatitis debe ser considerada formalmente como idiopática, aunque suele denominarse a estos casos pancreatitis crónica no alcohólica.

2.- MODELO DE PROGRESIÓN TUMORAL

El desarrollo tumoral es un proceso que consta de múltiples etapas en las que se suceden alteraciones genéticas y epigenéticas que determinan la transición de la célula normal a tumoral. En la primera fase del desarrollo de un tumor (iniciación) se producen mutaciones en algún gen que controla el proceso, pudiendo la célula mutada (o iniciada) pasar inadvertida durante un largo período de tiempo. El aumento de la incidencia del cáncer por la repetida exposición a agentes iniciadores (carcinógenos) indica la necesidad de mutaciones sucesivas. Sin embargo existen sustancias que no producen mutaciones, pero que pueden aumentar la incidencia del cáncer. Estos agentes, conocidos como promotores tumorales, estimulan el crecimiento de las células iniciadas que, como consecuencia de la acción de agentes iniciadores presentan ya alguna alteración. De este modo se favorece la acumulación de nuevas mutaciones ya que la división celular aumenta el riesgo de adquirirlas. Durante la siguiente fase, progresión tumoral, se adquieren nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad por adquisición de capacidad invasiva, lo que permite a las células escapar del tumor inicial, colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos formando focos tumorales secundarios o metástasis (revisado por Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000).

Con los conocimientos actuales, el proceso por el cual las células de un tumor pueden adquirir el fenotipo invasivo y metastático se resumen en los siguientes pasos (ver Figura 2):

1. Crecimiento local y progresivo del tumor.
2. Creación de una red de vascularización del tumor que asegure su estabilidad, angiogénesis.
3. Adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular (ECM) que separa los diferentes tejidos.
4. Proteólisis y destrucción de los componentes de la matriz extracelular y membrana basal por parte de las células tumorales.
5. Migración de las células tumorales a través de la membrana basal hacia el estroma intersticial.
6. Entrada de las células tumorales a los vasos linfáticos y sanguíneos y posterior circulación de las células tumorales.
7. Embolismo de las células tumorales en los capilares de órganos distantes.
8. Migración transendotelial de las células tumorales en las vénulas y arteriolas.
9. Establecimiento y proliferación de la nueva colonia tumoral en el tejido u órgano diana (metástasis).
10. Generación de una nueva red de vasos sanguíneos (angiogénesis) en la metástasis.

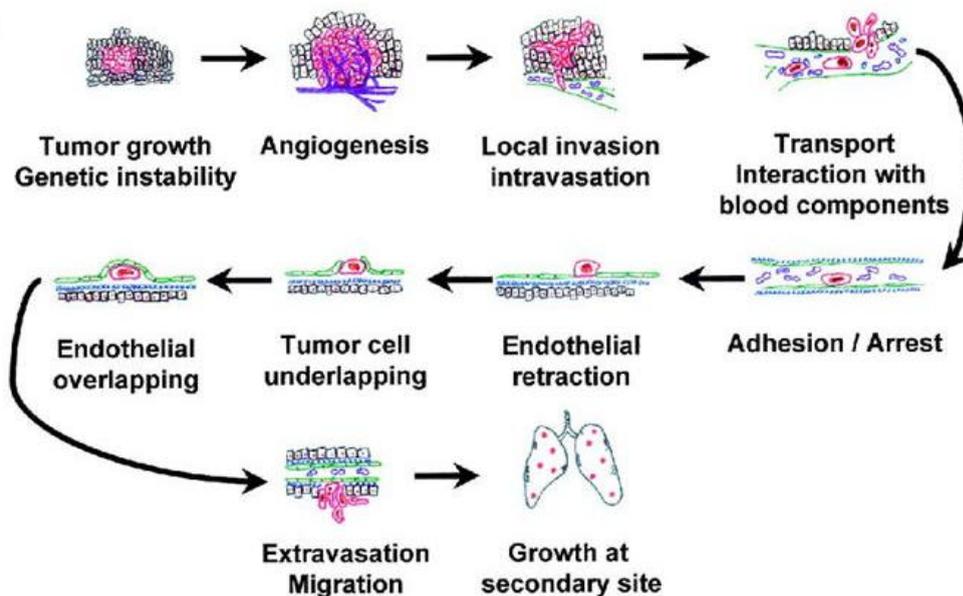


Figura 2.-Resumen de las etapas en el desarrollo y progresión tumoral (Welch D.R., 1999).

Para algunos tipos de cánceres se conocen una serie de alteraciones en oncogenes y genes supresores cuya implicación en el desarrollo tumoral parece consistente. El cáncer de colon humano es el proceso tumorigénico en el que mejor se ha podido establecer una secuencia de cambios genéticos que correlaciona con etapas específicas de la progresión tumoral. Vogelstein y Kinzler, propusieron un modelo de tumorigénesis colónica en el que los adenomas benignos progresan hasta carcinomas con capacidad de metastatizar al adquirir, de forma secuencial, una acumulación de mutaciones en los genes *APC*, *K-ras*, *DCC* y *p53* (Kinzler K.W. y Vogelstein B., 1996). Sin embargo, existen más de cien tipos diferentes de cáncer y las alteraciones celulares que presentan son muy diversas entre ellos. A pesar de dicha complejidad, se puede considerar que la diversidad de genotipos de las células tumorales es consecuencia de seis alteraciones fisiológicas esenciales que en su conjunto conducen al crecimiento maligno (revisado por Hanahan D. y Weinberg RA, 2000):

1.- Autosuficiencia en señales de crecimiento

Esta característica que exhiben las células tumorales implica la autosuficiencia de las señales mitogénicas para proliferar y, por otro lado, el bloqueo de las múltiples señales antiproliferativas que se producen en la célula para mantener un estado de quiescencia.

Las células normales requieren señales de crecimiento mitogénico para pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activo. Dicha necesidad se observa cuando se intenta propagar las células normales en cultivo, donde sólo proliferan cuando se les aporta los

factores mitogénicos y la matriz apropiados. Dicho resultado contrasta con el de las células tumorales, las cuales muestran una reducción de la dependencia de estimulación de factores de crecimiento exógenos. Muchos de los oncogenes sobreexpresados o mutados en las células tumorales pueden actuar mimetizando estos factores a distintos niveles. Parece que las células tumorales generan gran cantidad de señales de proliferación propias, reduciendo así su dependencia de la estimulación por parte del tejido normal que le rodea.

2.- Insensibilidad a señales que inhiben la proliferación

Dentro de un tejido normal, existen inhibidores del crecimiento (solubles o inmovilizados en la ECM o la superficie celular) que constituyen señales antiproliferativas que mantienen la quiescencia celular y la homeostasis tisular. El bloqueo proliferativo puede ser temporal, si las células retienen la capacidad de entrar en el ciclo celular desde un estado quiescente cuando las señales extracelulares las induzcan, o permanente cuando pasan a estados post-mitóticos asociados a diferenciación celular específica. Las células tumorales son capaces de desarrollar mecanismos para evadir estas señales antiproliferativas (Hanahan D. and Weinberg R.A., 2000).

3.- Evasión de la muerte celular por apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un recurso que presentan casi todos los tipos celulares y que les permite auto eliminarse una vez cumplida su función fisiológica o tras recibir daño genético o celular irreparable. Las células tumorales desarrollan mecanismos que bloquean dicho programa de muerte celular y sobreviven pese a la acumulación de daño genético. Existen diversas estrategias para bloquear la apoptosis por parte de las células tumorales pero la más común es la pérdida de la regulación pro-apoptótica mediante el gen supresor de tumores *p53*, que se ha estimado ocurre en el 50% de todos los tumores humanos.

4.- Potencial replicativo ilimitado

La mayoría de células de los mamíferos presentan programas intrínsecos que limitan su propia proliferación y son mecanismos independientes de las señales extracelulares. Dichos programas deben estar alterados en los clones de células capaces de expandirse y constituir tumores macroscópicos. Las células normales en cultivo tienen un potencial replicativo limitado presentando un número determinado de divisiones; tras alcanzarlo, las células dejan de crecer (senescencia) y mueren. Por el contrario, diferentes tipos de células tumorales que se propagan en cultivo presentan un potencial replicativo ilimitado convirtiéndose en células inmortalizadas. Este fenotipo es el que adquieren las células *in vivo* durante la progresión tumoral y es esencial para el desarrollo de su estado de crecimiento maligno (Hayflick L., 1997).

La limitación del número de divisiones que puede padecer una célula viene determinada por los extremos de los cromosomas, conocidos como telómeros. En cada ciclo

replicativo las células normales pierden entre 50-100 pb del DNA telomérico por la incapacidad de las polimerasas del DNA de replicar los extremos 3' de los cromosomas. El acortamiento de los telómeros origina fusiones cromosómicas y otras aberraciones cariotípicas que desembocan en la crisis senescente y posterior muerte celular. La mayoría de las células tumorales son capaces de preservar la integridad de los telómeros; el 85-90 % de los tumores mantienen la longitud de los telómeros aumentando la expresión de la enzima telomerasa, la cual añade repeticiones de hexanucleótidos en el final del DNA telomérico (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000).

5.- Angiogénesis

Cuando la masa tumoral alcanza un cierto tamaño, es necesaria la creación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que permitan el aporte de nutrientes y oxígeno a las células tumorales y que constituyan una red vascular adecuada para el desarrollo tumoral. Los tumores activan la angiogénesis alterando el equilibrio entre los factores inductores e inhibidores (Hanahan D. y Folkman J., 1996), generalmente a nivel de la transcripción génica. Muchos tumores aumentan la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y/o el factores de crecimiento fibroblástico (FGF). En otros casos, se reduce la expresión de factores inhibidores endógenos como la trombospondina-1 o el interferón- β . Los capilares de nueva formación suponen también una vía de escape para las células tumorales que pueden acceder a tejidos distantes a través del torrente sanguíneo y así formar focos secundarios o metástasis (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000).

6.- Invasión tisular y metástasis

Durante el desarrollo de muchos tipos de cánceres humanos, el tumor primario contiene células pioneras capaces de disociarse, invadir los tejidos adyacentes y viajar a órganos distantes donde forman nuevas colonias. La primera fase de invasividad de las células epiteliales es la reducción de la adhesión, que causa la separación de las células vecinas a las que normalmente están unidas y se produce una disminución de la expresión de proteínas responsables de la adhesión célula-célula (p. ej: E-cadherina, cateninas) y de la célula a los sustratos de la matriz extracelular (p. ej: integrinas) (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000).

En la invasión se degrada la ECM por el aumento de la actividad proteolítica consecuencia tanto del incremento de la expresión y secreción de proteasas, como de la disminución de la producción de los inhibidores de esas proteasas. Existe una buena correlación entre la agresividad tumoral y el nivel de secreción de proteasas como las metaloproteasas de matriz (MMPs), las serina-proteasas uPA y tPA y las catepsinas B, C, H, L y D. Dicha actividad proteásica se concentra en la región pericelular específicamente en las zonas de expansión invasiva tumoral. En ocasiones las proteasas y sus inhibidores están anclados a la membrana mediante dominios transmembrana, como es el caso de la MT-MMP-1

que forma complejos con el inhibidor TIMP-2 que sirve de receptor de varias colagenasas (revisado por Chambers A.F. and Matrisian L.M., 1997; Stetler-Stevenson W.G y Yu A.E., 2001). Del mismo modo, la unión del uPA a su receptor específico uPAR, presente en la membrana celular, consigue concentrar la actividad del uPA y limitar su función al microambiente cercano a las células que lo expresan (revisado por Ossowski L. and Aguirre-Ghiso J.A., 2000).

Una vez degradada la matriz, las células tumorales son capaces de migrar para alcanzar los vasos sanguíneos. La migración celular requiere una interacción dinámica entre la célula y su sustrato, en la que tienen un papel central los filamentos de actina y otros componentes del citoesqueleto, las moléculas de adhesión localizadas en la membrana celular, como las integrinas, y ciertas moléculas de la ECM como la fibronectina, el colágeno y la tenascina. Ya en el torrente sanguíneo, las células tumorales tienen que evitar el sistema inmune, adherirse a la pared de los vasos en una región distante y finalmente extravasarse a tejidos distantes (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000).

3.- CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas exocrino es la quinta causa de muerte por enfermedad maligna en el mundo occidental siendo uno de los tumores humanos más agresivos que existen (AGA, 1999; Bardeesy N., Sharpless y col., 2001; Evans D.B., Abbruzzese J.L. y Willet C.G, 2001; Jaffee E.M., Hruban R.H. y col., 2002; Real, 2003). Dicha agresividad se refleja en el hecho de que menos del 5% de los pacientes sobreviven más de doce meses siendo la supervivencia media entre 4 y 6 meses. Por otro lado, la duodenopancreatectomía radical es el único tratamiento curativo y la supervivencia de pacientes con un tumor de 2 cm que sobrevive dos años después de la operación es de un 20% (AGA, 1999). Las razones que explican tal agresividad no se conocen pero pueden estar relacionadas con la localización anatómica de la glándula así como con alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo del tumor u otros factores epigenéticos que incluyen la reacción desmoplásica asociada al tumor.

Se han realizado numerosos estudios para aclarar que factores podrían ser responsables del desarrollo del carcinoma de páncreas. A partir de ellos, se han postulado diferentes factores que contribuyen tales como la edad (raro antes de los 40 años de edad), el sexo (hombres), la exposición a carcinógenos del tabaco, una dieta rica en grasa y elevada ingesta de carne, la raza negra y la pancreatitis crónica hereditaria (Raijman I y Levin B., 1993). No obstante, la más sólida evidencia acumulada se encuentra en la responsabilidad del tabaco y de la ingesta de alcohol como agentes causales de cáncer pancreático exocrino, aunque con respecto al alcohol existen resultados contradictorios (revisado por Bardeesy N., Sharpless N.E. y col., 2001; Lowenfels AB, Maisonneuve P., 2002).

Por otro lado, los tumores que afectan al páncreas endocrino (o neuroendocrino), se originan en las células de los islotes de Langerhans, y se clasifican en funcionales, si se asocian a un síndrome clínico como consecuencia de la liberación anómala de hormonas, o no funcionales si no lo hacen. No obstante, los tumores endocrinos son muy poco frecuentes, siendo la prevalencia de los tumores funcionales de <1 por 100.000 habitantes y año.

3.1.- Características histológicas

En base a las características histológicas, más del 90% de los tumores malignos de páncreas se originan a partir del epitelio ductal y se definen como adenocarcinoma ductal pancreático, ACDP (Klöppel, 1986; Longnecker DS, 1986). Se piensa que en la mayoría de casos, el adenocarcinoma ductal surge de una lesión PanIN de alto grado. No obstante, existen variantes histológicas que suponen una pequeña proporción, como el tumor intraductal papilar mucinoso que surge a partir de grandes ductos pancreáticos y produce elevadas cantidades de mucinas extracelulares, los carcinomas medulares con una apariencia histológica

indiferenciada o el carcinoma de células gigantes (Jaffee E.M., Hruban R.H. y col., 2002). También se encuentra el carcinoma de origen no ductal, denominado carcinoma acinar el cual representa únicamente el 1% de los tumores exocrinos. Histológicamente, se caracterizan por presentar estructuras trabeculares que separan las formaciones acinares mantenidas con poca cantidad de estroma (Klöppel G. y Maillet B., 1996).

Entre el 60% y 70% de las veces, el tumor exocrino se asienta en la cabeza del páncreas, provocando con bastante frecuencia fenómenos obstructivos de la vía biliar que cursan con ictericia. El adenocarcinoma pancreático es macroscópicamente una lesión bien definida que ocupa y desplaza tejido pancreático, consistente y de una coloración blanco-grisácea. El patrón microscópico es variable pudiendo presentar en algunos casos una morfología bien diferenciada. En general, estos tumores presentan glándulas de tamaño y diferenciación variable.

Las formas mejor diferenciadas de los tumores pancreáticos se asemejan al nivel citológico e histológico a las estructuras ductales y biliares normales. Las glándulas neoplásicas están formadas por células cilíndricas o cuboidales que producen mucinas. El núcleo tiende a situarse en la parte basal de las células pero con el aumento de irregularidades y del tamaño celular, se pierde la polaridad. En las estructuras tubulares y en las glándulas microcísticas, el epitelio forma proyecciones papilares con patrones cribiformes. Junto a las estructuras de tipo ductal bien diferenciadas suelen aparecer áreas de glándulas pequeñas. En los tumores peor diferenciados existe un notable pleomorfismo celular y nuclear y una gran cantidad de desmoplasia asociada en respuesta a la infiltración de las estructuras de tipo ductal. Dicha reacción desmoplásica otorga consistencia al tumor (Klöppel G. y Maillet B., 1996).

Inmunocitoquímica y bioquímicamente se han detectado los componentes de la ECM colágeno de tipo I y IV y fibronectina formando parte del denso estroma fibroso (Klöppel G. y Maillet B., 1996). En las glándulas neoplásicas, la membrana basal pierde gran cantidad de colágeno que se correlaciona con el aumento de la desorganización celular y la deposición discontinua de laminina (Mollenhauer J., Roether I. y Kern H.F., 1987).

En numerosas ocasiones, se encuentran lesiones no invasivas asociadas al adenocarcinoma ductal infiltrante pancreático. Dichas lesiones conocidas como PanIN han sido recientemente clasificadas por un panel patrocinado por el *National Cancer Institute* de EEUU (Hruban R.H. y col., 2001). La progresión de estas lesiones comienza con una neoplasia con epitelio mucinoso plano sin displasia (PanIN-1A) que evoluciona a una lesión en la que aparecen papilas (PanIN-1B). Si el epitelio mucinoso, plano o papilar, presenta displasia leve-moderada (PanIN-2), se aprecia una ligera a moderada irregularidad nuclear, hiperchromasia y pérdida de polaridad celular. Estas lesiones progresan a las denominadas PanIN-3 o carcinoma *in situ*, que se caracterizan por presentar un epitelio mucinoso papilar o plano con displasia severa (marcada irregularidad nuclear, hiperchromasia y pérdida de polaridad), que a menudo

están asociadas a estructuras cribiformes y/o *blebbing* intraluminares (Klein W.M., Hruban R.H y col., 2002).

Respecto a los marcadores característicos del adenocarcinoma pancreático, los más utilizados son el CA19-9 (reconoce el antígeno sialil-Lewis a, una estructura de carbohidratos compartida por el monosialogangliósido y las mucinas) y el Antígeno Carcinoembrionario (CEA). A pesar de que el anticuerpo CA19-9 es mejor para el reconocimiento serológico del carcinoma pancreático, éste no es capaz de discriminar entre células pancreáticas ductales normales y neoplásicas. El anticuerpo CEA en cambio, es capaz de distinguir las así como una distinción entre carcinomas de tipo ductal o no (ej: carcinoma de células acinares). Otros marcadores utilizados en el adenocarcinoma ductal pancreático y que son típicos de células ductales no neoplásicas son las mucinas MUC3, MUC4 y MUC5B (Balague C, Audie J.P. y col., 1995), las citoqueratinas 7 y 19 (Schüssler M.H., Skoudy A y col., 1992) y la anhidrasa carbónica de tipo II (Kim J.H., Ho S.B. y col., 1990).

3.2.- Características moleculares

La mayoría de los adenocarcinomas pancreáticos comparten alteraciones genéticas similares y presentan una evolución clínica de la enfermedad relativamente homogénea. Tanto es así que la mayoría de adenocarcinomas pancreáticos presentan mutaciones puntuales en el gen *K-ras* y un número significativo de ellos sufren la inactivación del gen *p16* (Moskaluk C.A., Hruban R.H. y Kern S.E., 1997; Wilentz R.E., Geradts J., y col., 1998). Existe además, un número considerable de genes que, aunque en menor proporción, también se encuentran mutados en el ACDP. Otros mecanismos moleculares que pueden contribuir a la carcinogénesis del páncreas incluyen la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores así como moléculas implicadas en angiogénesis o degradación de la matriz extracelular. En la Tabla 1 se resumen las mutaciones más comunes que se observan en el cáncer de páncreas humano.

3.2.1.- Genes alterados

Oncogenes

K-ras

K-ras es uno de los tres miembros de la familia génica Ras en humanos que codifican para proteínas de 21 kDa con actividad para hidrolizar la guanosina trifosfato (GTPasa). La mutación activadora más frecuente se localiza en el codón 12, y ocasionalmente, se producen mutaciones en los codones 13 y 61 del oncogén *K-ras* (Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A. y col., 2000). La presencia de un residuo glicina en el codón 12 es necesaria para una función correcta de las proteínas Ras. Cuando se sustituye esta glicina por otro residuo (excepto prolina) resulta en una activación oncogénica de estas moléculas. Dicha activación genera señales a través de la proteína *K-ras* activada que son independientes de la actividad de

receptores tirosina quinasa de membrana, resultando en una señal constitutiva de proliferación hacia el núcleo (Almoguera C., Shibata D. y col., 1988; Hilgers W. and Kern S.E., 1999). La incidencia de mutaciones en el gen *K-ras* varía ampliamente entre los diferentes tipos de cáncer presentando la mayor incidencia en el cáncer de páncreas. Mutaciones en el oncogén *K-ras* están presentes en el 90-95% de los carcinomas pancreáticos humanos (Almoguera C., Shibata D. y col., 1988). Dichas mutaciones se presentan exclusivamente en el codón 12 aunque con un espectro mutacional diferente al que se observa en el cáncer de colon (Forrester K., Almoguera C. y col., 1987; Vogelstein B., Fearon E.R. y col., 1988). Debido a que la mayoría de carcinomas pancreáticos presentan mutaciones en *K-ras*, se propuso como marcador de malignidad. No obstante, las mutaciones no se dan únicamente en tumores pancreáticos apareciendo también, en hipertrofias mucinosas e hiperplasia ductal papilar (Yanagisawa A, Ohtak K y col., 1993; Caldas C, Hahn S.A. y col., 1994), así como en lesiones proliferativas focales PanIN-1B de individuos que no padecen cáncer de páncreas (Terhune P.G., Phifer D.M. y col., 1998). Por tanto, los datos existentes sugieren que las mutaciones en *K-ras* se producen como eventos tempranos de la carcinogénesis pancreática.

AKT2

Otro oncogén alterado en el carcinoma pancreático es *AKT2*. Identificado como uno de los homólogos humanos al oncogén *v-akt*, codifica para una proteína serina/treonina quinasa que presenta una secuencia y estructura homóloga a los miembros de la proteína quinasa C (Cheng J.Q. y col., 1992). *AKT2* está amplificado o sobreexpresado en un 10% de los tumores primarios pancreáticos y en líneas celulares de cáncer de páncreas humanas (Franke T.F. y col., 1995).

EGFR y HER-2/neu

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), conocido también como *c-erbB1*, es una proteína transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca y está implicada en el crecimiento y diferenciación celular. Se ha descrito que la proteína está sobreexpresada en el adenocarcinoma pancreático por elevados niveles de transcripción del gen (Lemoine N.R., Huges C.M. y col., 1992). De igual manera, se ha observado que sus ligandos EGF y TGF α están sobreexpresados en los carcinomas pancreáticos humanos (Barton C.M., Hall P.A. y col., 1991; Yakamada Y. Friess H., y col., 1993). La capacidad mitogénica que presenta TGF α en líneas celulares que contienen los receptores EGF sugiere que TGF α está potencialmente implicado en la progresión tumoral pancreática mediante mecanismos autocrinos.

EGFR pertenece a una familia de receptores transmembrana tirosina quinasa muy relacionados entre sí que incluyen *HER-2/neu*, *HER-3* y *HER-4*. El receptor *HER-2/neu*, conocido también como *erbB-2* está sobreexpresado en el 20% de los carcinomas pancreáticos, en ausencia de amplificación génica (Hall P.A., Huges C.M. y col., 1990; Williams

T.M., Weiner D.B. y col., 1991). Un estudio reciente muestra que el patrón de expresión de *erbB-2* está relacionado con la diferenciación glandular y con eventos precoces en la génesis del carcinoma pancreático aunque no está relacionado con diferencias en la supervivencia (Dugan M.C., Dergham S.T. y col., 1997). Por el contrario, *HER-3* (*erbB-3*) se encontró asociado al estado avanzado del tumor y a una supervivencia post-operatoria menor (Friess H., Yakamada Y. y col., 1995).

Genes supresores de tumores

p16/INK4a

El gen supresor de tumores *p16* (*INK4a*, *CDKN2*, *MTS1*) se localiza en 9p21 y codifica para una proteína, p16, que es un inhibidor del complejo quinasa que forman la ciclina D-Cdk4 y la ciclina D-Cdk6 actuando por lo tanto, como regulador de la progresión de la fase G1 del ciclo celular (Serrano M., Hannon G.J. y Beach D., 1993). En los tumores pancreáticos se ha observado la inactivación de *p16/INK4a* en el 95% de los casos (Caldas C., Hahn S.A. y col., 1994) como consecuencia de una delección homocigota, mutación intragénica o hipermetilación del promotor (Schutte M., Hruban R.H. y col., 1997). No obstante, en un estudio inmunohistoquímico sobre lesiones precursoras de pacientes con carcinomas pancreáticos, Wilentz R.E. y colaboradores demostraron que la pérdida de *p16/INK4a* ocurría frecuentemente, pero no exclusivamente, en las lesiones de alto grado (Wilentz R.E., Geradts J., y col., 1998). Por otro lado, análisis de metilación muestran que la inactivación de *p16/INK4a* ocurre en estados intermedios/tardíos de la transformación de las células ductales (Fukushima N. y col., 2002), posteriores a la activación de *K-ras* (Hruban R.H., Wilentz R.E., y Kern S.E., 2000).

p53

Localizado en el cromosoma 17 (17p13) el gen *p53* codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa que funciona como un factor de transcripción que se activa cuando se produce daño celular. La proteína p53 activada regula vías de señalización que permiten a las células detener el ciclo celular o entrar en apoptosis (Levine A.J., 1997). La inactivación de *p53* es la alteración genética más común encontrada en las enfermedades malignas humanas. En el caso de los carcinomas pancreáticos infiltrantes, el gen supresor de tumores *p53* está inactivado en el 50-75% de los casos (Pellegata N.S., Sessa F. y col., 1994; Redston M.S., Caldas C. y col., 1994). En otros estudios, se ha observado que las alteraciones de *p53* están ausentes en lesiones PanIN-1 pero aparecen en las lesiones PanIN-2 con una frecuencia entre 33% y 77% a medida que aumenta el grado de la lesión (Lüttges J., Galehdari H. y col., 2001; Yamano M., Fujii H. y col., 2000). Estas observaciones coinciden con las de DiGiusseppe y colaboradores que encontraron sobreexpresión nuclear de p53 en lesiones de alto grado (carcinomas *in situ*) pero no en lesiones ductales de bajo grado (DiGiusseppe J.A., Hruban R.H. y col., 1994). Los resultados disponibles hasta el momento, sugieren que la inactivación

de *p53* es un evento que sucede en los últimos estadios de la progresión genética de los ductos pancreáticos (Hruban R.H., Wilentz R.E., y Kern S.E., 2000).

DPC4/SMAD4

Localizado en el cromosoma 18q21, el gen supresor de tumores *DPC4/SMAD4* es un regulador del crecimiento celular que participa en la transmisión de señales de la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). *DPC4/SMAD4* está inactivado en el 55% de los carcinomas pancreáticos infiltrantes, siendo una delección homocigota en el 35% y mutaciones intragénicas en el 20% restante (Schutte M., Hruban R.H, y col., 1996). Estudios de inmunohistoquímica de un número considerable de carcinomas de páncreas, muestran que la expresión de *DPC4* en lesiones ductales de bajo grado está intacta mientras que en las lesiones de alto grado se produce la pérdida completa de *DPC4* en el 30% de los casos (Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A. y col., 2000). Los datos sugieren que, al igual que *p53*, la inactivación del gen *DPC4* parece ser un evento tardío en la progresión genética del cáncer de páncreas (Hruban R.H., Wilentz R.E., y Kern S.E., 2000).

BRCA2

El gen supresor de tumores *BRCA* se localiza en el cromosoma 13q12 y se encuentra inactivado en el 7-10% de los tumores pancreáticos. Estudios recientes demuestran la existencia de una inactivación bialélica en las lesiones ductales de alto grado, hecho que no sucede en las lesiones ductales de bajo grado. Dichas observaciones sugieren que la inactivación del gen *BRCA2* ocurre relativamente tarde en la progresión neoplásica en el páncreas (Goggins M., Hruban R.H. y Kern S.E., 2000).

Gen	Frecuencia (%)	Alteración
Oncogenes		
<i>K-ras</i>	>95	Mutación puntual, codón 12
<i>AKT2</i>	10-20	Amplificación génica
<i>HER2/neu</i>	90 (inicial) 20 (final)	Sobreexpresión Disminuye durante la progresión tumoral
Genes supresores		
<i>p16/INK4a</i>	95	Mutación puntual, delección homocigota, metilación del promotor
<i>p53</i>	50-75	Mutación puntual
<i>SMAD4/DPC4</i>	55	Delección homocigota, mutación puntual
<i>p19^{ARF}</i>	50 ^b	Delección homocigota
<i>BRCA2</i>	7-10	Mutación puntual, delección

Tabla1. Alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores en el adenocarcinoma pancreático humano.

^bEstimada en base a la frecuencia delección homocigota de *p16/INK4a*. (Tabla adaptada de Bardeesy N. y col., 2001).

3.2.2.- Otros factores alterados

Factores de crecimiento y sus receptores

HGF/SF

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/SF), conocido como *scatter factor*, también está implicado en la tumorigénesis pancreática ya que si bien es detectable a niveles bajos en el páncreas exocrino normal, está sobreexpresado en la mayoría de adenocarcinomas ductales humanos, principalmente en las células del estroma induciendo disociación celular y movilidad (Paciucci R., Vila M.R. y col., 1998). Lo mismo sucede con su receptor *c-met*, la expresión del cual está muy aumentada en las células tumorales del carcinoma pancreático (Kiehne k., Herzig K.H., y Folsch U.R., 1997; Paciucci R., Vila M.R. y col., 1998).

FGF

El *FGF* (factor de crecimiento fibroblástico) es una familia que está formada por 10 miembros (FGF1-10). FGF-1 (ácido) y FGF-2 (básico) son los más relacionados entre ellos y ambos participan en la reparación tisular, atracción quimiotáctica de los fibroblastos y promoción de la angiogénesis (Gospodarowicz D., Neufeld G. y Schweigerer L., 1986). Estas dos proteínas se han encontrado expresadas a niveles elevados en carcinomas pancreáticos humanos (en un 60% y 50% respectivamente). Además, se ha observado una correlación entre su expresión y estados avanzados del tumor (Yamanaka Y., Friess H. y col., 1993). En cuanto a los receptores de los FGF (FGFR-1, 2, 3 y 4) presentan niveles bajos de expresión en el páncreas exocrino normal pero se ha observado que los FGFR1, FGFR3 y FGFR4 muestran niveles incrementados en el 60% de los adenocarcinomas pancreáticos (Leung H.Y, Huges C.M. y col., 1994).

TGF- β

La superfamilia *TGF- β* , está formada por una serie de polipéptidos reguladores que incluyen tres isoformas del TGF- β así como activina, inhibina y BMP. Las tres isoformas funcionan como inhibidoras de la proliferación de muchos tipos celulares pero son estimuladoras del crecimiento de las células mesenquimales. Además, ejercen efectos inmunosupresores y favorecen la formación de ECM (Lawrence D.A., 1996). Las tres isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 se expresan tanto en el páncreas exocrino como endocrino normal. *TGF- β 1* se expresa principalmente en células acinares mientras que *TGF- β 2* y *TGF- β 3* lo hacen en los islotes de Langerhans, y las tres se expresan por inmunohistoquímica en células ductales. En el adenocarcinoma pancreático las tres isoformas presentan niveles aumentados en su expresión aunque sólo la elevada expresión de *TGF- β 2* se correlaciona con estadios avanzados del tumor (Gold L.I. y Korc M., 1994).

Factores angiogénicos

El factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*) es un potente mitógeno específico de células endoteliales y estimula la angiogénesis fisiológica y patológica. La familia de *VEGF* está formada por proteínas homodiméricas secretadas codificadas por un único gen que, por procesamiento alternativo, da lugar a cuatro isoformas diferentes. Éstas poseen efectos mitogénicos sobre las células endoteliales vasculares e inducen permeabilización vascular (Millauer B., Witzigmann-Voos S. y col., 1993). En el tejido pancreático normal, *VEGF* es expresado y secretado por las células de los islotes de Langerhans (Christofori G., Naik P. y Hanahan D., 1995). En cambio, en tejidos tumorales pancreáticos se ha observado un aumento del RNA mensajero de *VEGF* de 5.2 veces. Además, en el análisis inmunohistoquímico sobre tejidos de tumores pancreáticos se observó una fuerte reactividad al *VEGF* en las células tumorales en el 64% de los casos. La presencia de *VEGF* en estas células estaba asociado al aumento del número de vasos sanguíneos, el tamaño del tumor y la diseminación local, aunque no parecía que disminuyera la supervivencia de los pacientes (Itakura J., Ishiwata T. y col., 1997).

Proteasas asociadas a tumores

Las metaloproteasas de matriz, MMPs, constituyen una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc, que son capaces de degradar diversos componentes de la ECM y de la membrana basal. Sintetizadas y secretadas en forma de proenzimas inactivos, su actividad está regulada por los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). Existen 13 miembros que se clasifican en diferentes grupos según el sustrato que degradan (colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisina y MT-MMP) (Stetler-Stevenson W.G., Liotta, y Kleiner D.E.Jr., 1993). En estudios inmunohistoquímicos, se ha demostrado la sobreexpresión de MMP-2 (colagenasa IV), MMP-3 (estromelina) y TIMP-1 en el adenocarcinoma pancreático. Dichos estudios relacionan, además, el fenotipo agresivo del adenocarcinoma pancreático con la sobreexpresión de MMP-2 y la reducción de su inhibidor específico TIMP-2 (Bramhall S.R., Neoptolemos J., y col., 1997). Estudios más recientes demuestran la sobreexpresión de la matrilisina MMP-7 en el 98% de una serie de adenocarcinomas analizados (Crawford H.C., Scoggins C.R., y col., 2002), y de MMP-9 en 31/32 pacientes con adenocarcinoma pancreático que presentan invasión venosa (Nagakawa Y., Aoki T. y col., 2002).

Otro tipo de proteasas importantes en los procesos proteolíticos que ocurren durante la invasión de las células tumorales son el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Aunque se describirán con más detalle en el Apartado 4, es importante resaltar que tPA está sobreexpresado en adenocarcinomas de páncreas exocrinos humanos y en líneas de células tumorales pancreáticas mientras que la expresión de uPA está asociada a las áreas de pancreatitis. Ambas proteasas favorecen la invasión de células tumorales pancreáticas *in vitro* (Paciucci R., Tora M. y col., 1998).

3.3.- Modelo de progresión tumoral pancreática

A pesar de que no es posible determinar irrevocablemente el tipo celular a partir del cual se origina el adenocarcinoma ductal pancreático, las evidencias genéticas apuntan en la dirección de que la mayoría de tumores se originan a partir de células de los conductos pancreáticos. En los últimos diez años se han acumulado suficientes conocimientos moleculares que, sumados a las evidencias patológicas y clínicas observadas previamente, han ayudado a proponer un modelo progresión tumoral pancreática.

Los primeros datos que indicaron la presencia de lesiones precursoras del adenocarcinoma infiltrante de páncreas se dedujeron de estudios morfológicos (Sommers S.C, Murphy S.A. y Warren S., 1954). Posteriormente, se observaron a nivel histológico, distintas lesiones proliferativas en los ductos pancreáticos adyacentes a los adenocarcinomas infiltrantes de páncreas. Estas lesiones ductales se denominaron hiperplasias y se observó que eran más frecuentes en los páncreas con cáncer que en los normales (Cubilla A.L. y Fitzgerald P.J., 1976). Más tarde, se observó la existencia de una progresión de displasia leve a severa en estas lesiones ductales del páncreas (Klöppel G., Bommer G. y col., 1980). Aun así, todas estas observaciones eran estáticas y no aclaraban si tales lesiones ductales representaban la extensión intraductal del cáncer invasivo o se trataba verdaderamente de lesiones precursoras de dicho cáncer.

Fueron necesarios estudios genéticos para establecer el origen evolutivo de las lesiones de los ductos pancreáticos y el carcinoma invasivo y proponer una secuencia de eventos moleculares asociados al desarrollo de las neoplasias. Casi todas las alteraciones genéticas descritas en los adenocarcinomas pancreáticos se han encontrado en las lesiones ductales. Además, la prevalencia de estas alteraciones genéticas aumenta con el incremento del grado de atipia citológica y arquitectónica de las lesiones ductales no invasivas, conocidas como neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN), descritas anteriormente (Apartado 2.1).

Las PanINs han sido examinadas para la pérdida de heterocigosidad de varios *loci* y para la alteración de varios proto-oncogenes como *K-ras*, *HER-2/neu*, *p16*, *p53*, *DPC4* y *BRCA2*. De los estudios existentes, algunos muestran que las mutaciones activadoras en el oncogén *K-ras* y la sobreexpresión de *HER-2/neu* ocurren en lesiones tempranas PanIN-1 con bajo potencial de malignidad (Caldas C., Hahn S.A., y col., 1994; Dugan M.C., Dergham S.T. y col., 1997; Terhune P.G., Phifer D.M. y col., 1998). En estudios sobre la inactivación bialélica de *p16/INK4a*, en cambio, se observa que tal inactivación se produce en etapas más tardías de la progresión del ACDP, es decir, en lesiones ductales de grado medio, PanIN-2 (Moskaluk C.A., Hruban R.H. y Kern S.E., 1997; Hruban R.H., Wilentz R.E., y Kern S.E., 2000). Finalmente, los proto-oncogenes *p53*, *DPC4* y *BRCA2* aparecen alterados en lesiones ductales tardías con un grado elevado de atipia arquitectural, PanIN-3 o carcinoma *in situ* (Hruban R.H., Wilentz R.E. y Kern S.E., 2000; Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A. y col., 2000). Estos

estudios genéticos, junto con las observaciones histológicas, apoyan el modelo de progresión para la neoplasia de páncreas en el cual el aumento del grado histológico de los PanINs está asociado con la acumulación de alteraciones genéticas relacionadas con este tipo de cáncer (ver Figura 3). No obstante, la validez de dicho modelo de progresión está todavía en discusión (Hruban R.H., Wilentz R.E. y Kern S.E., 2000; Jaffee E.M., Hruban R.H. y col., 2002). Recientemente, se ha propuesto que durante el desarrollo y progresión del cáncer pancreático puede ocurrir una “catástrofe” que acelere la evolución del tumor permitiendo una rápida invasión local y metástasis. Hasta el momento, dicho comportamiento no puede adscribirse a un sólo acontecimiento molecular (Real F.X., 2003).

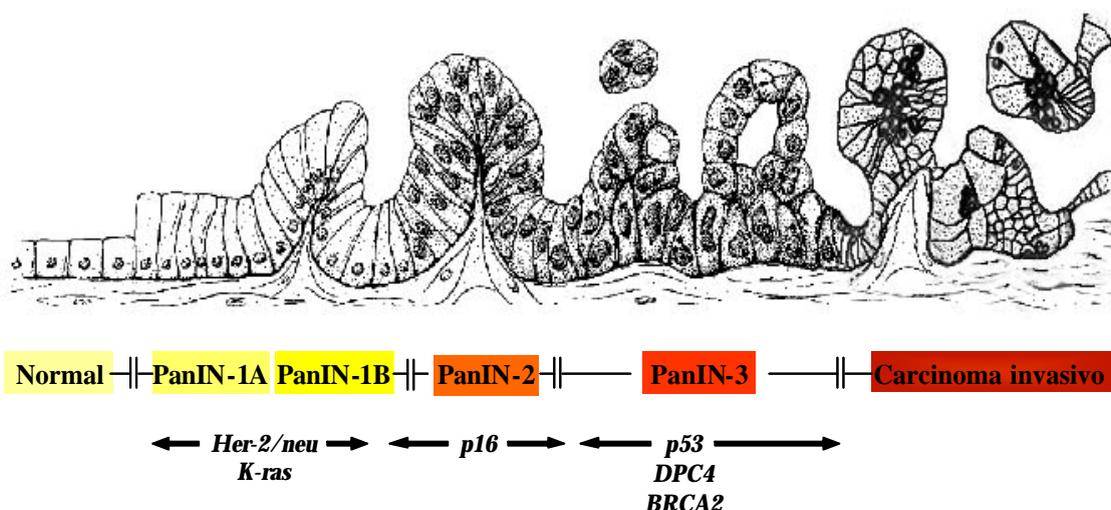


Figura 3. Modelo de progresión del adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP).

El epitelio ductal normal progresa al carcinoma invasivo (de izquierda a derecha) a través de una serie de precursores histológicamente definidos (PanINs). La sobreexpresión de *HER-2/neu* y mutaciones puntuales en el gen *K-ras* ocurren al inicio de la progresión (PanIN-1), la inactivación del gen *p16* en estadios intermedios (PanIN-2) y la inactivación de los genes *p53*, *DPC4* y *BRCA2* ocurre relativamente tarde, en lesiones PanIN-3 o carcinoma *in situ*. (Figura adaptada de Hruban R.H. y col. 2000 ; Real F.X, 2003).

3.4.- Metaplasia acinar-ductal en el desarrollo del cáncer de páncreas

Se ha observado que las células epiteliales pancreáticas presentan un elevado grado de plasticidad permitiendo la interconversión metaplásica entre células acinares, ductales y de los islotes de Langerhans y jugando un papel importante en situaciones patológicas (Bardeesy N., Sharpless N.E., y col., 2001; Real F.X., 1995). Existen estudios que demuestran que las células acinares del páncreas exocrino humano son capaces de transdiferenciarse *in vitro* para adquirir el fenotipo y las propiedades funcionales de las células ductales (Hall P.A. y Lemoine N.R., 1992; Vila M.R., Lloreta J. y Real F.X., 1994). Estas células transdiferenciadas muestran, además, un fenotipo parecido al de los complejos ductales que se encuentran en la pancreatitis crónica. De forma similar, los ratones que sobreexpresan *TGF α* bajo el promotor de la metalotioneína o de la elastasa (Jhappan C., Stable C. y col., 1990; Sandgren E.P., Luetke N.C. y col., 1990) muestran metaplasia acinar-ductal apareciendo complejos ductales similares a los observados en pacientes con pancreatitis crónica. De forma similar, los ratones transgénicos que sobreexpresan el oncogén *c-myc* bajo el control del promotor de la elastasa 1 (Ela1-myc) (Sandgren E.P., Quaife C.J. y col., 1991), desarrollan tumores acinares que progresan a tumores mixtos acinares/ductales; el componente ductal de estos tumores presenta una histología y fenotipo muy semejantes a los de los tumores ductales humanos. Más recientemente, se han generado ratones que sobreexpresan la anfiregulina (Ela1-AR) (Wagner M., Weber C.K. y col., 2002) o el gen *K-ras* mutado (Ela1-Kras^{D12G}) (Grippio P.J., Nowlin P.S. y col., 2003) bajo la acción del promotor elastasa 1, los cuales presentan hiperproliferación de estructuras ductales hiperplásicas y neoplasia pancreática preinvasiva ductal respectivamente. Tales observaciones sugieren que la des-diferenciación o metaplasia acinar-ductal puede favorecer la aparición del cáncer ductal pancreático a partir de células acinares (Bardeesy N., Sharpless N.E. y col., 2001).

3.5.- Modelos murinos de tumorigénesis pancreática.

A pesar de los avances a nivel molecular para entender la progresión tumoral pancreática, existen todavía vacíos en el conocimiento de la patogénesis como consecuencia del avanzado estado del tumor cuando éste es detectado. El estudio de pacientes con cáncer de páncreas es complicado, tanto por la relativa inaccesibilidad para la biopsia como por el riesgo de inducir una pancreatitis, que dificultan la adquisición de muestras biológicas para realizar estudios moleculares. Una estrategia para facilitar la identificación de los genes y/o moléculas cruciales en la progresión tumoral pancreática es la utilización de modelos animales. Estos modelos *in vivo*, en los que el tumor surge en el contexto histológico y molecular apropiado, proporcionan un recurso crítico para validar el papel causal de las lesiones genéticas candidatas, entender como estas lesiones pueden influir en la biología de la enfermedad y finalmente, en el

desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos. En los últimos años, se ha producido un importante avance en el desarrollo de modelos de ratones transgénicos que contienen oncogenes o genes supresores de tumores mutados que han permitido apreciar que las vías de tumorigenicidad en ratones y humanos están altamente conservadas (Bardeesy N., Sharpless N.E. y col., 2001).

3.5.1.- Inducción de carcinomas pancreáticos mediante agentes químicos.

Hámster sirio

Existe un cierto número de modelos animales de cáncer de páncreas generados por la administración de carcinógenos químicos. En el hámster sirio, el carcinógeno más utilizado ha sido la N-nitrosobis (2-oxopropilo) amina (BOP), la cual es metabolizada a una especie alquilante mutagénica que es capaz de iniciar la secuencia carcinogénica. Mediante una única inyección subcutánea se producen adenocarcinomas pancreáticos invasivos en el 80-100% de los animales. Una elevada proporción de los carcinomas desarrollados son de tipo ductal e invaden localmente la cavidad peritoneal y hacen metástasis en los ganglios linfáticos, hígado y pulmones. Dichas características son muy similares a las observadas en humanos, hecho que ha favorecido los numerosos estudios de este modelo (Pour, 1989).

Aunque menos estudiados el tratamiento en hámster con los carcinógenos N-nitrosol(2-hidroxiopropilo)(2-oxopropilo)amina (HPOP) o N-metil-N-nitrosourea (MNU) también inducen el desarrollo de carcinomas ductales pancreáticos, mientras que la inyección de 4-(metinitrosoamino)-1-(3-piridilo)-1-butanona (NNK) induce la formación de tumores ductales y acinares (revisado por Bardeesy N., Sharpless N.E. y col., 2001).

Rata

En rata, el modelo de tumorigénesis pancreática por carcinógenos mejor caracterizado consiste en el tratamiento con azaserina en ratas Lewis. Este anti-metabolito induce daño en el DNA e inhibe su síntesis en el páncreas aunque también induce tumores en riñón, mama y piel (Longnecker D.S., 1981). Inyectada intraperitonealmente, la azaserina es capaz de producir cambios proliferativos en las células acinares que comienzan con lesiones focales y nodulares que culminan con el desarrollo de carcinomas acinares. Aunque el fenotipo acinar es el mayoritario en estos carcinomas, eventualmente se desarrollan estructuras focales de tipo ductal (Longnecker D.S., 1987).

Un segundo modelo de tumorigénesis pancreática desarrollado en rata, consiste en la inoculación intrapancreática del hidrocarburo policíclico 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) que provoca la inducción de adenocarcinomas ductales invasivos. No obstante, la prevalencia del carcinoma pancreático en los animales tratados fue menor del 50% después de 10 meses (Rivera J.A., Graeme-Cook F. y col., 1997).

Otros modelos en rata consisten en el tratamiento con HPOP, que induce fundamentalmente tumores acinares, o bien con NNK que provoca la aparición de tumores acinares y ductales (revisado por Bardeesy N., Sharpless N.E. y col., 2001).

En términos globales, aunque algunos de los modelos de carcinogénesis química mencionados muestran semejanzas histológicas con el carcinoma ductal pancreático humano, existen dificultades para su uso como sistemas modelo: raramente aparecen tumores exclusivamente en el páncreas y no siempre presentan las alteraciones moleculares características de los tumores humanos. Dichos inconvenientes se han resuelto con la generación de modelos de ratones transgénicos que desarrollan cáncer de páncreas (revisado por Bardeesy N., Sharpless N.E. y col., 2001).

3.5.2.- Modelos de ratones transgénicos de cáncer de páncreas.

Los modelos de animales transgénicos de tumorigénesis constituyen una oportunidad para dirigir la expresión de oncogenes conocidos de forma selectiva a un único tejido o a un tipo celular determinado (Hanahan D., 1989). Así, con la introducción de un oncogén preactivado, los animales transgénicos pueden estar predispuestos a padecer cáncer.

La disponibilidad de promotores específicos de los diferentes tipos de células epiteliales del páncreas es crucial para la obtención modelos murinos sólidos. Con ellos se ha conseguido generar modelos de ratones transgénicos de tumorigénesis pancreática que presentan elevados niveles de expresión del transgén en los acinos, utilizando un promotor específico de células acinares, elastasa 1 de rata (Ornitz D.M., Hammer R.E. y col., 1987). La región de dicho promotor comprende los nucleótidos de -500/+8, que proporciona una expresión estricta en las células acinares aunque con niveles no muy elevados. Alternativamente, se puede utilizar el fragmento de -205/+8, que permite obtener niveles más elevados de expresión del transgén aunque ésta no es tan restrictiva de las células acinares, apareciendo expresión dispersa en las células β de los islotes de Langerhans (Kruse F., Rose S.D. y col., 1993).

Además, se han utilizado otros promotores específicos de células acinares como la tripsina (Davis B.P., Messing A. y col., 1992) y la amilasa (Ceci J.D., Kovatch R.M. y col., 1991), para dirigir la expresión de los antígenos T grande y pequeño de SV40 a las células acinares pancreáticas. No obstante, se ha observado que los ratones transgénicos con el promotor de tripsina presentan tumores endocrinos pancreáticos (Davis B.P., Messing A. y col., 1992) y los ratones portadores del promotor de amilasa, además de desarrollar carcinomas de células acinares pancreáticas, también presentan carcinomas de estómago (Ceci J.D., Kovatch R.M. y col., 1991). El desarrollo de tumores en otros tejidos que no sean el páncreas exocrino dificulta el estudio de la tumorigénesis pancreática, por ello se han generado más modelos murinos utilizando el promotor de la elastasa 1. Alternativamente, se ha utilizado el promotor de PDX1, el cual se expresa en las células precursoras epiteliales pancreáticas tanto del componente exocrino como endocrino (Jonsson J., Carlsson L. y col., 1994; Offield M.F., Jetton T.L. y col., 1996).

La mayoría de carcinomas pancreáticos humanos tienen un fenotipo ductal y por ello es importante disponer de modelos animales que expresen el transgén específicamente en las células ductales. Sin embargo, no se conocen genes cuya expresión esté absolutamente restringida a los conductos pancreáticos. Hasta el momento, se ha generado el ratón transgénico CK19-lacZ, en el cual el transgén presenta una expresión específica en células ductales pancreáticas y no en células acinares (Brembeck F.H., Moffett J., y col., 2001) si bien también es un promotor activo en otros epitelios simples. Por ello, el promotor de CK19 es un buen candidato para la generación de nuevos modelos de ratones transgénicos que reproduzcan el fenotipo del adenocarcinoma ductal pancreático humano. Recientemente, se ha clonado el cDNA de la citoqueratina 7 (CK7) murina, expresada de forma restringida en glándulas y células ductales de tejidos epiteliales como los ductos pancreáticos, el ducto biliar hepático, el ducto colector renal y el epitelio gástrico y de los alvéolos pulmonares (Smith F.J., Porter R.M. y col., 2002). El desarrollo de ratones transgénicos utilizando el promotor de CK7, trabajo en curso en nuestro laboratorio, debería ofrecer una oportunidad para la generación de ratones transgénicos que sobreexpresen un transgén de forma más selectiva en las células ductales pancreáticas ya que la CK7 presenta un patrón de expresión tisular más restringido que la CK19.

La introducción de genes bajo la acción de promotores específicos de células acinares provoca en algunos ratones transgénicos el desarrollo de tumores acinares. Éstos no suponen un buen modelo de tumorigénesis pancreática ya que difieren del fenotipo ductal característico del adenocarcinoma pancreático humano. No obstante, algunos modelos murinos presentan tumores acinares que evolucionan a lesiones ductales similares a las observadas en humanos, siendo por ello buenos modelos de estudio como símil de la enfermedad humana. El hecho de que genes que se sobreexpresan en células acinares provoquen tumores con morfología ductal apoya la idea de que las células pancreáticas presentan cierta plasticidad (ver Apartado 3.4).

Los modelos de ratones transgénicos de la tumorigénesis pancreática se detallan a continuación y están resumidos en la Tabla 2.

Ela1-TAg

Los ratones transgénicos Ela1-TAg se caracterizan por sobreexpresar el antígeno T completo del virus SV40 bajo el control del promotor específico de células acinares, elastasa 1, Ela1-TAg (Ornitz D.M. Hammer R.E. y col., 1987; Bell R.H.Jr., Memoli V.A. y Longnecker D.S., 1990). Dichos animales se caracterizan por desarrollar adenocarcinomas de células acinares pancreáticas tras un período de cambios preneoplásicos bien definidos. El proceso de tumorigénesis pancreática comienza con una hiperplasia de células acinares a nivel embrionario que evoluciona a la formación de múltiples nódulos tumorales entre las 516 semanas edad. La progresión tumoral continúa hasta que aparecen carcinomas de células acinares a la edad de 3-6 meses (Ornitz D.M., Hammer R.E. y col., 1987; Glasner S., Memoli

V.A. y Longnecker D.S., 1992). En los estudios que se incluyen la presente tesis, hemos utilizado una variante de este modelo de ratón transgénico que se caracteriza por sobreexpresar el fragmento 1-127 del antígeno T de SV40 bajo el mismo promotor de células acinares, elastasa 1 (Tevethia M.J., Bonneau R.H. y col., 1997). Dichos animales presentan displasia de células acinares en el momento de nacer que evoluciona a microadenomas a la edad de 10 semanas y adenocarcinomas de células acinares en el 90% de los animales con 31 semanas de edad. La media de edad de muerte se encuentra en el mismo rango que el que presentan los ratones que sobreexpresan el antígeno T completo. Además, en alguna ocasión, ratones con tumores avanzados presentan metástasis en el hígado. Por otro lado, se ha observado que, al contrario de lo que sucede en humanos, el gen *K-ras* no presenta mutaciones en el codón 12 (Kuhlmann E.T., Terhune P.G., y Longnecker D.S., 2003).

Ela1-myc

Descritos por Sandgren E.P. y colaboradores, los ratones transgénicos *Ela1-myc* sobreexpresan el oncogén *c-myc* bajo el promotor específico de células acinares, elastasa 1 (Sandgren E.P., Quaife C.J. y col., 1991). Dichos animales se caracterizan por desarrollar hiperplasia acinar media-severa y displasia combinada con apoptosis y fibrosis que evoluciona, entre los 2-6 meses, a adenocarcinoma de células acinares muy similar al que se observa en los ratones *Ela1-TAg*. No obstante, alrededor de un 50% de los ratones *Ela1-myc* presentan, en estados avanzados de la progresión tumoral, ductos neoplásicos que surgen de los tumores acinares y que progresan a tumores mixtos acinares/ductales. Este modelo no es adecuado para el estudio de la capacidad metastásica, ya que sólo un 10% de los ratones desarrollan metástasis hepáticas. Se ha descrito que los tumores acinares pancreáticos que desarrollan los ratones *Ela1-myc*, no presentan mutaciones en los codones 12, 13 ni 61 del gen *c-K-ras* a pesar de exhibir un fenotipo ductal neoplásico similar al que aparece en humanos (Schaeffer B.K., Terhune P.G. y Longnecker D.S., 1994). Este modelo murino, también incluido en el trabajo experimental de la presente tesis, representa uno de los modelos animales de tumorigénesis pancreática con gran similitud histológica al ACDP humano.

Ela1-TGF α / MT-TGF α

La elevada expresión del TGF α está asociada a procesos patológicos de transformación neoplásica como se ha observado en numerosos trabajos en tejidos neoplásicos, en líneas celulares derivadas de tumores humanos espontáneos o en tumores inducidos en animales (Derynck R., Goeddel D.V. y col., 1987; Liu S.C., Sanfilippo B., I. y col., 1987; Luetkeke N.C., Michalopoulos, y col., 1988). Debido a su posible contribución a la transformación neoplásica, se generaron ratones que sobreexpresan TGF α bajo el promotor específico de células acinares, elastasa 1, *Ela1-TGF α* (Jhappan C., Stable C. y col., 1990), o con el promotor de metalotioneina-I (MT), *MT-TGF α* (Sandgren E.P., Luetkeke N.C. y col.,

1990). Estos estudios confirman la actividad del TGF α como un potente mitógeno *in vivo*, particularmente en las células epiteliales, y revelan que los efectos de desregulación de la producción de TGF α son específicos de tejido (Jhappan C., Stable C. y col., 1990). En ambos casos, los animales muestran una extensa fibrosis en el páncreas que va acompañada de complejos tubulares compuestos por células acinares que muestran un fenotipo intermedio entre células acinares y ductales. A medida que avanza la edad de los animales, se pierde parénquima acinar y aumenta el número de estructuras de tipo ductal. Tras un periodo de latencia, algunos animales de más de un año de edad, desarrollan neoplasias ductales, que aparentemente surgen de los complejos tubulares. Tales tumores son positivos para marcadores ductales y sobreexpresan el receptor de EGF y el gen supresor de tumores *p53*, aunque no presentan mutaciones en el gen *K-ras* (Wagner M., Luehrs H., y col., 1998).

Cuando los ratones *Ela1-TGF α* se cruzan con ratones *knock out* para el gen *p53* (*p53*^{-/-}), la formación de tumores se acelera dramáticamente y se adquieren cambios genéticos similares a los que presentan muchos adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos, como es la inactivación bialélica de *Ink4a* y la pérdida de heterocigosidad del locus *Smad4/DEP4* (Wagner M., Greten F.R. y col., 2001).

Ela1-TAg x MT-TGF α / Ela1-myc x MT-TGF α

Sandgren E.P. y colaboradores generaron ratones híbridos que sobreexpresan *TGF α* y el oncogén viral *TAg* (*Ela1-TAg x MT-TGF α*) o el oncogén celular *c-myc* (*Ela1-myc x MT-TGF α*) (Sandgren E.P., Luetke N.C. y col., 1993).

Los ratones que co-expresan *TAg* y *TGF α* presentan un aumento del tamaño del páncreas respecto los ratones *Ela1-TAg*. Además, se produce una aceleración en el desarrollo del tumor, que se refleja en una marcada disminución de la supervivencia de los ratones *Ela1-TAg x MT-TGF α* respecto los *Ela1-TAg* (10-14 vs 20-40 semanas). Respecto a la morfología del tumor, no existen diferencias en el fenotipo tumoral aunque los ratones *Ela1-TAg x MT-TGF α* presentan un aumento del número de lesiones preneoplásicas que además, aparecen en edades más tempranas que en los ratones *Ela1-TAg*.

Por otro lado, los ratones que co-expresan *TGF α* con el transgén *c-myc*, presentan una tumorigénesis acelerada, hecho que se refleja en la disminución de la supervivencia (10-20 *Ela1-myc x MT-TGF α* vs 15-31 semanas *Ela1-myc*). La inyección de células tumorales de ratones *Ela1-myc x MT-TGF α* en ratones singénicos, demuestra que la expresión de *TGF α* reduce el periodo de latencia del tumor así como el tiempo necesario para que los tumores alcancen un determinado tamaño. Fenotípicamente, los tumores *Ela1-myc x MT-TGF α* están compuestos por células más pequeñas y menos diferenciadas que las que aparecen en los tumores *Ela1-myc*. Además, no se observan las estructuras ductales características de los adenocarcinomas mixtos acinares-ductales de los ratones *Ela1-myc* (Sandgren E.P., Quaife

C.J. y col., 1991), como posible reflejo de la reducción en la supervivencia de los ratones *Ela1-myc* x *MT-TGF α* .

APC+/- x p53 -/-

La pérdida de función del gen supresor de tumores *p53* está altamente asociada a enfermedades malignas humanas (Hollstein M., Sidransky D. y col., 1991). La mayoría de ratones deficientes homocigotos de *p53* (*p53*^{-/-}) sobreviven tras el nacimiento pero mueren precozmente como consecuencia de tumores de células linfoides (Harvey M., McArthur M.J. y col., 1993; Jacks T., Remington L. y col., 1994). Por otro lado, la pérdida de función en el gen de *poliposis coli adenomatosa* (*APC*) está asociada al desarrollo de neoplasia tanto en ratones como en humanos (Moser A.R., Pitot H.C. y Dove W.F., 1990; Powell S.M., Zilz N. y col., Kinzler K.W., 1992). En ratones, la cepa con la mutación en la línea germinal equivalente, ratones *Min* (*APC*^{+/-}), desarrollan adenomas en el intestino delgado y grueso, y sólo un número pequeño de estas lesiones evolucionan eventualmente a adenocarcinomas invasivos (Moser A.R., Pitot H.C. y Dove W.F., 1990).

Los animales híbridos generados tras cruzar ratones *Min* con ratones deficientes en los dos alelos de *p53* (*APC*^{+/-} x *p53*^{-/-}), se caracterizan por desarrollar sarcomas y linfomas tímicos y extra-tímicos con una incidencia comparable a la que se da en los ratones *APC*^{+/+} x *p53*^{-/-} (Clarke A.R., Cummings M.C., y Harrison D.J., 1995). A pesar de la asociación descrita entre los genes *p53* y *APC* en el desarrollo y progresión del cáncer colorectal (Carder P., Wyllie A.H. y col., 1993; Miyaki M., Tanaka K. y col., 1995), no existen diferencias en el desarrollo de tumores en intestino en estos ratones. Por el contrario, la deficiencia completa de *p53* y heterocigosidad de *APC* (*APC*^{+/-} x *p53*^{-/-}) se caracteriza por un aumento de la incidencia de anomalías histológicas en el páncreas. Inicialmente, se producen lesiones acinares con transformación quística y una leve displasia que evolucionan a adenomas de células acinares asociados a reacción desmoplásica del estroma y atipia celular que, en un 22% de los animales, evoluciona a carcinomas de células acinares. Además, el 44% de los casos presentan evidencias macroscópicas de necrosis grasa dentro del peritoneo asociada a necrosis pancreática.

PDX1/Pax6

La proteína *Pax6* se expresa en el sistema nervioso central, ojos, nariz y en los islotes pancreáticos (Walter C. y col., 1992; Turque N. y col., 1994). En el páncreas de ratón, la expresión de *Pax6* se detecta en los cuatro tipos celulares que componen el páncreas endocrino pero no en las células exocrinas (Sander M. y col., 1997). Yamaoka T. y colaboradores, generaron un ratón transgénico que sobreexpresa *Pax6* bajo la acción del promotor *PDX1* (*PDX1/Pax6*), el cual dirige la expresión del transgén al epitelio pancreático progenitor que se diferencia en los tejidos endocrinos y exocrinos (Yamaoka T., Yano M. y col., 2000). Estos animales desarrollan anomalías que se extienden a todo el páncreas, tanto en el

componente exocrino como endocrino. En el páncreas endocrino, se produce una disminución del área de los islotes así como del número de células β , contenido de insulina en el páncreas y la secreción de insulina inducida por glucosa, que resultan en diabetes. En el páncreas exocrino, la sobreexpresión de Pax6 provoca hipoplasia. Además, se produce una hiperplasia de ductos pancreáticos que progresan frecuentemente, a adenomas quísticos caracterizados por la ausencia de neogénesis en los islotes y ocasionalmente, la desorganización de los islotes adyacentes al adenoma.

Ela1-CCK2

La gastrina es un factor de crecimiento para el cual existe un receptor conocido como CCK2 (colecistoquinina/gastrina) de la familia de 7 dominios transmembrana y cuyas señales se transmiten a las células por medio de la movilización de Ca^{2+} , estimulación de la quinasa PI3, activación de las vías de proteínas quinasas activadoras de mitógenos y la inducción de la repuesta temprana de la expresión del gen *c-fos* (Taniguchi T., Matsui T. y col., 1994; Todisco A., 2000). En el ratón, el receptor CCK1 se expresa en el páncreas exocrino, en lugar del CCK2 que se expresa en humanos. Con el fin de obtener un modelo cercano a la fisiología humana, se ha generado un ratón transgénico que sobreexpresa el receptor de CCK2 humano bajo el promotor específico de células acinares, elastasa 1, Ela1-CCK2 (Saillan-Barreau C., Clerc P. y col., 1998). En dicho modelo murino se observa una estimulación del crecimiento pancreático, hipertrofia de células acinares y, en una pequeña proporción de los casos, la progresión a carcinoma pancreático. La histopatología de los tumores es variable pero todos ellos se caracterizan por presentar des-diferenciación de los acinos a estructuras ductulares (Clerc P., Leung-Theung-Long S. y col., 2002), motivo por el cual se incluyeron en algunos de los estudios de esta tesis.

Ela1-Anfiregulina

La Anfiregulina (AR), al igual que EGF, $TGF\alpha$ y la betacelulina, constituye uno de los 30 ligandos conocidos para la familia de receptores *erbB*, que incluyen EGFR, *erbB2*, *erbB3* y *erbB4* (Barnard J.A., Beauchamp R.D. y col., 1995). AR posee un potente efecto mitogénico sobre células de cáncer de páncreas humanas (Ebert M., Yokoyama M. y col., 1994). Además, de forma similar al EGF, AR controla de manera autocrina la proliferación *in vitro* de células malignas de colon, mama, cérvix, próstata y páncreas (Barnard J.A., Graves-Deal R. y col., 1994; Johnson G.R., Saeki T. y col., 1992), y se ha observado sobreexpresada en las células ductales neoplásicas de tumores pancreáticos (Ebert M., Yokoyama M. y col., 1994). Los ratones transgénicos que sobreexpresan AR bajo el control del promotor de la elastasa 1, presentan acumulación de estructuras ductales rodeadas de tejido acinar y, en animales mayores de un año de edad, aparecen de forma progresiva ramificaciones y crecimiento papilar en las estructuras ductales. Las células ductales presentan displasia y cambios tales como polimorfismo nuclear, aumento de la relación núcleo/citoplasma e hiperplasia. Estos ratones

presentan también, un aumento de la actividad de Ras, Erk1/2, ciclina E/CDK2 y progresión de la fase G1 a S en las células ductales pancreáticas sugiriendo que AR induce la respuesta mitogénica selectivamente en las células de ductos pequeños a través de la activación de Ras, CDK2 y CDK4 respectivamente (Wagner M., Weber C.K., y col., 2002).

Ela1-Kras^{D12G}

Como se ha comentado en el Apartado **2.2.1** las mutaciones activantes en el oncogén *K-ras* constituyen la alteración genética más frecuente asociada al cáncer de páncreas humano, siendo identificada en más del 90% de los adenocarcinomas ductales pancreáticos (Almoguera C., Shibata D. y col., 1988; Hilgers W and Kern S.E., 1999). En el ACDP humano la mutación identificada más frecuentemente es la sustitución del residuo glicina por una valina o aspartato en el codón 12 (*Kras^{V12G}* o *Kras^{D12G}*). Recientemente, se ha generado un ratón transgénico que sobreexpresa el transgén *K-ras* mutado en el codón 12 por sustitución con aspartato, bajo la acción del promotor específico de células acinares pancreáticas elastasa 1, *Ela-Kras^{G12D}* (Grippio P.J., Nowlin P.S. y col., 2003). La mayoría de los ratones fundadores presentaban hiperplasia y displasia de las células acinares pancreáticas justo después de nacer. Los animales adultos desarrollan lesiones pancreáticas que incluyen hiperplasia acinar multifocal, acompañada frecuentemente de displasia focal, fibrosis e infiltración linfocítica y lesiones preinvasivas neoplásicas pancreáticas con fenotipo ductal. En animales de más edad aparece atrofia del páncreas exocrino, hecho que reduce la supervivencia de los ratones, y también puede aparecer metaplasia acinar-ductal. Dicho modelo es interesante ya que reproduce el fenotipo del adenocarcinoma pancreático humano combinado con la presencia de la alteración genética más común asociada al cáncer de páncreas humano.

Transgén	Fenotipo pancreático	Referencia
<i>Ela1-TAg</i>	Tumores acinares más tumores en islotes	Bell RH y col. 1990; Glasner S y col. 1992
<i>Ela1-TAg x MT-TGFa</i>	Tumores de células acinares	Sandgren EP y col. 1993
<i>Ela1-myc</i>	Tumores acinares, carcinomas mixtos acinar/ductal	Sandgren EP y col. 1991
<i>Ela1-myc x MT-TGFa</i>	Tumores de células acinares	Sandgren EP y col. 1993
<i>Ela1-TGFa</i>	Metaplasia pseudoductular	Sandgren EP y col. 1990
<i>MT-TGFa</i>	Metaplasia pseudoductular	Jhappan C y col. 1990; Sandgren EP y col. 1990
<i>Ela1-TGFa x p53^{-/-}</i>	Carcinoma ductal pancreático	Wagner M. y col. 2001
<i>APC^{+/-} x p53^{-/-}</i>	Tumores de células acinares	Clarke AR y col. 1995
<i>PDX1-Pax6</i>	Adenoma cístico	Yamaoka T y col. 2000
<i>Ela1-CCK2</i>	Hipertrofia acinar, tumores mixtos.	Saillan-Barreau C y col. 1998
<i>Ela1-Anfiregulina</i>	Hiperproliferación de estructuras ductales	Wagner M. y col. 2002
<i>Ela1-Kras^{D12G}</i>	Neoplasia pancreática preinvasiva ductal	Grippio PJ y col. 2003

Tabla 2. Modelos de ratones transgénicos de neoplasia pancreática.

Ela1: promotor de la elastasa 1; MT: promotor de metalotioneina-I; TAg: Antígeno T del virus SV40. (Adaptada con modificaciones de Bardeesy N. y col., 2001).

4.- SISTEMA DEL PLASMINÓGENO

Existe un elevado número de procesos biológicos que dependen de las interacciones fuertemente reguladas entre las células y la ECM. Dichas interacciones están mediadas por (1) proteínas integrales de membrana, incluyendo las integrinas, que proporcionan la unión entre la ECM y el citoesqueleto y (2) proteasas extracelulares y sus inhibidores, que median la degradación focal de los componentes de la ECM, algunos de los cuales son muy resistentes a gran variedad de proteasas. La mayoría de los enzimas proteolíticos extracelulares pertenece a una de dos familias: las serina proteasas, en particular el sistema de activación del plasminógeno, y las MMPs (Mignatti P. y Rifkin D.B., 1996; Andreasen P.A., Egelund R. y Petersen H.H., 2000).

El sistema del plasminógeno se caracteriza porque el zimógeno inactivo plasminógeno es proteolizado, mediante los activadores específicos de plasminógeno (PAs), para dar lugar a la forma activa plasmina. Ésta es capaz de degradar los depósitos de fibrina tanto intravascular como extravascular así como proteínas de la membrana basal y de la ECM. Adicionalmente al papel establecido en la trombólisis intravascular, el sistema del plasminógeno se ha asociado a procesos que requieren la remodelación tisular y/o la migración celular tales como la invasión del trofoblasto (Sappino A.P., Huarte J., y col., 1989), el desarrollo embrionario (Strickland S. y Reich E., 1976; Valinsky J.E. y Reich E., 1981; Friedman C.G. y Seeds N.W., 1994), la ovulación (Sappino A.P., Huarte J. y col., 1989), la angiogénesis (Pepper M.S., Vassalli J.D. y col., 1987) y la invasión de células tumorales (Ossowski, 1988; Ossowski, Clunie, y col., 1991; Kook, Adamski, y col., 1994).

La diversidad de este sistema se debe a la existencia de dos tipos de activadores que, aunque comparten la habilidad de activar el plasminógeno, presentan características estructurales y funcionales distintas (Blasi F., Vassalli J.D. y Dano K., 1987). Por un lado, el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) depende su unión a un receptor de membrana (uPAR) y no requiere fibrina mientras que el activador tisular del plasminógeno (tPA) actúa como el principal enzima de activación intravascular dependiente de fibrina (Chapman H.A., 1997). El sistema comprende dos inhibidores principales de los activadores del plasminógeno (PAs), que son los inhibidores de los activadores del plasminógeno-1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) los cuales en condiciones normales controlan, mediante interacción con los PAs, la activación del plasminógeno (Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P., y col., 1999). La Figura 4 representa un esquema de dicha vía fibrinolítica con los diversos componentes del sistema de activación del plasminógeno.

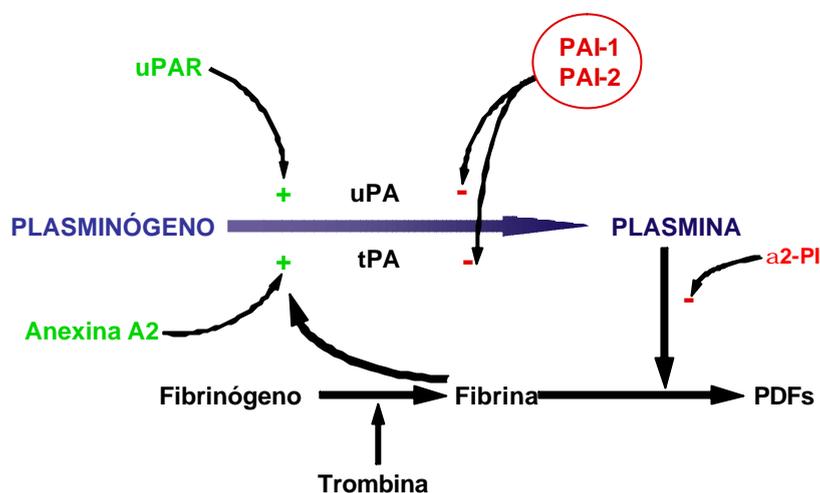


Figura 4. Vía fibrinolítica.

El plasminógeno se halla en el plasma en concentración micromolar y es activado a plasmina mediante uPA o tPA. La fibrina, que se forma por la polimerización del fibrinógeno mediante la acción de la trombina, es degradada mediante plasmina para dar los productos de degradación de fibrina (PDFs). La regulación inhibitoria se produce mediante los inhibidores de los activadores del plasminógeno 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) para el uPA y tPA, mientras que la plasmina circulante es inhibida por el inhibidor de plasmina alfa2 (α 2-PI). Adicionalmente, la fibrina es un fuerte estimulador de la actividad del tPA. Se piensa que los receptores de superficie uPAR y anexina A2 aumentan la eficiencia catalítica de la generación de plasmina. (Esquema adaptado de Hajjar K.A. y Krishnan S., 1999).

4.1.- Características del sistema del plasminógeno

4.1.1- Plasminógeno y plasmina

El zimógeno plasminógeno (Plg) es una proteína ubicua sintetizada principalmente en el hígado (Raum D., Marcus D. y col., 1980). Se caracteriza por ser una proteína de 90 kDa con dos cadenas peptídicas unidas entre ellas por dos puentes disulfuro. El extremo C-terminal de la cadena B contiene el dominio típico serina proteasa que es responsable de su actividad catalítica. La conversión de plasminógeno inactivo a plasmina activa comprende el corte proteolítico de un puente peptídico sencillo, y puede estar catalizado tanto por uPA como por tPA (Andreasen P.A., Egelund R. y Petersen H.H., 2000). La molécula del plasminógeno presenta, en la cadena A, un dominio de unión a lisinas que media su interacción con proteínas que presentan lisinas C-terminales y que explica la baja especificidad de unión del Plg (Redlitz A. y Plow E.F., 1995). Así, además de unirse a uPA y tPA, plasminógeno puede interactuar con diferentes proteínas de ECM y de superficie celular como laminina, fibronectina, trombospondina, tetranectina, enolasa, actina, citoqueratina 8 (Andreasen P.A., Kjoller L., y col., 1997) y fibrina (Lucas M.A., Fretto L.J. y col., 2003).

La plasmina asociada a la superficie celular degrada eficientemente la fibrina y su papel en la fibrinólisis está muy bien establecido (Collen y Lijnen H.R., 1995). No obstante, dicha

proteasa presenta un amplio espectro de sustratos y se sabe que es capaz de degradar gran variedad de moléculas que forman parte de la ECM y de la membrana basal, tales como fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicanos, y colágeno (Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P. y col., 1999). Finalmente, la plasmina es capaz de activar las formas latentes del FGF y del TGF- β , así como de MMPs (Taipale J., Koli K. y Keski-Oja J., 1992; Falcone D.J., McCaffrey T.A., y col., 1993). Al nivel extracelular, la plasmina también puede actuar sobre la cadena sencilla de pro-uPA y sobre uPA (Stephens R.W., Pollanen J. y col., 1989). Por otro lado, se ha demostrado que el fragmento no catalítico del Plg, angiotastina, es un potente inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly M.S., Holmgren L. y col., 1994).

4.1.2.- Activadores del plasminógeno: uPA y tPA

Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)

El gen de uPA humano codifica para una serina proteasa de 53 kDa producida como una proteína de cadena sencilla inactiva (sc-uPA) (Gunzler W.A., Steffens G.J. y col., 1982). Cuando es secretado, pro-uPA se convierte en la forma activa de doble cadena, tc-uPA, como consecuencia del procesamiento proteolítico, por parte de la plasmina, del puente peptídico K¹⁵⁸-I¹⁵⁹ (Dano K., Andreasen P.A. y col., 1985). La molécula de uPA, cuyas dos cadenas peptídicas están unidas por puentes disulfuro, presenta dos partes completamente independientes: la cadena catalítica carboxi-terminal y la cadena no catalítica amino-terminal, donde el dominio tipo EGF es responsable de la interacción específica con el receptor del uPA (uPAR) (Appella E., Robinson E.A. y col., 1987).

Aparte de la conversión de Plg a plasmina, uPA puede activar directamente HGF/SF y la proteína estimuladora de macrófagos (MSP) (Birchmeier C. and Gherardi E., 1998), entre otros. Además, uPA puede degradar la fibronectina así como su propio inhibidor PAI-1 de forma independiente de Plg (Keski-Oja J. and Vaheri A., 1982; Nielsen L.S, Andreasen P.A. y col., 1986).

Activador tisular del plasminógeno (tPA)

El tPA es una proteína de 70 kDa abundante en el plasma, el útero y en el sistema nervioso central (SNC). El tPA es sintetizado principalmente por las células endoteliales (Dano K., Andreasen P.A. y col., 1985); se secreta como un polipéptido de cadena sencilla, sc-tPA, que puede procesarse *in vivo* a la forma de doble cadena, tc-tPA, mediante proteólisis de un puente polipéptido sencillo (Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P. y col., 1999). Esta conversión puede ser llevada a cabo por la plasmina, calicreína tisular o el factor Xa de la coagulación que proteolizan el enlace Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶ dando lugar a una cadena pesada (36 kDa) que contiene el extremo N-terminal y una cadena ligera, con el C-terminal (Ichinose A., Kisiel W. y col., 1984). Ambas cadenas quedan unidas por un único puente disulfuro. La forma de doble cadena activa presenta en el extremo N-terminal el dominio de tipo fibronectina II, y un dominio de factor de crecimiento además de dos regiones *kringle* que son responsables de la actividad moduladora

del enzima. En el extremo Gterminal, por su parte, se localiza un dominio serina proteasa (Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P. y col., 1999). Aunque la forma tPA de una sola cadena es activa, la forma de doble cadena (tc-tPA) es 10-50 veces más activa. Por otro lado, la fibrina estimula potentemente la acción enzimática de ambas formas de tPA, de acuerdo con el papel del tPA como enzima fibrinolítico (Collen D., 1980; Andreasen P.A, Petersen L.C. y col., 1991; Rijken D.C., 1995).

Dada la elevada afinidad del tPA por la fibrina y de su activación por la unión a ésta, la función biológica principal de tPA está asociada con la fibrinólisis (Lijnen H.R. y Collen D., 1982). tPA puede unirse al extremo N-terminal de la fibronectina y al C-terminal de la laminina (Salonen E.M., Saksela O., y col., 1985; Moser A.R., Enghild J.J. y col., 1993). Estas proteínas también unen Plg por lo que actúan como superficie de reacción para su activación eficiente en la ECM. A pesar de que la fibronectina completa no aumenta la activación del Plg catalizada por tPA, los fragmentos derivados de la proteólisis de la fibronectina constituyen potentes activadores de tPA (Stack M.S. and Pizzo S.V., 1993). La unión de tPA a fibrina resulta en un aumento de la afinidad de tPA por el Plg favoreciendo la activación de éste eficientemente sobre la superficie de los coágulos sanguíneos y evitando la activación del Plg libre circulante. En condiciones normales, la concentración de tPA en plasma es de 5-7 ng/ml donde posee una vida media de 2,5-5 minutos, aunque el 95% está unido a su inhibidor específico PAI-1 (Rijken D.C., Juhan-Vague I. y col., 1983).

Además de la expresión de tPA en lugares donde existe un estrecho contacto con los coágulos de fibrina (ej.: células endoteliales vasculares) (Kooistra T., Schrauwen Y. y col., 1994), se ha observado que la expresión de tPA está inducida en situaciones fisiológicas causadas o propensas a la trombosis, tales como la isquemia (Schneiderman J., Adar R. y col., 1991), heridas (Grondahl-Hansen J., Lund L.R. y col., 1988) y ovulación (Deutinger J., Kirchheimer J.C. y col., 1988).

Control de la expresión de uPA y tPA

La expresión de uPA y tPA está regulada a nivel transcripcional por varios factores. La expresión de uPA se activa por promotores tumorales, oncogenes, factores de crecimiento, cAMP, retinoides, prostaglandinas y por la luz UV (revisado por Dano K., Andreasen P.A. y col., 1985). El promotor de tPA contiene múltiples secuencias reguladoras que le confieren estimulación por ésteres de forbol (Fisher P.B. y Grant S., 1985), hormonas esteroideas naturales, dexametasona, ácido retinoico y vitamina A (Bulens F., Ibanez-Tallon I., y col., 1995; Bulens F., Merchiers P. y col., 1997), cAMP (Rickles R.J., Darrow A.L. y col., 1988) e inhibición por heparina (Au Y.P., Dobrowolska G. y col., 1994). El estudio del promotor de tPA se ha centrado preferentemente en los sistemas endoteliales, donde se ha analizado la contribución de un *enhancer* de 2,4 Kb localizado 7,1 Kb *upstream* del inicio de transcripción, y que se

activa por glucocorticoides, progesterona, andrógenos y mineralcorticoides (Bulens F., Ibanez-Tallon I., y col., 1995; Bulens F., Merchiers P. y col., 1997).

4.1.3.- Inhibidores del sistema del plasminógeno

Dentro de este grupo se engloban tanto los inhibidores de la activación del Plg como aquellos que inhiben directamente la actividad de la plasmina. La mayoría de los inhibidores del sistema pertenecen a la superfamilia de las SERPINAS que se caracterizan por participar en la regulación de las cascadas de activación del complemento, la coagulación y la fibrinólisis. Estos inhibidores son proteínas que contienen un centro activo con un enlace peptídico, denominado P1-P1', que actúa como pseudo-sustrato para la proteasa. La interacción de la proteasa y el inhibidor da lugar a un complejo 1:1 estable en SDS (revisado por Lijnen H.R. y col., 2001).

Inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs)

Dentro de esta familia se han descrito tres miembros: PAI-1, PAI-2 y PAI-3.

El inhibidor del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) es una glicoproteína de 45-50 kDa que inhibe rápidamente la forma de doble cadena de tPA y uPA (Andreasen P.A., Kjoller L. y col., 1997). En células endoteliales en cultivo, PAI-1 se sintetiza como un inhibidor activo que rápidamente adopta una conformación latente, inactiva, que no interacciona con los PAs. La forma activa de PAI-1 se une con alta afinidad a los cofactores fisiológicos vitronectina y heparina estabilizando su conformación y ampliando la especificidad del sustrato hacia otra serina proteasa, la trombina (Ehrlich, Keijer J. y col., 1991). Los complejos vitronectina/PAI-1 en plasma y en la ECM se disocian rápidamente en presencia de uPA y tPA (Wiman B., Almquist A. y col., 1988; Salonen E.M., Vaheri A. y col., 1989). PAI-1 puede unirse, además, al complejo uPA/uPAR inhibiendo la degradación de la ECM iniciada por el uPA unido a la célula (Cubellis M.V., Andreasen P.A. y col., 1989). Además del papel de inactivación directa de los activadores del plasminógeno, PAI-1 se une a la ECM modulando la proteólisis pericelular llevada a cabo por uPA unido a su receptor uPAR (Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P. y col., 1999).

PAI-2 se secreta como una glicoproteína de 60-70 kDa aunque también existe una forma intracelular no glucosilada de 47 kDa (Genton C., Kruithof E.K. y col., 1987). Inhibe tanto uPA como tPA aunque es 10 y 100 veces menos potente que PAI-1, respectivamente (Kruithof E.K., Baker M.S. y col., 1995).

PAI-3, aislado originalmente de orina humana, también se denomina inhibidor de la proteína C formando complejos dependientes de heparina (Heeb M.J., Espana F. y col., 1987). PAI-3 es un inhibidor no específico que actúa sobre muchas serina proteasas como la proteína C activada, uPA y la proteasa del esperma acrosina, por lo que se ha implicado en fertilidad (Uhrin P., Dewerchin M. y col., 2000). Su capacidad de inhibición de uPA es 1000 veces menor

que la de PAI-1, por lo que su importancia fisiológica es mucho menor (Stump D.C., Thienpont M. y col., 1986).

Neuroserpina es un inhibidor tanto de sc-tPA como tc-tPA identificado en el SNC, que se secreta en los axones neuronales. Regula la actividad de tPA y participa activamente en procesos de plasticidad sináptica (Osterwalder T., Contartese J. y col., 1996; Krueger S.R., Ghisu C.P. y col., 1997). Hastings y colaboradores han descrito que la neuroserpina inhibe tPA pero no uPA o plasmina (Hastings G.A., Coleman T.A. y col., 1997), aunque otros autores han demostrado que sí puede inhibir plasmina (Osterwalder T., Cinelli P. y col., 1998).

Inhibidores de la plasmina

La α_2 -antiplasmina (α_2 -AP) es el inhibidor fisiológico principal de la plasmina garantizando una vida corta de la plasmina tanto en sangre como en tejidos (Collen D., 1980). La forma nativa de la proteína presenta dos lugares de interacción con el Plg, el centro activo del inhibidor y el extremo C-terminal que se une a los dominios *kringle* del Plg (Sasaki T., Morita T. y col., 1986). El mecanismo de inhibición consiste en la formación de un complejo estequiométrico 1:1 con el centro activo del enzima. La reacción, que es muy rápida, depende de la disponibilidad de lugares de unión a lisina libres en el Plg. Una vez que el Plg se une a la fibrina, la reacción con la α_2 -AP es 100 veces inferior (Wiman B. y Collen D., 1978).

Otros inhibidores de la plasmina actúan como una segunda línea de defensa en los casos en que la α_2 -AP se consume por motivos fisiológicos. La α_2 -macroglobulina (α_2 -M) es el único inhibidor que no pertenece a la familia de las SERPINAS y forma complejos covalentes con la plasmina y con otras serina proteasas (Van Leuven F., Cassiman J.J. y col., 1978). Otro inhibidor es la α_1 -antitripsina (α_1 -AT) que también inhibe a un amplio espectro de proteasas (Rijken D.C., Juhan-Vague I. y col., 1983).

4.1.4.- Receptores

Receptores del plasminógeno

Los receptores para Plg se caracterizan por su baja afinidad, alta densidad celular y una distribución ubicua. Dado que la interacción del Plg está mediada por el dominio de unión a lisinas, cualquier proteína presente en la superficie celular que tenga lisinas carboxi-terminales puede ser potencialmente un receptor para Plg. Todo ello hace que los receptores para Plg sean muy heterogéneos. Así, se ha identificado su presencia en todas las células de la sangre periférica con excepción de los eritrocitos (Miles L.A. y Plow E.F., 1987). Entre las células sanguíneas que son capaces de unir Plg se incluyen las plaquetas, neutrófilos, monocitos y linfocitos B y T. Además, se ha observado que las células endoteliales son ricas en sitios de unión para el Plg (Hajjar K.A., Harpel, y col., 1986) y que las neuronas y células de la microglía también se unen a él, estableciendo una relación entre la función cerebral y el sistema del plasminógeno (Nakajima K., Nagata K., y Hamanoue M. 1993; Nakajima K., Nagata K. y

Kohsaka S., 1994). Los receptores celulares mejor caracterizados a nivel funcional son la α -enolasa (Miles L.A., Dahlberg C.M. y Plescia J., 1991), la anexina A2 (Hajjar K.A., Jacovina A. y Chacko J., 1994) y la anfoterina/HMG1 (Parkkinen J. y Rauvala H., 1991). Estos receptores, además de unir Plg, también presentan sitios de unión para tPA lo que sirve para acelerar la conversión a plasmina, aumentando su actividad enzimática en la superficie de las células y protegiéndola a su vez de la inactivación por parte de los inhibidores (Ellis V., Behrendt N. y col., 1990).

Receptor del uPA

Existen muchas evidencias de que los efectos biológicos del uPA dependientes o independientes de la proteólisis, aumentan con la unión a su receptor de membrana, uPAR (Shapiro R.L., Duquette J.G. y col., 1996; Andreasen P.A., Kjoller L. y col., 1997; Sabapathy K.T., Pepper M.S. y col., 1997). El uPAR es una glicoproteína anclada en la membrana por un enlace GPI con un dominio de unión a uPA y dos dominios de unión a vitronectina que se ha hallado sobreexpresado frecuentemente en tumores. Además, el uPAR se puede unir a integrinas en sitios distinguibles de los sitios de unión de uPAR a vitronectina (Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P. y col., 1999). Dicho receptor focaliza la proteólisis del Plg en la superficie celular mediada por uPA, y está bien establecido que la tasa de activación del Plg y pro-uPA se acelera dramáticamente por la unión de uPA a uPAR (Ellis V. y Dano K., 1992). Además, se sabe que la actividad del uPA está regulada por los inhibidores PAIs, especialmente PAI-1 que reacciona con el complejo formado por la unión de uPA-uPAR y son endocitados, mediante la proteína relacionada con el receptor de LDL, LRP (Czekay, Kuemmel T.A. y col., 2001). Dicha proteína elimina el complejo uPAR unido a uPA-PAI-1 de la superficie celular permitiendo el reciclaje de los receptores no ocupados (Nykjaer A., Conese M. y col., 1997). Inicialmente, se propuso que el aumento de la actividad proteolítica resultante de la unión de uPA y uPAR era el mecanismo principal a través del cual ocurrían los efectos de la progresión tumoral (Blasi F., 1993). No obstante, cada vez existen más evidencias de que el uPAR tiene un papel importante en la señalización independiente de proteólisis y en la motilidad celular (Konakova M., Hucho F. y Schleuning W.D. 1998; Blasi F. y Carmeliet P., 2002).

Receptores del tPA

Los receptores del tPA se pueden dividir en dos grupos principales: (1) receptores implicados en la eliminación fisiológica del tPA o de los complejos formados con sus inhibidores y (2) los receptores que localizan el tPA en la superficie celular. Los receptores de eliminación están asociados a la maquinaria endocítica de la célula y en última instancia, permiten la degradación del tPA en los lisosomas. Por ello, estos receptores sirven de reguladores negativos de la fibrinólisis vascular. Por otro lado, los receptores que localizan tPA en la superficie celular promueven la activación del Plg y tienen consecuencias pro-fibrinolíticas (Redlitz A. y Plow E.F., 1995).

Receptores de eliminación fisiológica

Se ha descrito que los hepatocitos poseen un sistema para eliminar tPA por endocitosis mediada por receptor a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de PAI-1 (Hajjar K.A., 1995). Las células de hepatoma humano HepG2 (Morton P.A., Owensby D.A. y Sobel B.E., 1989) y los hepatocitos primarios expresan el receptor de superficie celular de lipoproteínas α 2-macroglobulina/LRP (α 2-MR/LRP) que se une al complejo tPA/PAI-1 y lo elimina de manera PAI-1 dependiente (Kuiper J., Otter M., y col., 1995). Por otro lado, cuando la concentración de tPA es extremadamente alta, en las células MH₁C₁ de hepatoma, el tPA libre se une de forma independiente de PAI-1 y de los complejos tPA/PAI-1 al receptor LRP. Además, en células endoteliales del hígado se ha demostrado un sistema de eliminación de tPA basado en el receptor de manosas, que reconoce con alta afinidad las cadenas de azúcares ricas en manosa unidas a la Asn¹¹⁷ del tPA (Otter M., Zocková P., y Kuiper J., 1992).

Receptores de superficie celular

Además de los receptores de *aclaramiento*, numerosas células presentan receptores para tPA en su superficie celular implicados en otras funciones. La mayoría de estos receptores unen también Plg, favoreciendo la formación de plasmina más eficientemente y de forma focalizada sobre la superficie celular. De esta forma contribuyen a la regulación de la fibrinólisis así como a la degradación de otras proteínas tanto de membrana como de la ECM. Además, no se descarta que la interacción de tPA con receptores de superficie celular pueda activar directamente señales intracelulares, como ya se ha descrito para uPAR. La naturaleza de dichos receptores varía en función de las células analizadas. Los monocitos presentan el receptor α -enolasa que une Plg y tPA a través de residuos lisina terminales (Felez J., Chanquia C.J. y Fabregas P., 1993). En neuronas y células de neuroblastoma, tPA y Plg interactúan, a través de sus sitios de unión a lisina, con anfoterina/HMG1, una proteína de 30 kDa que une heparina y que está involucrada en el crecimiento de neuritas (Merenmies J., Pihlaskari R. y col., 1991). tPA y anfoterina colocalizan en la membrana de los filopodios aumentando la activación del Plg mediada por tPA (Parkkinen J. y Rauvala H., 1991).

En las células endoteliales, se ha identificado la anexina A2 (AnxA2) como el principal receptor del tPA (Cesarman G.M., Guevara C.A. y Hajjar K.A., 1994; Hajjar K.A., Jacovina A. y Chacko J., 1994), siendo uno de los receptores mejor caracterizados por su relevante papel durante la fibrinólisis vascular. AnxA2 (36 kDa) pertenece a la familia altamente conservada de las anexinas, compuesta por 20 proteínas periféricas de membrana con capacidad de unirse a fosfolípidos. En general, las anexinas se caracterizan por poseer una región conservada G terminal denominada *core*, que presenta cuatro dominios altamente conservados de unión a Ca²⁺ y con capacidad de unirse a los fosfolípidos de la membrana celular, y una región N terminal variable denominada *tail* que confiere especificidad a cada miembro de la familia (Brownstein C., Falcone D.J. y col., 2001). AnxA2 o p36 puede encontrarse en forma libre o

asociada con p11, proteína de la familia de las S100. La asociación de dos moléculas p36 (cadena pesada) y dos moléculas de la subunidad reguladora p11 (cadena ligera) da lugar al heterotetrámero p36₂p11₂ (Allt) (ver Figura 5) (Kang H.M., Kassam G. y col., 1997). También se ha descrito una forma heterodimérica constituida por p36 y una fosfogliceratoquinasa (Waisman D.M., 1995). Estas diferentes formas difieren en su localización subcelular: el monómero p36 es principalmente citosólico, el heterodímero se localiza en núcleo y el heterotetrámero se ha descrito principalmente en membrana, aunque también puede encontrarse en citosol y al nivel extracelular (Gerke V. y Weber K., 1984; Nilius B., Gerke V., y col., 1996). De hecho, estudios *in vitro* muestran que el heterotetrámero es un activador del Plg mucho más potente que el monómero (Kassam G., Choi K.S. y col., 1998).

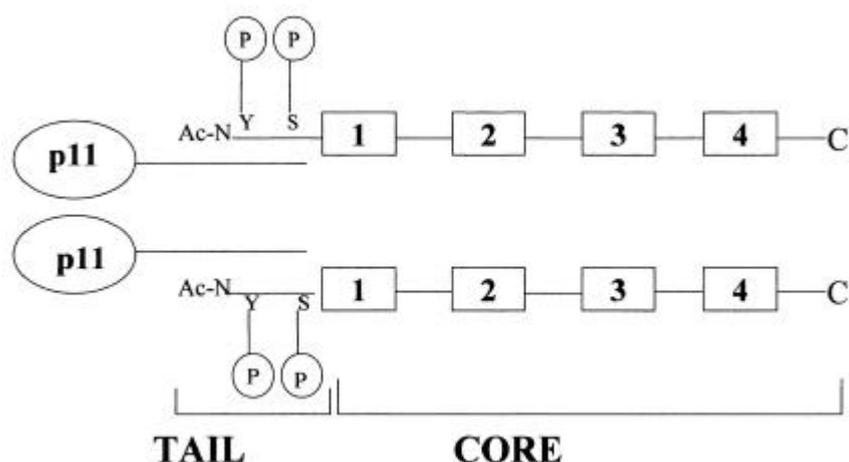


Figura 5.- Modelo de interacción de anexina A2 (p36) con p11 formando el tetrámero p36₂p11₂ (Allt).

Se indican los motivos endonexina de p36 que forman la región *core*, imprescindible para la unión a fosfolípidos de membrana. El extremo N-terminal designado como *tail* interacciona con p11. Se señalan algunos de los lugares de fosforilación (P) de p36 en el extremo N-terminal.

En células endoteliales, AnxA2 se expresa como proteína de membrana periférica y a pesar de no tener un péptido señal clásico, la proteína es translocada constitutivamente a la superficie celular tras 16 horas de su biosíntesis (Hajjar K.A., Guevara C.A. y col., 1996), donde actúa como co-receptor para tPA y plasminógeno. Plg se une a la Lys³⁰⁷ del extremo C-terminal de la AnxA2 y para que esto ocurra es necesario el corte del enlace Lys³⁰⁷-Arg³⁰⁸ por una serina proteasa no identificada (Hajjar K.A., Jacovina A. y Chacko J., 1994) (ver Figura 6). Por otro lado, tPA se une al extremo N-terminal de AnxA2 de manera independiente de la unión del Plg. El dominio de unión a tPA se ha descrito que contiene la secuencia hexapeptídica LCKLSL (residuos 7-12) y requiere específicamente de la Cys⁹ (Hajjar K.A., Mauri L., y col., 1998). Sin

embargo, resultados recientes indican que otras regiones de AnxA2 estarían implicadas en la unión de tPA (Roda O., Valero M.L., y col., 2003; MacLeod T.J., Kwon M. y col., 2003). Tal ensamblaje de tPA y Plg en el mismo receptor localiza la generación de plasmina en la pared de los vasos endoteliales (Hajjar K.A. y Nachman, 1988) y a su vez aumenta hasta 60 veces la actividad de la plasmina (Cesarman G.M., Guevara C.A. y Hajjar K.A., 1994; Hajjar K.A. y Krishnan S., 1999).

AnxA2 extracelular también se localiza en la superficie de otras células como macrófagos, monocitos, células neuronales y algunas células tumorales (Brownstein C., Falcone D.J. y col., 2001) y se ha propuesto que participa en varios procesos como son el tráfico intracelular, la migración celular y la adhesión célula-célula (Gerke V. y Moss S.E., 1997; Hajjar K.A. y Krishnan S., 1999; Hajjar K.A. y Acharya, 2000; Kim J. y Hajjar K.A., 2002) cuya relación con la generación de plasmina en la membrana se desconoce.

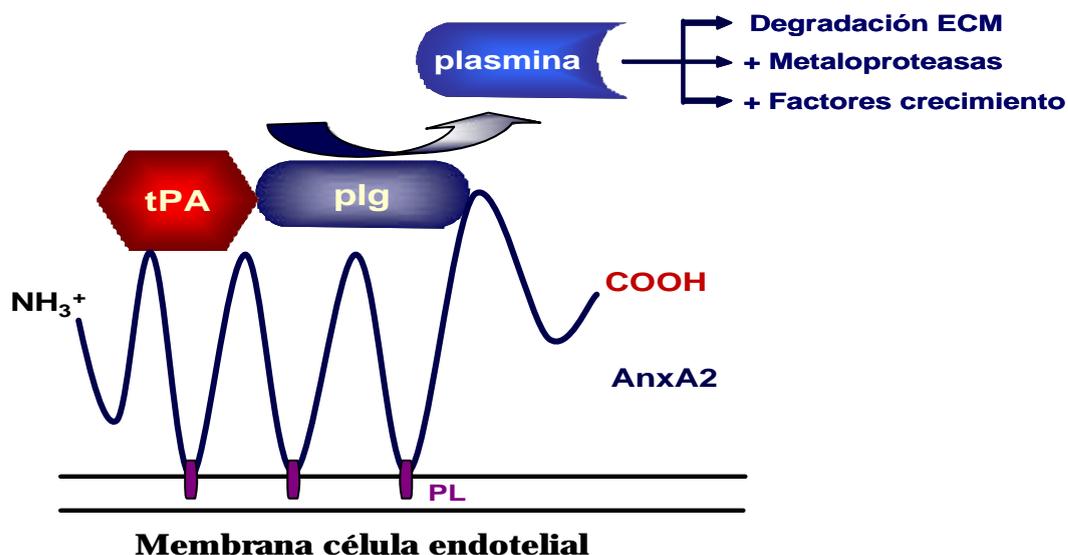


Figura 6.- Modelo de unión del tPA a su receptor y activación del plasminógeno.

La AnxA2 se encuentra asociada a la superficie de las células endoteliales a través de sitios de unión a fosfolípidos dependientes de Ca²⁺. tPA se une a su receptor por el dominio N-terminal. Tras la ruptura del puente Lys³⁰⁷-Arg³⁰⁸ de la AnxA2, plasminógeno se une al extremo C-terminal de la AnxA2. Dicha interacción permite la activación eficiente del Plg a plasmina. (Figura adaptada de Hajjar K.A. y col., 1994).

4.2.- El sistema de activación del plasminógeno en procesos fisiológicos: evidencia a partir de ratones *knock out* para tPA, uPA o plasminógeno.

Las proteasas activadoras del Plg y de la plasmina son esenciales en numerosos procesos biológicos relacionados con el remodelaje tisular y la migración celular como la ovulación, la embriogénesis, la invasión del trofoblasto, la involución de la glándula mamaria post-lactante, la hemostasia, la migración de macrófagos, la curación de heridas, crecimiento del cono axonal y la plasticidad sináptica. Al mismo tiempo, estas proteasas contribuyen al desarrollo de determinados procesos patológicos como la arteriosclerosis, procesos inflamatorios como la glomerulonefritis, daño cerebral inducido por neurotoxinas, angiogénesis tumoral y especialmente, el crecimiento tumoral, invasión y metástasis (Mignatti P. y Rifkin D.B., 1996; Carmeliet P. y Collen D., 1998; Strickland S., 2001)

Estas funciones han podido ser estudiadas en mayor detalle gracias a la generación de ratones genéticamente modificados deficientes en diferentes moléculas del sistema del plasminógeno. Los fenotipos resultantes de dicha inactivación genética se comentan a continuación y se resumen en la Tabla 3.

Deficiencia	Fenotipo
<i>Activador tisular del plasminógeno (tPA)</i>	Susceptibilidad a la trombosis aumentada Glomerulonefritis media Neurotoxicidad en el hipocampo reducida Potenciación a largo plazo anormal Retraso de la migración neuronal
<i>Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)</i>	Susceptibilidad a la trombosis aumentada Alteración en la formación de la neointima Glomerulonefritis Función de macrófagos deficiente Reducción de la invasión del trofoblasto Disminución de la activación de plaquetas Invasión tumoral reducida (ej: melanomas)
<i>tPA y uPA</i>	Trombosis espontánea severa Disminución de la formación de la neointima Reducción de la ovulación y fertilidad Caquexia y disminución de la supervivencia Glomerulonefritis severa Remodelación tisular anormal
<i>Plasminógeno</i>	Trombosis espontánea severa Reducción de la ovulación y fertilidad Caquexia y menor supervivencia Glomerulonefritis severa Neurotoxicidad reducida Cicatrización en la córnea reducida Deficiencia en la cicatrización de heridas Conjuntivitis espontánea Migración de queratinocitos y macrófagos reducida Arteriosclerosis acelerada Reducción de la mortalidad en el carcinoma de pulmón Lewis Reducción de metástasis en el cáncer de mama inducido (Pym-T)

Tabla 3. Fenotipos resultantes de la disrupción de los genes componentes del sistema de activación del plasminógeno en ratones. (Adaptada de Irigoyen JP y col., 2000).

4.2.1.- Reproducción y desarrollo embrionario.

Los ratones deficientes en uPA (uPA^{-/-}) o en tPA (tPA^{-/-}) presentan un desarrollo embrionario normal, son fértiles y su longevidad es comparable a los ratones *wild type* (Carmeliet P., Schoonjans L. y col., 1994). Los ratones deficientes en Plg (Plg^{-/-}) así como los ratones doblemente deficientes para tPA y uPA (tPA^{-/-}:uPA^{-/-}) presentan un desarrollo embrionario completo y llegan a la edad adulta en la que se reproducen. No obstante, muestran depósitos de fibrina intra- y extravasculares debido a la trombólisis y sufren retraso en el crecimiento, daño en los órganos vitales, disminución del peso corporal (caquexia) y reducción de la fertilidad y de la supervivencia (Bugge T.H., Flick M.J. y col., 1995; Ploplis V.A., Carmeliet P. y col., 1995).

4.2.2.- Fibrinólisis, cicatrización de heridas, formación de la neoíntima y migración de macrófagos.

Fibrinólisis

En condiciones normales, los ratones uPA^{-/-} y tPA^{-/-} presentan una capacidad fibrinolítica normal en el compartimento vascular, indicando que uPA puede suplir a tPA en la disolución de los coágulos de fibrina. Ocasionalmente, los ratones uPA^{-/-} desarrollan depósitos espontáneos de fibrina en hígado e intestino, mientras que en los ratones tPA^{-/-} se detectan en el riñón, manifestando glomerulonefritis por acúmulos de fibrina en modelos experimentales de daño renal (Kitching A.R., Holdsworth S.R. y col., 1997). En cambio, los ratones deficientes en plasminógeno (Plg^{-/-}) o los doblemente deficientes en uPA y tPA (uPA^{-/-}:tPA^{-/-}) presentan importantes depósitos espontáneos de fibrina intra- y extravasculares en varios órganos (Carmeliet P., Schoonjans L. y col., 1994; Bugge T.H., Flick M.J. y col., 1995). Tales defectos pueden corregirse con la deficiencia de fibrinógeno, sugiriendo que el papel fundamental, y posiblemente el único esencial, del Plg es la fibrinólisis (Bugge T.H., Kombrinck K.W. y col., 1996). Además, los ratones doblemente deficientes en uPAR y tPA (uPAR^{-/-}:tPA^{-/-}) presentan menos depósitos de fibrina que los ratones Plg^{-/-} y los doblemente deficientes para tPA y uPA, sugiriendo que la unión de uPA a su receptor uPAR es menos importante para la fibrinólisis mediada por uPA (Bugge T.H., Flick M.J. y col., 1996).

Cicatrización de heridas

La generación de plasmina es fundamental en los mecanismos moleculares que participan en la curación de las heridas. Los ratones deficientes en Plg (Plg^{-/-}) poseen afectada la capacidad de cicatrizar heridas debido a que padecen un bloqueo de la migración de los queratinocitos en la superficie de las heridas, donde se acumula la fibrina (Romer J., Bugge T.H. y col., 1996). En cambio, la cicatrización en los ratones deficientes conjuntamente en Plg y fibrinógeno (Plg^{-/-}:Fibrinógeno^{-/-}) es normal, indicando que la fibrina es responsable, en último término, de los efectos ocasionados por la deficiencia de Plg (Bugge T.H., Kombrinck K.W. y col., 1996).

Formación de la neoíntima

Las intervenciones vasculares en el tratamiento de la arteriotrombosis, tienen como consecuencia un remodelaje del vaso y/o acumulación de células de músculo liso y ECM en la capa íntima. Los ratones uPA^{-/-}, Plg^{-/-} y en los ratones deficientes doblemente en uPA y plasminógeno (uPA^{-/-}:Plg^{-/-}) se halla inhibida la migración de las células del músculo liso con el consiguiente bloqueo de la formación de la capa interna que rodea los capilares o neoíntima (Carmeliet P. y Collen D., 1998), mientras que en los ratones PAI-1^{-/-} se acelera su formación (Carmeliet P., Moons L. y col., 1997).

Migración de macrófagos

uPA es esencial para la migración de las células del sistema inflamatorio. Los ratones uPA^{-/-} poseen una elevada susceptibilidad a sufrir infecciones de pulmón por patógenos no letales como el *Cryptococcus neoformans* debido a que son deficientes en el reclutamiento de fagocitos mononucleares, neutrófilos y linfocitos (Gyetko M.R., Chen G.H. y col., 1996). Estos ratones presentan, además, un aumento de la susceptibilidad de sufrir botriomicosis por la acción de estafilococos (Shapiro R.L., Duquette J.G. y col., 1997). Sin embargo, los ratones deficientes en uPAR son absolutamente normales (Bugge T.H., Flick M.J. y col., 1995).

4.2.3.- Desarrollo, plasticidad sináptica y muerte neuronal en el Sistema Nervioso Central (SNC)

La expresión de tPA se induce de manera importante en el cerebro durante el desarrollo embrionario y en la etapa post-natal y en el cerebro adulto la actividad de tPA es mayor que en otros tejidos (Friedman C.G. y Seeds N.W., 1994). En el cerebro, tPA tiene un papel esencial en los procesos de plasticidad sináptica (Qian Z., Gilbert M.E. y col., 1993).

En ratones deficientes en tPA (tPA^{-/-}) se produce un retraso severo de la migración neuronal (Seeds N.W., Basham M.E. y Haffke S.P., 1999). Por otra parte, tPA y plasmina participan activamente en la degeneración neuronal inducida por excitoxinas que se produce en el hipocampo de modelos animales que reproducen los procesos degenerativos o de isquemia aguda (Tsirka S.E., Gualandris A., y col., 1995; Tsirka S.E., 1997). El daño excitotóxico induce la síntesis y liberación de tPA por parte de las neuronas y de la microglía (células del SNC con propiedades de macrófagos) y una posterior activación del Plg a plasmina. Los ratones tPA^{-/-} y los Plg^{-/-} son resistentes a la muerte neuronal, al igual que los ratones deficientes conjuntamente en Plg y fibrina (Plg^{-/-}:fibrina^{-/-}). Sin embargo, los ratones deficientes solamente en fibrina no son resistentes a la muerte neuronal, sugiriendo que en el SNC la plasmina actúa sobre un sustrato diferente a la fibrina, representando una diferencia importante con el compartimento vascular (Tsirka S.E., Rogove A.D. y col., 1997). Dicho sustrato es la laminina, la cual es proteolizada en los contactos neurona-ECM provocando su disrupción y en consecuencia, la muerte neuronal por apoptosis (Chen Z.L. y Strickland S., 1997).

4.3.- El sistema del plasminógeno en situaciones patológicas y transformación neoplásica.

Existen varias situaciones patológicas que están asociadas a la expresión descompensada de los componentes del sistema de activación del plasminógeno, siendo las enfermedades cardiovasculares y la transformación tumoral las más estudiadas.

4.3.1.- El sistema uPA-uPAR en la migración y la invasión de las células tumorales.

El papel del uPA y de su receptor específico de membrana, uPAR, en el crecimiento del tumor y la invasión de células tumorales está muy estudiado y se sabe que el sistema uPA-uPAR participa en la migración y la invasión de diferentes tipos celulares (Andreasen P.A., Kjoller L. y col., 1997). uPA induce la migración -independientemente de la generación de plasmina- de células de cáncer de mama (Nguyen D.H., Hussaini I.M. y Gonias S.L., 1998), de pulmón (Busso N., Masur S.K. y col., 1994) o de colon (Wilson A.J. y Gibson P.R., 2000). En células de melanoma, uPA también es capaz de promover la invasión celular (Stahl A. y Mueller, 1994). uPA/uPAR participan en la invasión de células tumorales, a través de la membrana amniótica humana (Mignatti P., Robbins E. y Rifkin D.B., 1986) o en geles de fibrina (Andreasen P.A., Kjoller L. y col., 1997).

En los tumores malignos humanos, se ha observado que los niveles de uPA, uPAR, PAI-1 y PAI-2 varían considerablemente y por ello están relacionados con el pronóstico de los pacientes. Duffy y colaboradores fueron los primeros en utilizar la proteasa uPA como marcador pronóstico del cáncer de mama, observando que las pacientes con tumores de mama con elevados niveles de la actividad enzimática de uPA presentaban una recaída de la enfermedad en un intervalo de tiempo muy corto (Duffy M.J., O'Grady P., y col., 1988). Posteriormente encontraron que altos niveles del antígeno uPA correlacionaba con una supervivencia más corta (Duffy M.J., Reilly D. y col., 1990).

Aparte del cáncer de mama, uPA sirve como marcador de mal pronóstico en otros tipos de cánceres como los de pulmón (Oka K., Ishida T., y col., 1991), vejiga (Hasui Y., Marutsuka K., y col., 1992), estómago (Nekarda H., Schmitt M. y col., 1994), colorectal (Mulcahy H.E., Duffy M.J. y col., 1994), cervix (Kobayashi H., Fujishiro S. y Terao T., 1994), ovario (Kuhn W., Pache L. y col., 1994), riñón (Hofmann R., Lehmer A. y col., 1996) y cerebro, así como en sarcomas de tejidos blandos (Choong P.F, Ferno M. y col., 1996). Los inhibidores de uPA también se utilizan como marcadores de pronóstico en determinados tipos de cánceres. En la mayoría de tumores humanos, la expresión de PAI-1 correlaciona con un mal pronóstico. La primera vez que se utilizó como marcador de pronóstico fue en el cáncer de mama, donde se observó que la expresión de PAI-1 estaba relacionada con la agresividad de la enfermedad (Janicke F., Schmitt M. y col., 1993). Posteriormente, PAI-1 se ha utilizado como marcador en el cáncer gástrico (Nekarda H., Schmitt M., y col., 1994), en el adenocarcinoma de pulmón

(Pedersen H., Grondahl-Hansen J. y col., 1994) y en el cáncer de ovario avanzado (Kuhn W., Pache L. y col., 1994) donde niveles elevados de PAI-1 correlacionan con una disminución de la supervivencia de los pacientes. A diferencia de PAI-1, la expresión de PAI-2 evita la formación de metástasis pulmonares en carcinomas de mama (Evans D.M. y Lin P.L., 1995) y en el cáncer de pulmón de células pequeñas, un bajo contenido de PAI-2 está asociado con la diseminación del tumor (Nagayama M., Sato A. y col., 1994). Se ha propuesto que la asociación entre los niveles elevados de PAI-1 y el mal pronóstico de algunos tumores está relacionada con la capacidad de éste para modular la migración celular más que con sus efectos sobre la actividad proteolítica de los PAs.

Los estudios relativos a uPAR son menores aunque también aparece como un marcador en ciertos tipos de tumores como los colorectales, donde se sobreexpresa en las células inflamatorias y tumorales (Ganesh S., Sier C.F., y col., 1994), en las células inflamatorias del cáncer de mama (Duggan C., Maguire T. y col., 1995) y el carcinoma escamoso de pulmón (Pedersen H., Brunner, y col., 1994). En todos ellos los niveles elevados de uPAR están relacionados con una supervivencia más corta. De acuerdo con estas observaciones, Heiss y colaboradores demostraron que la expresión de uPAR en las metástasis en la médula ósea derivadas de tumores gástricos significaba una rápida recaída de la enfermedad en los pacientes (Heiss M.M., Allgayer H. y col., 1995). Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* revelan la expresión de uPA y uPAR en células tumorales pero también en varios tipos de células inflamatorias, endoteliales y en la superficie de los fibroblastos del estroma adyacente al tumor, donde favorecen los procesos de desmoplasia y remodelación tisular (revisado por Andreasen P.A., Kjoller L. y col., 1997).

4.3.2.- Expresión de tPA y sus receptores en tumores humanos y contribución a la invasión tumoral

El papel del tPA y la interacción con sus receptores en la progresión tumoral no es tan conocido como para uPA/uPAR, pese a ello existen estudios que relacionan su expresión con ciertos tumores humanos.

Los niveles de tPA son elevados en los primeros estadios del cáncer de mama y disminuyen a medida que el tumor progresa, es decir cuando se va perdiendo la diferenciación (Duffy M.J., O'Grady P. y col., 1988; Grondahl-Hansen J., Bach F. y Munkholm-Larsen P., 1990). Las pacientes con niveles altos de uPA y bajos de tPA en los tumores, presentan tasas de recaídas significativamente más altas que las pacientes con bajos niveles de uPA y altos de tPA (Kim S.J., Shiba E. y col., 1998). De forma similar, se detecta una elevada expresión de tPA en pacientes con APC familiar que disminuye en el carcinoma de colon (Verspaget, Sier, y col., 1995). Sin embargo, estudios *in vitro* usando la línea tumoral Co115 muestran que produce tPA pero no uPA. Estas células son muy invasivas (Cajot J.F., Sordat B. y Bachmann F., 1986; Cajot J.F., Bamat J. y col., 1990) y metastáticas aunque las células Co112, que únicamente expresan uPA, también lo son tanto *in vitro* como *in vivo* (Cajot J.F., Sordat B. y Bachmann F.,

1986). Dichos resultados indican que tPA y uPA pueden participar en la invasión tumoral *in vivo*.

En el carcinoma de endometrio los niveles de tPA son elevados en el tejido hiperplásico y disminuyen al perderse la diferenciación (Nordengren J., Casslen B. y col., 1998). Estas observaciones apuntan al hecho de que el tPA podría tener un papel relevante en las primeras etapas de la progresión tumoral en este tipo de cáncer.

En melanomas, tPA se expresa en los tumores primarios y en las metástasis derivadas, así como en líneas celulares y en transplantes de éstas a animales xenógrafos (Herlyn D., Iliopoulos D. y col., 1990; Colombi M., Belloti D. y col., 1995). En otros estudios, se detecta tPA en la metástasis observando niveles de expresión variables en el tumor primario, preferentemente en el frente de invasión (de Vries T.J., Mooy C.M. y col., 1995).

En neuroblastomas, las líneas celulares expresan, en su mayoría, niveles elevados de tPA, mientras que la expresión de uPA, uPAR, PAI-1 o PAI-2 es prácticamente nula. En experimentos *in vivo*, la expresión de tPA es elevada independientemente del estadio tumoral mientras que la de PAI-1 aumenta a medida que progresa el tumor sugiriendo que PAI-1, y no tPA, está asociado al estadio metastático (Sugiura Y., Ma L. y col., 1999). Además, tPA es detectado en gliomas astrocíticos (Kinder D.H., Berger M.S. y col., 1993). En estudios con un modelo animal que desarrolla gliomas, con alto grado de invasión local, se observa una elevada expresión de tPA en el borde de invasión donde colocaliza con VEGF (Lindgren M., Johansson M., R. y col., 1997; Sandstrom M., Johansson M. y col., 1999).

En estudios *in vitro* con células de leucemia linfoblástica, se demuestra que la expresión de uPA y tPA contribuyen a la invasión celular. Las células leucémicas con mayores niveles de tPA se relacionan con un estadio más inmaduro (Reiter L.S., Spertini O. y Kruithof E.K., 1997). *In vivo*, los granulocitos normales expresan uPA y no tPA, mientras que en las células de leucemia aguda mieloide se induce la expresión de tPA (Wilson, Jacobs, y Dowdle, 1983). Otros tipos de leucemia donde también están incrementados los niveles de tPA es la leucemia aguda mieloblástica (AML) y linfoblástica (ALL) (Wada H., Kumeda Y. y col., 1993a; Wada H., Kumeda Y. y col., 1993b) y la leucemia aguda promielocítica (APL) (Menell J.S., Cesarman G.M. y col., 1999).

Adicionalmente, se ha descrito el aumento de tPA y uPA en los carcinomas uterinos y de ovario (Saito K., Nagashima M. y col., 1990; Moser T.L., Young T.N. y col., 1994) y en el carcinoma hepatocelular (De Petro G., Tavian D. y col., 1998) indicando en la mayoría de los estudios, que la expresión conjunta de tPA y uPA favorece el proceso metastático.

Finalmente, en el adenocarcinoma de páncreas humano se ha detectado sobreexpresión de tPA tanto en las células tumorales *in vivo* como en un elevado porcentaje de líneas celulares pancreáticas tumorales humanas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998). A pesar de que *in vitro*, tanto uPA como tPA contribuyen a la invasión, *in vivo* tPA se asocia al proceso neoplásico mientras que la expresión de uPA/uPAR parece estar asociada a pancreatitis. El papel de tPA en el cáncer de páncreas se ve reforzado en experimentos de inhibición de tPA,

mediante anticuerpos neutralizantes o inhibidores químicos, que muestran una disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales pancreáticas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998). Además, estudios recientes *in vitro* e *in vivo*, en xenotransplantes de células tumorales pancreáticas humanas en ratones inmunodeprimidos, demuestran que tPA también es capaz de estimular la proliferación celular y la angiogénesis en los tumores pancreáticos exocrinos humanos (Díaz V.M., Planaguma J., y col., 2002).

Por lo que respecta al papel de los receptores de tPA en cáncer, se ha demostrado la expresión de anfoterina/HMG1 en células de neuroblastoma donde interacciona con tPA y Plg (Merenmies J., Pihlaskari R. y col., 1991). Anfoterina también se ha encontrado unida al dominio extracelular del receptor de los productos finales de glucosilación avanzada (RAGE) con el que colocaliza en el frente invasivo de tumores neuronales (Fages C., Nolo R. y col., 2000), y se ha demostrado que el bloqueo de la interacción de anfoterina y RAGE disminuye el crecimiento y la formación de metástasis de tumores (Taguchi A., Blood D.C. y col., 2000).

En experimentos *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer de mama, se ha descrito la CK8 como la principal proteína de membrana plasmática de unión a Plg que favorece la activación del Plg asociado a las células, mediante la acción de tPA (Gonias S.L., Hembrough T.A. y Sankovic M., 2001).

Por otro lado, se ha observado que AnxA2, el principal receptor de tPA descrito en células endoteliales, está sobreexpresado en diferentes condiciones patológicas como linfomas (Pham H.T., Block N.L. y col., 1997) y leucemia promielocítica aguda (APL) (Heicappell R., Wettig I.C. y col., 1999; Menell J.S., Cesarman G.M. y col., 1999). También se ha descrito la sobreexpresión de AnxA2 en las células de tumores primarios de cáncer de páncreas (Vishwanatha J.K., Chiang Y. y col., 1993; Paciucci R., Tora M. y col., 1998) y en tumores gástricos, en los que está asociada con un peor pronóstico (Emoto K., Sawada H. y col., 2001; Kim J. y Hajjar K.A., 2002). Estos resultados indican que AnxA2 podría estar actuando como receptor de tPA en dichas células tumorales. Estudios recientes de nuestro grupo (Peiró S. y col., en revisión) utilizando un amplio número de tumores pancreáticos muestran una sobreexpresión de AnxA2 en el 70% de los casos, así como en las lesiones preneoplásicas de tipo PanIN, lo que unido a la sobreexpresión de tPA anteriormente mencionada podría sugerir la participación de este receptor en la tumorigénesis pancreática.

OBJETIVOS

Estudios previos utilizando tejidos y cultivos de células tumorales y pancreáticas han demostrado que la expresión de tPA está fuertemente asociada al fenotipo neoplásico sugiriendo que esta proteasa puede estar implicada en el proceso tumoral pancreático, y abriendo nuevos campos de estudio para futuras terapias. Sin embargo, es importante poder recurrir a modelos animales que permitan aproximaciones experimentales no factibles en humanos. Para profundizar en el estudio del papel del tPA en la progresión tumoral pancreática *in vivo*, nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar la expresión de tPA y su receptor, anexina A2, en el páncreas normal de ratón y en los tumores de varios modelos murinos de tumorigénesis pancreática (Ela1-myc, Ela1-TAg, Ela1-CCK2, MT-TGF α).
- 2- Analizar el efecto de la inactivación del gen de *tPA* sobre el desarrollo y progresión tumoral pancreática murina mediante cruce de los ratones transgénicos Ela1-myc o Ela1-TAg con ratones deficientes en tPA (tPA^{-/-}) y estudios de supervivencia y características histológicas del tumor.
- 3- Profundizar en los mecanismos de acción del tPA en la progresión tumoral pancreática mediante análisis de angiogénesis, proliferación e invasión en los tumores así como expresión génica diferencial con *microarrays* entre ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA^{-/-}.
- 4- Generar ratones transgénicos que sobreexpresen el gen del *tPA* en células acinares o ductales, utilizando los promotores de elastasa 1 (Ela1-tPA) o citoqueratina 19 (CK19-tPA) respectivamente, y analizar los efectos de dicha sobreexpresión en las células normales pancreáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Ratones genéticamente modificados

Se han utilizado las siguientes líneas de ratones transgénicos y *knock out*:

1. Ratones Ela1-myc: son animales transgénicos que sobreexpresan el oncogén *c-myc* bajo un promotor específico de células acinares pancreáticas, elastasa 1. Estos ratones han sido cedidos por el Dr. E.P. Sandgren (*Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison WI*) y han sido descritos previamente (Sandgren E.P. y col., 1991).

2. Ratones Ela1-TAg: ratones transgénicos que sobreexpresan el fragmento 1-127 del antígeno T del virus SV40 bajo el promotor específico anteriormente mencionado, elastasa 1 (Tevethia MJ y col., 1997). Dichos animales fueron cedidos por la Dra. M.J. Tevethia (*Department of Microbiology, Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, PA*).

En ambos casos los ratones macho portadores del transgén han sido cruzados con hembras salvajes de la cepa C57Bl/6 y el genotipo de la descendencia ha sido testado mediante de la técnica de amplificación de DNA (PCR) a partir del DNA extraído de la cola de los ratones (ver Apartado 1.2).

Estos dos ratones transgénicos han sido utilizados como modelos de tumorigénesis pancreática murina.

3. Ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor de CCK2 humano bajo el promotor específico de células acinares, elastasa 1, Ela1-CCK2. Estos animales han sido generados por la Dra. C. Saillan-Barreau (*INSERM Unite 151, Institut Louis Bugnard, Centre Hospitalier Universitaire Rangueil, Toulouse, Francia*) y mantenidos en su laboratorio.

4. Ratones transgénicos que sobreexpresan el TGF α bajo el promotor de metalotioneina-I (MT), inducible por Zn²⁺. Dichos ratones han sido generados por el Dr. E.P. Sandgren (*Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison WI*) y mantenidos en su laboratorio.

Los ratones transgénicos Ela1-CCK2 y MT-TGF α han sido utilizados como modelos de metaplasia ductal y de formación de estructuras ductulares no neoplásicas.

5. Ratones *knock out* (KO) para el tPA, uPA y Plg, los cuales han sido cedidos por el Dr. P. Carmeliet (*Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Bélgica*). El fondo genético de estos animales corresponde a un 75% de la cepa C57Bl/6 y un 25% de la cepa 129SV/SL. Para el mantenimiento de estas colonias se utilizaron animales KO homocigotos para el tPA y uPA (tPA^{-/-} y uPA^{-/-}) y heterocigotos para el

plasminógeno (Plg+/-) ya que los animales homocigotos Plg-/- no son fértiles (Ploplis V.A., Carmeliet P. y col., 1995). La comprobación del genotipo de la descendencia de cada una de las líneas se ha llevado a cabo de acuerdo con los protocolos descritos previamente (Dr. V. Attenburrow, Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium) (ver Apartado 1.2).

1.1.- Condiciones de estabulación

Todos los animales fueron mantenidos en jaulas separadas bajo ciclos constantes de 12 horas de luz y oscuridad, con la temperatura (21±1 °C) y humedad (entre 30-50%) controladas y alimentados *ad libitum* con pienso completo. Las parejas destinadas a la cría se alimentaron con pienso suplementado con pipas de girasol como fuente de vitamina E (Panlab S.A.).

1.2.- Genotipado de los ratones

1.2.1- Extracción de DNA a partir de la cola de ratón

Se cortó un fragmento de aproximadamente 4 mm de la cola del ratón, se añadía 0,3 ml de tampón de extracción de DNA (Tris HCl 20 mM pH 8, EDTA 5 mM pH 8, SDS 0,5%, NaCl 200 mM) con proteinasa K (100 µg/ml, DAKO) y se incubaba a 55 °C toda la noche en agitación. Al día siguiente se centrifugaba a 14.000 rpm 10 min y se transfería el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Posteriormente se añadían 0,5 ml de 2propanol y se mezclaba hasta que se formaba un *ovillo* de DNA visible el cual se recogía con una espátula y se lavaba con 0,4 ml de etanol 70%. La suspensión de DNA en etanol se centrifugaba a 14.000 rpm 1 min, se eliminaba el sobrenadante y el DNA se dejaba secar durante 2-3 min antes de resuspenderlo en 0,4 ml de solución TE (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

1.2.2.- Amplificación del DNA genómico por PCR

Todas las reacciones de PCR para genotipar los ratones individualmente se hicieron con la DNA polimerasa Ecotaq de Ecogen utilizando 0,5 U de Taq polimerasa por reacción y una concentración final de 0,2 mM de oligonucleótidos y 1,5 mM de MgCl₂. Además del correspondiente tampón 10x, a la solución se le añadía DMSO (1/100 del volumen final) y finalmente, 1 µl de DNA.

Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR utilizados fueron los siguientes:

Ratones Ela1-myc:	5'-CAC CGC CTA CAT CCT GTC CAT TCA AGC-3' (<i>c-myc 1F</i>) 5'-TTA GGA CAA GGC TGG TGG GCA CTG-3' (<i>c-myc LGH3R</i>)
Ratones Ela1-TAg:	5'-GCA TCC CAG AAG CCT CCA AAG-3' (<i>SV40-T1</i>) 5'-GAA TCT TTG CAG CTA ATG GAC C-3' (<i>SV40-T2</i>)
Ratones tPA-/-:	5'-GGA AAG GTG TGA CTT ACC GTG GCA CCC AC-3' (<i>tPA 740</i>) 5'-CGC TGT GTA ACT CTT GCC CAT GAG GAC-3' (<i>tPA 840</i>) 5'-AAT GTG TCA GTT TCA TAG CC (<i>Pgka</i>)

Ratones uPA^{-/-}: 5'-CAG AGG GGA GAG ACT GCC CGG CTT GGG-3' (*uPAG 240*)
 5'-GGT ACT CCC CGT GGC TTC TTC CTC CCT TG-3' (*uPAG 289*)
 5'-AAT GTG TCA GTT TCA TAG CC-3' (*Pgka*)

Ratones Plg^{+/-}: 5'-ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC G-3' (*Neo 1*)
 5'-TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC GAC-3' (*Neo 2*)
 5'-TCA GCA GGG CAA TGT CAC GG-3' (*Plg 1*)
 5'-CTC TCT GTC TGC CTT CCA TGG-3' (*Plg 2*)

Condiciones PCR

Genotipo Temperatura	Ela1-myc, Ela1- TAg, tPA ^{-/-}	uPA ^{-/-}	Plg ^{+/-}
T ^a desnaturalización (ciclo 1)	95 °C 5 min	95 °C 5 min	95 °C 5 min
T ^a desnaturalización	94 °C 1 min	94 °C 1 min	94 °C 1 min
T ^a "annealing"	60 °C 1 min	55 °C 1 min	58 °C 1 min
T ^a elongación	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min
T ^a elongación (último ciclo)	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min
T ^a final	4 °C 8	4 °C 8	4 °C 8
Número de ciclos	40	38	30

2.- Generación de animales "híbridos" transgénicos-knock out (Ela1-myc o Ela1-TAg y tPA^{-/-}, uPA^{-/-} o Plg^{-/-}).

Los animales transgénicos Ela1-myc y Ela1-TAg se cruzaron con los ratones *knock out* tPA^{-/-}, uPA^{-/-} o Plg^{+/-} para obtener la progenie F1 híbrida Ela1-myc o Ela1-TAg tPA^{+/-}, uPA^{+/-} o Plg^{+/-}. Seguidamente esta progenie se cruzó con ratones tPA^{-/-}, uPA^{-/-} y Plg^{+/-} con el fin de obtener la progenie F2 de híbridos homocigotos Ela1-myc o Ela1-TAg tPA^{-/-}, uPA^{-/-} o Plg^{-/-}. Estos animales fueron analizados respecto al grupo control (*wild type* o hermanos heterocigotos) para los estudios de supervivencia así como para el seguimiento del proceso tumoral pancreático.

El mantenimiento de los animales así como el sacrificio cuando fue requerido se realizó en todo momento de acuerdo con procedimientos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA).

3.- Caracterización de los ratones híbridos Ela1-myc o Ela1-TAg y tPA ^{-/-}, uPA^{-/-} o Plg ^{-/-}

3.1.- Análisis de los tumores de los ratones Ela1-myc o Ela1-TAg y tPA ^{-/-}

Para estos experimentos se sacrificaron animales a determinados tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 meses de edad), momento en el que se hacía la autopsia correspondiente y extracción del páncreas/tumor para el posterior análisis histopatológico.

Todos los tumores fueron medidos y se registraron sus características macroscópicas tales como vascularización, forma, consistencia, color y localización de la masa tumoral en la cavidad peritoneal así como el grado de adhesión al intestino delgado y/o estómago. Paralelamente se registró el aspecto del bazo, intestino grueso y, en un subgrupo de animales la presencia de metástasis macroscópicas en hígado y pulmón.

Los tumores fueron analizados mediante estudios histológicos e inmunohistoquímicos:

3.1.1.- Procesamiento de los tumores para el estudio histológico e inmunolocalización.

El fragmento del tumor que se escogía para este fin se introducía inmediatamente en formol 10% durante 24 horas y posteriormente se procedía a la deshidratación con alcoholes a concentraciones crecientes hasta tratar con xileno y finalmente con parafina líquida. Dicha deshidratación comenzaba con una mezcla de formol-alcohol al 70% seguida de incubaciones, de 30 minutos, con alcohol 70%, 90%, 96% y alcohol absoluto hasta tratar dos veces con parafina líquida. Tras dejar toda la noche en un tercer cambio de parafina a 60 °C, se procedía a la inclusión de las muestras mediante la colocación del tejido en moldes metálicos con parafina líquida que se enfriaban colocándolos en placas metálicas a -10 °C. Los bloques se guardaban a temperatura ambiente y protegidos de la luz hasta el momento de obtener las secciones.

Para los experimentos dirigidos a analizar la expresión de marcadores vasculares y de proliferación utilizando técnicas inmunohistoquímicas, los tumores fueron inicialmente fijados con paraformaldehído al 4% en PBS 1x durante 24 horas a 4 °C. Después de este tiempo se procedía a la deshidratación de la muestra con alcoholes crecientes hasta llegar a la parafina líquida y posterior inclusión de la forma descrita anteriormente.

Las muestras incluidas en parafina fueron procesadas para obtener secciones de 5 µm de grosor. Para eliminar la parafina, las muestras se calentaban a 65 °C durante 30-45 min. A continuación, se hacían tres incubaciones de 7-10 min con xileno y así eliminar totalmente la parafina del tejido. Seguidamente, se eliminaban los restos de xileno y se hidrataba el tejido mediante la incubación de alcoholes a concentraciones menguantes; se comenzaba con alcohol absoluto (dos cambios de 3 min), continuándose con alcohol al 90% 5 min y alcohol al 70% durante 3-5 min, finalizando con H₂O.

Para aquellos estudios en los que fue necesario hacer criosecciones (*microarrays*), los tumores se colocaban en moldes de plástico (*Tissue-Tek, Cryomold*®, Miles Inc) con el medio de inclusión OCT (*Tissue Tek*® *OCT™Compound*, SAKURA) y se introducían en 2metilbutano a -80°C, lo que permite una congelación paulatina de la muestra. Dicho procedimiento evita que se produzca un cambio brusco de la temperatura que pueda destruir el tejido. Los bloques resultantes se guardaron a -80 °C hasta que se hacían criosecciones de 6 µm de grosor con un criotomo.

3.1.2.- Análisis histopatológicos de los tumores.

Las secciones de los tumores se contrastaron con hematoxilina/eosina y fueron observadas a diferentes aumentos (10-40x). El estudio histopatológico de los tumores fue realizado por el Dr. Josep M. Corominas (*Departament de Patologia, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona*). En cada una de las muestras se valoraron los siguientes parámetros: tipo de diferenciación (acinar, ductal o mixto), grado de la lesión y de diferenciación así como la presencia de displasia, hiperplasia, infiltración ganglionar, vascular o nerviosa y el grado de necrosis y apoptosis.

3.1.3.- Análisis inmunohistoquímico

Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron siempre tumores incluidos en parafina. Además, según las características de los anticuerpos se llevaron a cabo distintos protocolos de inmunolocalización (manuales o semi-automatizados).

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Especie animal	Compañía	Dilución	Método
anti-tPA humano 387	Cabra	Am.Diagnost.	1:100, 1:300 1:250, 1:500	Manual Automat
anti-tPA murino	Conejo	*	1:300	Automat
anti-AnxA2	Ratón	Transd. Lab.	1:1500	Automat
anti-AnxA2	Conejo	**	1:1500	Automat
anti-CD31	Rata	Pharmingen	1:100	Manual
anti-CD54	Rata	Chemicon	1:100	Manual
anti-VE cadherina	Rata	Pharmingen	1:100	Manual
anti-vWB	Conejo	Neomarkers	1:80	Manual
anti-Ki67	Conejo	Novocastra	1:1500	Automat

* Anticuerpos cedidos por el Dr. L.Moons, *Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders Institute for Biotechnology*, Leuven, Bélgica.

** Anticuerpo obtenido en nuestro laboratorio. Mediante la técnica de ELISA y *Western Blotting* se comprobó la reactividad del suero post-inmune para la AnxA2.

De todos los anticuerpos de la Tabla se seleccionaron los que están en negrita para el estudio de los tumores.

Inmnohistoquímica manual

En el caso de la inmunolocalización de la proteína Factor de von Willebrand, se utilizó el anticuerpo anti-Factor VIII related antigen/von Willebrand Factor Ab-1 (Neomarkers, Fremont, CA) a una dilución de 1:80 siguiendo el protocolo ya publicado por S. Montaner y col., 2003. Sobre las secciones desparafinadas se bloqueaba la acción de la peroxidasa endógena del tejido incubando 30 min con H₂O₂ 3% en PBS 1x. Tras el bloqueo se lavaba 3 veces, durante 2 min, con H₂O_d y seguidamente 3 veces, por 5 min, con PBS 1x para continuar con el desenmascaramiento antigénico en el que se incubó 20 min a 37 °C con pepsina 0,1% en HCl 0,1 N preparada inmediatamente antes de su uso. Se volvía a lavar con PBS 1x y seguidamente se bloqueaba la unión inespecífica con suero de caballo 2% en PBS 1x 25 min. A continuación, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo durante toda la noche a 4 °C. Tras esta incubación se volvía a lavar con PBS 1x para continuar con la incubación de 30 min con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con biotina (DAKO) y diluido 1:250 en PBS 1x. Seguidamente se hacían lavados que precedían a una incubación de 30 min con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO) a una dilución 1:250 en PBS 1x. Después de lavar 3 veces con PBS 1x se revelaba durante 1 min con DAB (DAKO, ChemMate), reactivo que actúa como sustrato cromogénico de la peroxidasa. Tras los lavados se tiñó con hematoxilina de Harris durante 2-3 min, tiempo tras el cual se lavaba con H₂O_d y se deshidratava utilizando una batería de alcoholes a concentraciones crecientes (5 min en alcohol 50%, 70%, 96% y dos veces alcohol absoluto) que acababa con tres cambios de 5-7 min de xileno y se montaba con el medio de montaje insoluble en agua, DPX.

Inmunohistoquímica automatizada

La inmunotinción se realizó utilizando la máquina Tech-Mate 500 (Ventana Medical System, Tucson, AZ). Las secciones de 5 µm desparafinadas se sometían al desenmascaramiento antigénico incubando 1min en tampón citrato pH 7.3 (Dako, Denmark) a 120 °C. Posteriormente, se procedía a la inmunotinción que se caracteriza por tener tiempos de incubaciones y lavados más cortos que en los protocolos manuales (30 min para el anticuerpo primario y secundario y 10 seg para los lavados). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo unido a una molécula de dextrano, que amplifica la señal, conjugada con peroxidasa (Envision®, Dako, Denmark). Para la reacción se añadió DAB como sustrato cromogénico y finalmente, se contrastó con hematoxilina de Harris.

3.2.- Estudios de supervivencia

Para los estudios de supervivencia, los animales murieron de forma espontánea o fueron sacrificados cuando presentaban signos claros de deterioro en su salud como es la distensión abdominal, falta de brillo en el pelo, movimientos lentos o aletargamiento. En todos los casos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y todo el procedimiento se hizo con la aprobación del CEEA. A partir de la fecha de nacimiento y la de muerte de cada animal se calculó la supervivencia y el conjunto de datos se analizó estadísticamente como se describe en el Apartado 3.3.

3.3. Análisis estadístico

En los estudios de supervivencia se computarizó la media del tiempo desde el nacimiento hasta la muerte o el sacrificio y se analizaron los datos utilizando el método de Kaplan-Meier. Para comparar la supervivencia de los ratones transgénicos *Ela1-myc* salvajes para el tPA y la de los ratones híbridos *Ela1-myc tPA+/-* y *tPA-/-* (progenie F2), se utilizaron las pruebas de Breslow y Log-rank, considerando que había diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS versión 9.0 (SPSS Inc, Chicago, 1999). El mismo estudio se realizó para comparar la supervivencia de los ratones transgénicos *Ela1-myc* con la de los híbridos *Ela1-myc:uPA+/-* ó *Ela1-myc:Plg+/-* y *Plg-/-* (F2) así como para la comparación entre los ratones *Ela1-TAg* y los híbridos *Ela1-TAg:tPA+/-*.

Para el estudio de independencia de dos variables categóricas se realizó la prueba estadística de Chi-cuadrado. Para el estudio de independencia de variables con distribución normal, como fue el análisis de las diferencias en la vascularización y de la tasa de proliferación celular de los tumores de ratones con diferentes genotipos, se aplicó el test de Mann-Whitney.

3.4. Análisis de expresión génica diferencial entre los ratones transgénicos *Ela1-myc* y *Ela1-myc:tPA-/-* (Microarrays).

Con el fin de estudiar diferencias en el perfil de expresión génica entre las células ductales tumorales de los ratones transgénicos *Ela1-myc* y *Ela1-myc:tPA-/-*, se realizaron análisis de expresión génica global utilizando *microarrays* de oligonucleótidos en el laboratorio del Dr. Thomas Gress (*Universität Klinikum*, Ulm, Alemania). Para ello se utilizaron soportes de vidrio unidos covalentemente a una capa de Gamma Amino Propil Silano (Corning® GAPS II Coated slides, Life Sciences) que facilita la inmovilización del DNA. Sobre estos soportes se dispusieron, mediante un instrumento BioRobotics, (Cambridge, UK), 16.463 oligos de 70 nucleótidos que representan 16.463 genes de ratón (*Mus musculus*) y que están agrupados en el Operón de QIAGEN Array-Ready Oligo Set™ Versión 2.0. Los genes fueron obtenidos a partir de la UniGene Database Build mM 102 y de la Base de Datos de Secuencias de

Referencia de Ratón (RefSeq), ambos desarrollados y mantenidos en el National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene).

3.4.1.- Obtención, amplificación y marcaje del RNA

Extracción del RNA

A partir de criosecciones de los tumores de ratones Ela1-myc (control) y Ela1-myc:tPA-/- (muestra problema) se aislaron células de los ductos tumorales mediante microdissección láser (*Laser Capture Microdissection, Arcturus Engineering, USA*). En dicha técnica las células son catapultadas a un tapón (CapSure™ Macro LCM Caps) situado justo encima del tejido mediante la emisión de una serie de rayos láser, de 15-30 µm de diámetro. Los tapones con el tejido microdisecionado se insertaban directamente en tubos de 0,5 ml con 50 µl de solución de extracción (XB) y se procedió a la extracción del RNA de la muestra siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial (PicoPure™ RNA Isolation Kit, Acturus).

Marcaje del RNA con NHS-Cy

El RNA obtenido a partir de la microdissección (300-500 ng/ muestra) se amplificó y marcó indirectamente con el fluorocromo Cy-5 (rojo) mediante transcripción *in vitro*, y posteriormente se purificó según el protocolo recomendado por el fabricante (Amino Allyl Message-Amp™ aRNA kit, Ambion). Dichas muestras se hibridaron contra un RNA de referencia de ratón (10 µg) (*Universal Mouse Reference RNA, Stratagene*) que se marcó con el fluorocromo Cy-3 (verde) mediante transcripción reversa (o retrotranscripción).

En el proceso de retrotranscripción del RNA a cDNA se introdujeron oligonucleótidos unidos a un grupo NH₂, y conjugados al fluorocromo Cy-3. Se añadió el oligonucleótido *Anchor-dT* (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTVN -3') (800 pM) al RNA total y se incubó a 65 °C 10 min. A continuación, se añadió la transcriptasa reversa RNasa-H SuperScript™ II de Invitrogen® (más DTT 10 mM, dNTPs 0,5 mM, dTTPs 0,15 mM, aa-dUTP 0,3 mM) así como RNasin® de Promega (40 U), y se incubó 2 h a 42 °C. Posteriormente, se eliminó el RNA añadiendo 2 µl de RNasa H e incubando 15 min a 37 °C. La reacción se inactivó calentando 30 min a 70 °C y, tras una breve centrifugación, el cDNA obtenido fue purificado (Kit de Qiagen). Finalmente, el cDNA-aa-dUTP se precipitó en un *SpeedVac* 30-40 min. El *pellet* de cDNA-aa-dUTP se resuspendió en 9 µl de una solución tampón (NaHCO₃ 0,05 M, pH 9; DMSO 0,5%) e inmediatamente se mezcló con el *botón* activo fluorescente y se incubó 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se añadieron 4,5 µl de HONH₂ 4 M y se volvió a incubar en la oscuridad durante 15 min, tiempo tras el cual se purificó el cDNA marcado.

3.4.2.- Prehibridación e hibridación de los soportes de vidrio con los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sembrados sobre los soportes de vidrio se entrecruzaron mediante irradiación con luz UV a 130 mJ/cm² (*UV illuminator Stratalinker® 2400, Stratagene*), seguida

de un lavado con SDS 0,1% 10-20 seg y posteriormente con H₂O 10-20 seg. A continuación se incubó 1 h a 42 °C con la solución de prehibridación (SSC 3x, formamida 10%, BSA 1%, SDS 0,25%), se lavó con H₂O 10-20 seg y se secó centrifugando a 1000 rpm 2 min.

La solución de hibridación se preparó a partir de los cDNAs control (Ela1-myc) y problema (Ela1-myc:tPA^{-/-}) conjugados con Cy-5 y con el cDNA de referencia conjugado con Cy-3, que se calentaron conjuntamente (muestra control con referencia; muestra problema con referencia) 5 min a 95 °C para desnaturalizar la sonda. A esta mezcla se añadió SSC 3x, formamida 10%, poli-A, tRNA, ssDNA, SDS 0,25% y se incubó 30 min a 42 °C con agitación. Una vez tratados los soportes de vidrio y preparada la solución de hibridación con el cDNA marcado con fluorescencia, se inició el proceso de hibridación, que se realizó en un instrumento *GeneTAC Hybridization Station* (Genomic Solutions). Inicialmente se precalentaron los soportes 5 min a 37 °C para continuar con la hibridación a 37 °C durante 18-20 h. Una vez finalizado el proceso, se realizaron lavados con formamida 5%, SSC 2x, SDS 0,1% a 37 °C durante 1 ciclo de 1 min y dos ciclos posteriores de 3 min cada uno, y un último lavado con *Tween* 0,05% en PBS 1x 1 ciclo de 3 min a 25 °C. Una vez acabado todo el proceso, los soportes se volvían a lavar con *Tween* 0,2% en PBS 1x 5 min y se centrifugaban a 600 rpm durante 5 min.

3.4.3. Exploración de las imágenes y análisis

Finalizada la hibridación, los soportes se analizaron mediante un escáner láser (Genepix 4000B, Axon instruments, Inc) con el que se obtuvieron imágenes superpuestas en rojo y verde que fueron procesadas con el software Genepix Pro 4.0 (Axon instruments, Inc). Los *spots* (puntos) con una señal de fondo localmente muy elevada o aberrantes en la forma o tamaño fueron descartados por el software. Posteriormente, se corrigieron manualmente los *spots* que el programa no detecta que son aberrantes o que la intensidad de fluorescencia no es correcta.

Filtros de selección

Todos los *spots* se normalizaron asumiendo que la media de la proporción de las medianas de los caracteres es =1. Posteriormente se compararon los datos de la muestra problema (Ela1-myc:tPA^{-/-}) y control (Ela1-myc) calculando la media de la intensidad de señal problema/control de las dos réplicas realizadas. El primer criterio de selección utilizado fue descartar aquellos genes que no cumplieran que la intensidad de señal fuera 3 veces mayor al ruido de fondo (señal/fondo > 3). Posteriormente se descartaron aquellos genes que presentaban una desviación estándar de la media problema/control superior al 50%. En la Tabla 5 de los resultados se incluyen aquellos genes en los que la media de la señal problema/control ≥ 2 (inducidos) y $\leq 0,5$ (inhibidos).

4.- Ratones transgénicos Ela1-tPA y CK19-tPA

Se generaron dos modelos de animales transgénicos: uno que sobreexpresa el tPA humano bajo el promotor de elastasa 1 (específico para células acinares) (Ela1-htPA), y el segundo, bajo un promotor específico de células ductales, el de la citoqueratina 19 (CK19-htPA).

4.1.- Obtención de la construcción Ela1-htPA

4.1.1.- Selección de la línea celular tumoral pancreática humana para la amplificación del cDNA del tPA mediante RT-PCR.

Para clonar el cDNA del tPA humano, en primer lugar hicimos un análisis de diferentes líneas celulares pancreáticas humanas para seleccionar aquella que expresara un alto nivel de tPA. Para ello utilizamos las líneas celulares tumorales pancreáticas humanas Hs-766t, BXPC-3, Panc-1, RWP-1 y SK-PC-1. Las células se cultivaron con medio DMEM suplementado con 10% FBS hasta que alcanzaban el estado de confluencia, momento en el que se lisaron. Posteriormente, se procedió a la extracción de RNA por el método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski P y col., 1987). Las células (10^7) se lisaron con 4 ml de una solución desnaturante (solución D: iocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarkosyl 0,5%, 2-beta-mercaptoetanol 0,1 M). Seguidamente se añadían 0,4 ml de NaAc 2 M, pH 4 y se comenzaba la extracción con fenol/cloroformo añadiendo 4 ml/ 0,8 ml y dejando reposar la mezcla 15 min en hielo. Tras centrifugar 30 min a 8000 rpm y a 4 °C, se añadió un volumen de isopropanol y se precipitó una noche a -20 °C. A continuación, se centrifugó 30 min a 8.000 rpm y 4 °C y el *pellet* obtenido se resuspendió en solución D más un volumen de isopropanol para volver a precipitar 2 h a -20 °C. Finalmente, se centrifugó 30 min 13.000 rpm a 4 °C y el *pellet* se lavó con etanol 75 % en H₂O DEPC y se dejó secar. Éste se resuspendió en H₂O DEPC y se guardó a -80 °C hasta el momento de utilizarlo.

Se analizó por RT-PCR la expresión de mRNA del tPA humano en estas líneas celulares. La calidad del RNA se comprobó midiendo la densidad óptica a λ :260 nm (WPA UV 1101, Biotech Photometer) y por electroforesis en un gel de agarosa. Con la cantidad de RNA estandarizada, se partió del mismo valor de RNA (100 ng) para comenzar la síntesis de cDNA y posterior amplificación de un fragmento del gen del tPA humano de 700 pb por PCR (*htPA-RT1*: 5'-GTC TTC GTT TCG CCC AGC CAG-3' y *htPA-RT2*: 5'-CTG TGC TGT GTA AAC CTT GCC-3'). Los procesos de retrotranscripción y amplificación del cDNA por PCR se realizaron en un sólo paso gracias al kit One Step RT-PCR System de Invitrogen. En la misma reacción de RT-PCR se llevaba un control positivo del estado del RNA mediante la amplificación de un fragmento de 200 pb del gen de la actina (*sentido*: 5'- TGA AAC AAC ATA CAA TTC CAT CAT GAA GTG TGA C- 3' y *antisentido*: 5'- AGG AGC GAT AAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT- 3'). En el programa utilizado se realizó un primer ciclo de 50 °C 30 min para la retrotranscripción del RNA a cDNA que iba seguido de un ciclo de 94 °C 2 min para desnaturar el cDNA. Posteriormente, se iniciaban 40 ciclos de amplificación de 94 °C 30

seg, 55 °C 30 seg, 72 °C 1 min y un período de extensión a 72 °C 7 min finalizando a 4 °C. El producto se analizó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

4.1.2.- Clonaje del tPA humano mediante amplificación por RT-PCR

Para el clonaje del tPA humano se utilizó la línea celular SK-PC-1 por ser aquella que expresa los niveles más altos de mRNA de tPA (ver Figura 12 de Resultados). A partir del RNA extraído de las células SK-PC-1 se amplificó el tPA mediante RT-PCR en dos etapas.

Inicialmente se añadió la transcriptasa reversa a 1µg de RNA y el oligonucleótido en sentido 3'→ 5' (0,5 µM) y se incubó a 65 °C 10 min y posteriormente se añadió la RT-polimerasa, los dNTPs 0,5 mM, el tampón 5x y la RNAsina y se incubó 1 hora a 37 °C. A partir del cDNA obtenido se procedió a la amplificación por PCR utilizando la DNA polimerasa Pfx® Platinum de Invitrogen, la cual muestra una gran fidelidad y permite preparar las reacciones a temperatura ambiente sin activarse hasta que no se alcanzan los 94 °C. Las reacciones se hicieron en presencia de MgCl₂ 1,5 mM, oligonucleótidos y dNTPs a 0,3 µM y 1 unidad de polimerasa en 50 µl finales y el programa de amplificación consistió en 37 ciclos de 94 °C 15 seg, 58 °C 30 seg y 68 °C 4 min acabando con un período de extensión de 7 min a 68 °C y finalmente 4 °C. En este caso se utilizaron los oligonucleótidos *Tg1*: 5'- GGG AAG GAG CAA GCC GTG -3' y *Tg2*: 5'- GCT TTT GAG GAG TCG GGT G -3' en los que se han incluido las dianas de restricción BamHI y XbaI respectivamente y que amplificaron un fragmento de 1,76 kb (del nucleótido 32-1791 de la secuencia de cDNA del tPA, que incluye toda la región codificante). Las reacciones de RT-PCR, al igual que las de PCR, se realizaron en un termociclador 2400 Perkin-Elmer. Todo el producto de la reacción se resolvió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio del cual se recortó la banda de 1,76 Kb obtenida para purificar posteriormente con el kit GFX™ (Amersham Biosciences) según protocolo.

El cDNA del tPA humano fue clonado posteriormente en el plásmido pBluescript mediante digestión con XbaI/BamHI y posterior ligación con la ligasa T4 (16 °C toda la noche). Tras la transformación en bacterias competentes según protocolo convencional (manual de laboratorio: Molecular Cloning, Sambrook, Fritsch & Maniatis) y posterior purificación del DNA plasmídico (kit de minipreps Qiaprep, Qiagen), éste se secuenció (Big Dye v 2.0, Applied Biosystems) en su totalidad para descartar la presencia de mutaciones.

4.1.3.- Construcción del plásmido elastasa1-htPA-b-globina-Bluescript

Una vez clonado el tPA en el vector, se insertó el promotor de la elastasa 1 de rata. Se partía del fragmento -500/+8 del gen de la elastasa 1 de rata (Elastasa 1 -500/+8) que se encontraba clonado en el plásmido pUC119 y que fue cedido por la Dra. Galvin Swift (*Department of Molecular Biology, Southwestern Medical Center, Dallas, EEUU*). Con el fin de obtener un nivel elevado de expresión en el páncreas se utilizó el fragmento correspondiente a

la región -205/+8 del promotor (Kruse F., Rose S.D. y col., 1993) y se clonó en pBS-htPA digiriendo con Sal I/BamH I (pBS-Ela1-htPA).

Una vez introducido el promotor, se procedió a la integración de un fragmento de 1,2 Kb del gen de la β -globina de conejo que contiene un intrón seguido de una secuencia de poliadenilación, la cual permite una mayor estabilidad del mRNA, y que fue cedido por el Dr. Gabriel Gil (*Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona*). Debido a la incompatibilidad de las enzimas para digerir y obtener extremos cohesivos, se hizo una primera digestión del vector pBS-Ela1-htPA con Not I, y del plásmido conteniendo β -globina con Sal I (extremo 3'), y posteriormente se rellenó en ambos casos con la enzima Klenow (más dNTPs 0,25 mM) con el fin de obtener extremos romos. Seguidamente se digirieron ambos plásmidos con Xba I (en extremo 5' de β -globina) para ligar el inserto β -globina justo a continuación de la secuencia del tPA en dirección 5' \rightarrow 3'. Tras la ligación y posterior transformación de las bacterias y purificación del DNA plasmídico (kit de minipreps Qiaprep, Qiagen), se secuenció el DNA purificado con el oligonucleótido T3 para comprobar la secuencia de la β -globina. La construcción final, pBS-Ela1-htPA- β globina, de 6,12 Kb, se envió al laboratorio del Dr. Ángel Ramírez (Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Madrid), donde se han llevado a cabo las microinyecciones para la producción de los ratones transgénicos.

4.2.- Obtención y genotipado de los ratones Ela1-tPA

Los ratones transgénicos se generaron mediante inyección del fragmento purificado de Ela1-htPA- β globina en el núcleo de cigotos híbridos C57Bl/6-DBA/2 F₂ mediante técnicas convencionales (*Manipulating the Mouse embryo: A Laboratory Manual*, 1994).

Se utilizaron 15 hembras para transferir los embriones inyectados y 9 resultaron gestantes. Se obtuvieron 78 animales que fueron analizados por *Southern-blot* para detectar la integración del cDNA del tPA y 9 resultaron ser transgénicos.

4.2.1- Southern-blot

El DNA extraído de la cola de los ratones (10 μ g) (ver Apartado 1.2) se digirió con el enzima Xba I y se fraccionó en un gel de agarosa al 0,8 %. Después de transferir a una membrana de nylon, se hibridó con la sonda de cDNA Ela1-htPA- β globina marcada con ³²P en solución de hibridación (50% de formamida, 1% SDS, SSC 5x, Denhardt 5x, Tris pH 7,5 10 mM, sulfato de dextrano 10%) durante toda la noche a 42 °C. A continuación se lavó la membrana dos veces 20 min con SSC 0,2x, SDS 1% a 60 °C y se analizó por autorradiografía.

4.2.2.- Análisis de la progenie mediante PCR

De los 9 animales transgénicos obtenidos se seleccionaron 4 líneas fundadoras que habían integrado el transgén en la línea germinal: Ela1-tPA 273, Ela1-tPA 275, Ela1-tPA 280 y Ela1-tPA 281. Los machos de estas líneas, de fondo genético C57Bl/6-DBA2, se cruzaron con hembras salvajes C57Bl/6 y la descendencia se genotipó mediante PCR a partir de DNA genómico de la cola de ratón (ver Apartado 1.2). Para ello, se usaron los oligonucleótidos 5'-GCT GGG AAG TGC TGT GAA ATA G3' (*sentido*) y 5'-GTA AAT GTT GTG ATG TGC AG-3' (*antisentido*), que permiten amplificar un fragmento de 1,1 Kb (de los nucleótidos 420-1519) de la secuencia del tPA humano. Las condiciones de PCR fueron las mismas a las anteriormente descritas para Ela1-myc (ver apartado 1.2) pero utilizando una temperatura de *annealing* de 55 °C. Los animales se mantuvieron en condiciones de estabulación controladas libres de patógenos

4.3.- Análisis de la expresión de tPA en el transgénico Ela1-tPA mediante RT-PCR

Para determinar la expresión del mRNA de tPA en las diferentes líneas transgénicas se extrajo RNA de tejido pancreático mediante el siguiente protocolo.

La porción del páncreas recién extraído destinada a este análisis se seccionaba en fragmentos de 0,5 cm de tamaño y se trataba con una solución acuosa que protege de la degradación del RNA (RNA later™, Ambion®). Se añadían 5 volúmenes/pieza y se guardaba 24 h a 4 °C. Posteriormente, el tejido se sumergía en Trizol™ (Life Technologies) para ser homogeneizado (con un *Polytron*). Dicho reactivo contiene isocianato de guanidina-fenol en una sola fase y permite hacer la extracción de RNA con un protocolo mejorado al desarrollado por Chomczynski y col. (1987). Finalizada la extracción según las indicaciones de la casa comercial, se comprobó la calidad y cantidad del RNA mediante un gel de agarosa al 1% con H₂O DEPC y la lectura de la densidad óptica (λ : 260nm). Finalmente, el RNA se conservó alicuotado a -80 °C hasta el momento de utilizarlo. A continuación se realizó RT-PCR a partir de 0,4-0,6 µg de RNA utilizando los cebadores (*htPA-RT1*: 5'-GTC TTC GTT TCG CCC AGC CAG-3' y *htPA-RT2*: 5'-CTG TGC TGT GTA AAC CTT GCC-3'). Los procesos de retrotranscripción y amplificación por PCR se realizaron en un solo paso de manera similar a la descrita en el Apartado 4.1.1.

4.4.- Análisis histológico del páncreas de los ratones Ela1-tPA.

Para el análisis histológico se sacrificaron animales heterocigotos a determinados tiempos (3, 6, 9 y 12 meses de edad), momento en el que se hacía la autopsia y extracción del páncreas. Tras observar las características macroscópicas (tamaño, color y consistencia) el páncreas se introducía en formol 10% durante 24 h. Posteriormente, el tejido se deshidrató e incluyó en parafina como se ha descrito previamente (Apartado 3.1.1). A partir de los bloques de parafina se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor que, tras desparafinar, hidratar y teñir con hematoxilina-eosina, se observaron a diferentes aumentos (10, 40 y 100x). Posteriormente se realizó el estudio histopatológico.

4.5.- Análisis de expresión génica diferencial entre los ratones transgénicos Ela1-tPA y ratones control (Microarrays)

Los ratones transgénicos Ela1-tPA fueron utilizados para estudios de expresión génica diferencial mediante *microarrays* utilizando hermanos de camada no transgénicos como control. Los *microarrays* utilizados y el protocolo utilizado fueron similares a los descritos en el Apartado 3.4 con las siguientes modificaciones:

4.5.1.- Obtención, amplificación y marcaje del RNA

Extracción del RNA

El RNA se obtuvo a partir del páncreas de 3 ratones Ela1-tPA de dos meses de edad y de los correspondientes controles no transgénicos de la misma edad. El tejido se trató con RNA later™ (Ambion®) durante 24 h a 4°C y seguidamente se realizó la extracción de RNA con Trizol™ siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 4.3.

Marcaje del RNA con NHS-Cy

Para uno de los experimentos cada muestra del grupo control (ratón no transgénico) se marcó y con el fluorocromo Cy-3 y las muestras del grupo problema (Ela1-tPA) se marcaron con el reactivo fluorescente Cy-5 (rojo) (Amersham Biosciences). En el segundo experimento, se realizó el marcaje inverso. En todos los casos, éste se realizó mediante el proceso de transcripción reversa descrito en el Apartado 3.4.1.

4.5.2.- Prehibridación e hibridación

La solución de prehibridación se realizó con SSC 3x, formamida 10%, BSA 1%, SDS 0,5%, y la de hibridación añadiendo SSC 3x, formamida 10%, poli-A, tRNA, ssDNA, SDS 0,5%. Después del proceso de hibridación realizado en la máquina, los lavados consistieron en 5 ciclos de 1 min cada uno con SSC 2x, SDS 0,1% a 30 °C, seguidos de otro lavado con SSC 1x 5 ciclos de 1 min a 30 °C y uno final con *Tween* 0,05% en PBS 1x 1 ciclo de 3 min a 25 °C. Finalmente se lavaron los soportes igual con *Tween* 0,2% en PBS 1x 5 min como se describe en el Apartado 3.4.2.

4.5.3. Exploración de las imágenes y análisis

El análisis de las imágenes se realizó de la misma forma que se describe en el Apartado 3.4.3 aunque con diferencias en los filtros de selección. Dado que en este caso el análisis se hizo por triplicado, se añadió el criterio de selección que aceptaba sólo los genes que cumplieran el criterio de señal/fondo > 3 como mínimo en dos de las tres réplicas independientes. Por otro lado, se seleccionaron los genes que presentaban una desviación estándar de la media problema/control inferior al 30 % del valor de ésta. En la Tabla 6 de los

Resultados, se incluyen aquellos genes en los que la media de la señal problema/control $\geq 1,5$ (inducidos) y $\leq 0,6$ (inhibidos).

4.6.- Construcción del plásmido citoqueratina19-htPA-b-globina-Bluescript

4.6.1.- Clonaje del tPA humano

El cDNA del tPA humano, obtenido mediante la amplificación por RT-PCR del RNA extraído de las células SK-PC-1, se clonó en el plásmido pBluescript mediante digestión XbaI/BamH1 como se describe en el Apartado 4.1.2.

4.6.2- Construcción del plásmido CK19-htPA-b-globina-Bluescript

Una vez clonado el tPA en el vector pBluescript, se insertó un fragmento de 2,050 Kb del promotor CK19 de ratón, el cual se encontraba en el plásmido K19-beta-galactosidasa que fue por el Dr. A.K. Rustgi (*Department of Medicine, Gastroenterology Division, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, EEUU*). Dicho promotor se clonó en pBS-htPA digiriendo con BamH I (pBS-CK19-htPA).

Una vez introducido el promotor, se procedió a la integración del fragmento de 1,2 Kb del gen de la β -globina de conejo (ver Apartado 4.1.3). Las enzimas para digerir y obtener extremos cohesivos eran incompatibles, por ello se hizo una primera digestión del vector pBS-CK19-htPA con Not I, y de la construcción conteniendo β -globina con Sal I (extremo 3') y posteriormente se rellenó en ambos casos con la enzima Klenow y se digirieron con Xba I como se describe para la construcción elastasa1-htPA- β -globina-Bluescript (ver Apartado 4.1.3). La construcción final, pBS-CK19-htPA- β globina, de 7,95 Kb, también se envió al laboratorio del Dr. Ángel Ramírez, donde se han llevado a cabo las microinyecciones para la producción de los ratones transgénicos.

4.7.- Obtención y genotipado de los ratones Ela1-tPA

Los ratones transgénicos se generaron mediante inyección del fragmento purificado de CK19-htPA- β globina en el núcleo de cigotos híbridos C57Bl/6-DBA/2 F2 mediante técnicas convencionales (Manipulating the Mouse embryo: A Laboratory Manual, 1994).

Se utilizaron 10 hembras para transferir los embriones inyectados y 9 resultaron gestantes. Se obtuvieron 60 animales cuyo DNA fue analizado por *Southern-blot* para detectar la integración del cDNA del tPA y 3 resultaron ser transgénicos.

4.7.1.- Southern-blot

El DNA extraído de la cola de los ratones (10 µg) (ver Apartado 1.2) se digirió con el enzima Xba I y se fraccionó en un de agarosa al 0,8 %. Después de transferir a una membrana de *nylon*, se hibridó con la sonda de cDNA CK19-htPA-βglobina siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 4.2.

4.7.2.- Análisis de la progenie mediante PCR

Se obtuvieron 3 ratones que habían integrado el transgén en la línea germinal a partir de los cuales tenemos tres líneas fundadoras: CK19-tPA 832, 833 y 885. Los machos de estas líneas, de fondo genético C57Bl/6-DBA2, se cruzaron con hembras salvajes C57Bl/6 y la descendencia se genotipó mediante PCR (ver Apartado 4.2) a partir de DNA genómico de la cola de ratón (ver Apartado 1.2). Los animales se mantuvieron en condiciones de estabulación controladas libres de patógenos.

RESULTADOS**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE tPA EN MODELOS MURINOS DE TUMORIGÉNESIS PANCREÁTICA.****1.- Estudio de la expresión de tPA durante la progresión tumoral pancreática murina.**

En el momento de iniciar este estudio, el patrón de expresión de tPA en tejidos de ratón había sido muy pobremente caracterizado debido a que la mayoría de anticuerpos disponibles han sido producidos contra el tPA humano y no reconocen la proteína de ratón. Tras probar diferentes condiciones, conseguimos optimizar la técnica para detectar el tPA murino en secciones de parafina, utilizando un anticuerpo policlonal altamente específico. Para demostrar la especificidad del anticuerpo utilizamos tejidos de ratones salvajes y ratones *knock out* tPA *-/-* o uPA *-/-*. Por otro lado, escogimos el pulmón normal como control positivo debido a ser un órgano muy vascularizado y aprovechando el hecho que las células endoteliales expresan una elevada cantidad de tPA (Paciucci R., Tora M. y col., 1998).

La Figura 1 muestra la reactividad del anticuerpo anti-tPA en secciones de pulmón y páncreas normal correspondientes a ratones salvajes (paneles a, d), deficientes en tPA (tPA^{-/-}, paneles b, e) y deficientes en uPA (uPA^{-/-}, paneles c, f). Cuando analizamos la expresión de tPA en el pulmón normal, observamos una elevada expresión de la proteína en las células endoteliales de los ratones salvajes y uPA *-/-* (Figura 1 paneles a, c, flechas). Por el contrario, no se detectó expresión de tPA en los vasos del pulmón correspondiente al ratón tPA^{-/-} (panel 1b, flecha), confirmando la especificidad del anticuerpo.

Cuando se hizo el mismo estudio inmunohistoquímico en el páncreas, no se detectó expresión de tPA en células acinares ni ductales (paneles d-f) indicando que, al igual que se describió en tejidos humanos (Paciucci R., Tora M. y col., 1998), el tPA es indetectable en las células epiteliales del páncreas exocrino normal murino.

Una vez caracterizado el anticuerpo en el tejido normal nos interesaba saber cual era el patrón de expresión del tPA en los modelos murinos de cáncer de páncreas. Para ello utilizamos ratones transgénicos que desarrollan tumores exocrinos pancreáticos mediante la introducción de un oncogén (fragmento 1-127 del antígeno T del virus SV40 o el oncogén *c-myc*) bajo un promotor específico de células acinares (elastasa 1): Ela1-TAg y Ela1-myc respectivamente. Para estudiar tal expresión, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica a diferentes estadios de la progresión tumoral (1, 3 y 5 meses de edad). De acuerdo con los datos descritos previamente (Tevethia M.J., Bonneau R.H. y col., 1997), los ratones transgénicos Ela1-TAg desarrollan nódulos preneoplásicos caracterizados por la displasia acinar que, en algunos casos, progresa a carcinomas acinares con grados variables de diferenciación, como se puede observar en la Figura 2.

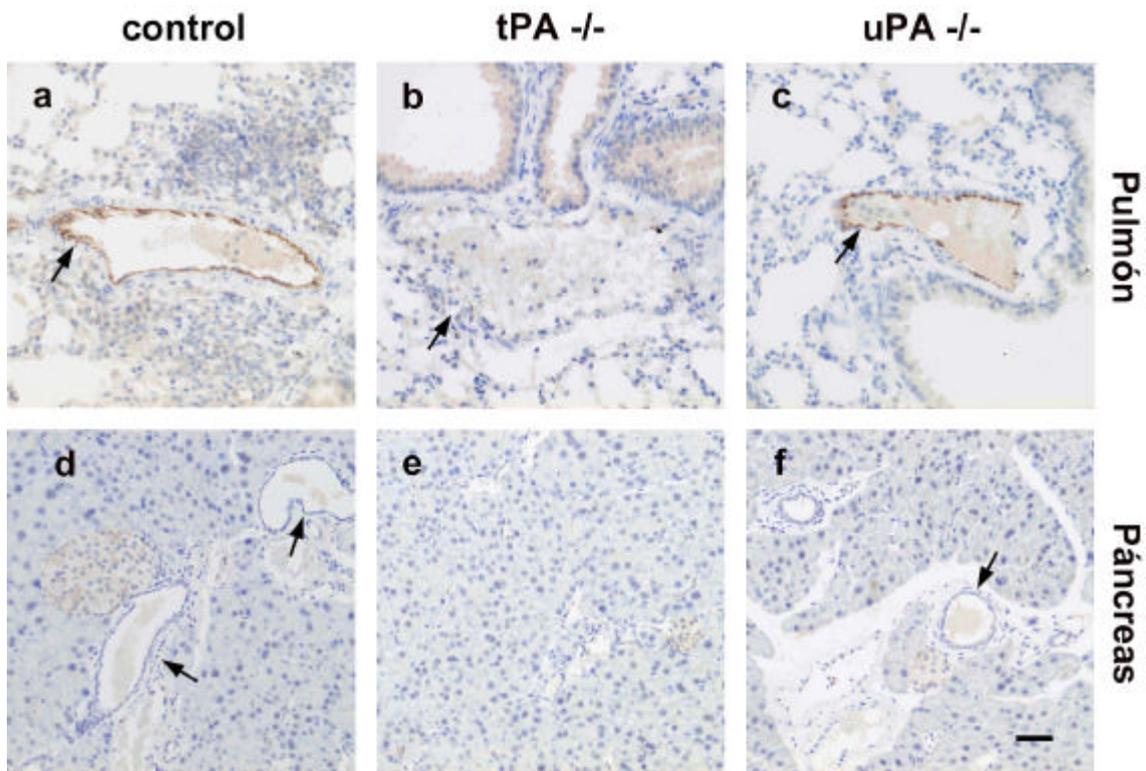


Figura 1. Inmunotinción de tPA en pulmón y páncreas de ratones controles (silvestres) y deficientes en tPA (tPA^{-/-}) y uPA (uPA^{-/-}).

El anticuerpo anti-tPA presenta una elevada reactividad en las células endoteliales vasculares en el pulmón de los ratones salvajes (control) y uPA^{-/-} (paneles a, c, flechas) pero no en las células de los ratones tPA^{-/-} (panel b, flecha). En el páncreas, la expresión de tPA es indetectable en las células acinares y ductales (paneles d, f, flechas). Barra: 50 μ m.

Los paneles 2a y 2b corresponden a estadios iniciales de la progresión tumoral mientras que el panel 2c muestra un carcinoma en estado avanzado. En los ratones Ela1-TAg no se detectó el tPA en células epiteliales en ninguna de las muestras analizadas, que incluía 14 tumores acinares, indicando que esta proteasa no se expresa en el curso de la progresión neoplásica con diferenciación acinar (Figura 2, paneles a-c, e inserto).

Por otro lado, los ratones transgénicos Ela1-myc se caracterizan por desarrollar tumores acinares que progresan y adquieren un fenotipo ductal en el 50% de los casos aproximadamente (Sandgren E.P., Quaife C.J. y col., 1991). Los resultados obtenidos a partir de estudios histológicos confirman tales observaciones (Tabla 1 y Figura 2). El páncreas de los ratones jóvenes presenta hiperplasia y displasia de las células acinares (panel 2d) que progresa hacia carcinomas acinares con una morfología similar a la de los tumores de los ratones Ela1-TAg. Adicionalmente, cerca de la mitad de los tumores de ratones de edad avanzada presentaban áreas de diferenciación ductal adyacentes a zonas de diferenciación acinar, y que iban asociadas a una elevada cantidad de desmoplasia. En ninguno de los casos en los que se observaban áreas de displasia de células acinares y tumores con fenotipo acinar

(6 casos) o indiferenciado (2 casos) se detectó expresión de tPA (paneles 2d y 2e). Por otro lado, 6 tumores de los 14 estudiados mostraban áreas de diferenciación ductal (panel 2f, ángulo superior izquierdo) adyacentes a zonas de células tumorales de tipo acinar. En todos estos casos se detectó la expresión de tPA exclusivamente en las zonas tumorales donde existía diferenciación ductal (panel 2f, cabeza de flecha e inserto), siendo indetectable en las áreas con fenotipo acinar. Esta diferencia de expresión de tPA entre los tumores con morfología ductal y acinar es estadísticamente significativa ($p=0.002$).

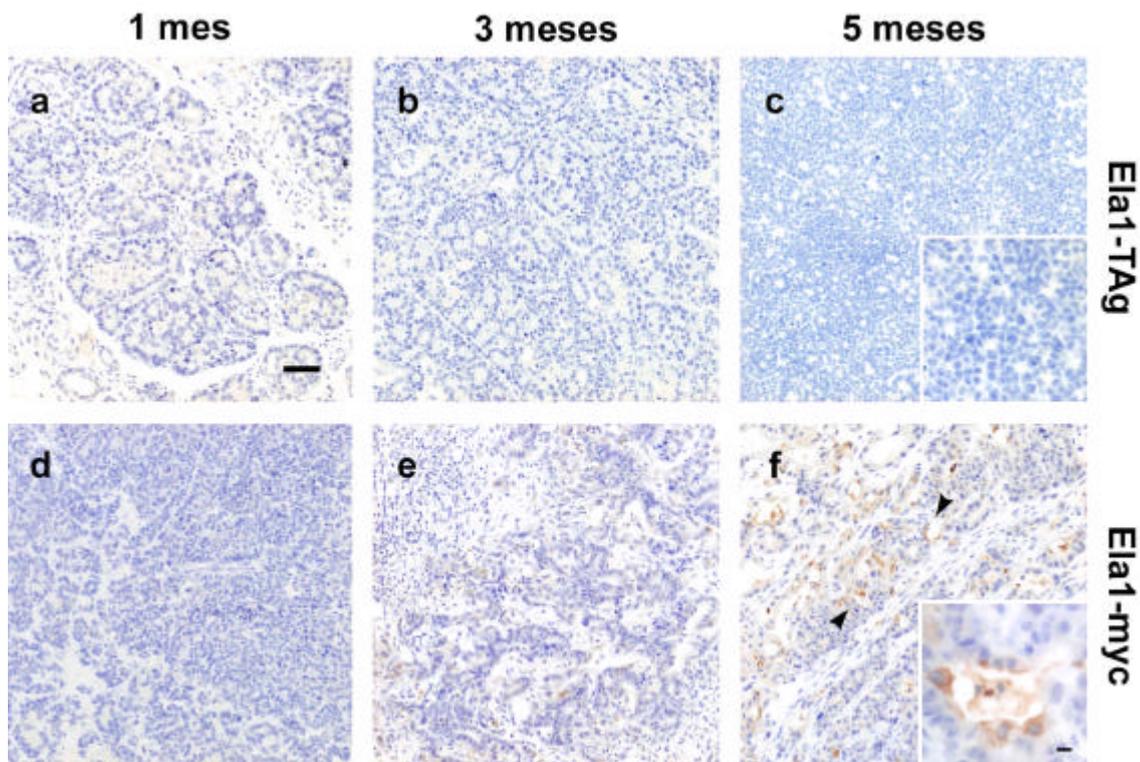


Figura 2. Análisis histológico y expresión de tPA en tumores pancreáticos de ratones transgénicos Ela1-TAg y Ela1-myc.

Secciones de 5 μm de muestras incluidas en parafina a partir de tumores de páncreas de ratones de 1 mes (a, d), 3 meses (b, e) y 5 meses (c, f) de ratones transgénicos Ela1-TAg (a, b, c) y Ela1-myc (d, e, f). Tras la inmunotinción con el anticuerpo anti-tPA (ver materiales y métodos), se contrastó con hematoxilina para el análisis histopatológico. La expresión de tPA está restringida a las células ductales de tumores de estadios tardíos de los ratones Ela1-myc (panel f, cabezas de flechas e inserto). No se observó reactividad en los acinos displásicos (paneles a, d) ni en las células tumorales acinares de los dos modelos de ratones transgénicos (paneles b, c e inserto de los paneles e y f). Barra: 25 μm (a-f), 40 μm (inserto de los paneles c y f).

Para determinar si la activación de la expresión de tPA estaba asociada a la diferenciación ductal o específicamente al proceso de transformación neoplásica, se examinó la expresión de la proteasa en los complejos ductales característicos de la pancreatitis crónica obstructiva, patología asociada frecuentemente al carcinoma pancreático y que se origina por la obstrucción del conducto pancreático principal. El estudio de los ductos metaplásicos no tumorales en el páncreas de los ratones Ela1-TAg y Ela1-myc reveló una ausencia completa de expresión de tPA (Figura 3, panel a), de la misma forma que sucede en las células de los ductos normales (ver Figura 1, panel e). Para confirmar estos resultados, se analizó la expresión de tPA en el páncreas de ratones transgénicos Ela1-CCK2 (Saillan-Barreau C., Clerc P. y col., 1998) y MT-TGF α . Los ratones Ela1-CCK2 se caracterizan por sobreexpresar el receptor CCK2 de colecistoquinina/gastrina en las células acinares, provocando un estímulo del crecimiento pancreático, hipertrofia de células acinares y, en una pequeña proporción de los casos, progresión tumoral pancreática (Clerc P., Leung-Theung-Long S. y col., 2002). Los estudios de inmunolocalización sobre el páncreas de estos ratones indican que el tPA es indetectable en los tumores acinares que aparecen en estos animales (no mostrado) así como en los complejos ductales metaplásicos no tumorales (panel 3b).

Por otro lado, los ratones transgénicos MT-TGF α se caracterizan por sobreexpresar TGF α bajo el promotor de metalotioneina-I (MT), inducible por Zn²⁺. Dicha expresión induce en el páncreas una transdiferenciación acinar-ductal de forma masiva (Sandgren E.P., Luetteke N.C. y col., 1990). El estudio inmunohistoquímico del páncreas de estos animales, reveló que, a diferencia de la elevada expresión de tPA en el endotelio de los vasos (panel 3c, cabeza de flecha), había una ausencia total de expresión de la proteína en los complejos ductales no neoplásicos. Así pues, los resultados descritos confirman que la expresión del tPA en el páncreas murino está asociada exclusivamente a las células ductales con características neoplásicas, presentando una distribución similar a la descrita en los tumores pancreáticos exocrinos en humanos (Paciucci R., Tora M. y col., 1998).

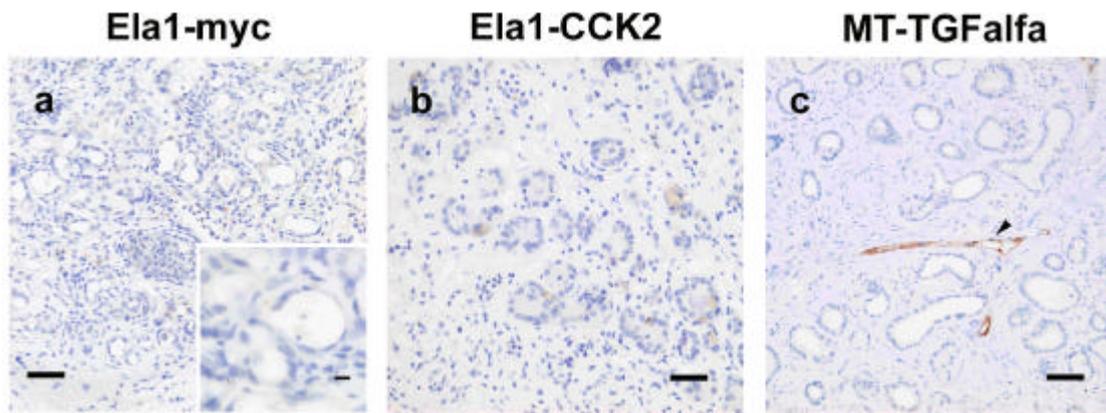


Figura 3. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de tPA en complejos ductales no neoplásicos de ratones transgénicos Ela1-myc, Ela1-CCK2 y MT-TGF α .

Inmunodetección de tPA en secciones de tumor de ratones Ela1-myc (panel a) y páncreas no tumoral de ratones Ela1-CCK2 y MT-TGF α (paneles b, c) que contienen complejos ductales no neoplásicos. El tPA es indetectable en los complejos ductales (paneles a-c e inserto del panel a) pero está presente en las células endoteliales (panel c, flecha). Barra: 50 μ m (a, b), 25 μ m (c), 40 μ m (inserto del panel a).

2.- Expresión del receptor de tPA, anexina A2, en páncreas normal y tumores pancreáticos murinos

Como se mencionó en la introducción, se ha sugerido que algunas de las funciones del tPA pueden ser mediadas por su unión a receptores celulares. Así, en el caso de las células endoteliales, la unión del tPA a su receptor, anexina A2, aumenta dramáticamente su eficiencia catalítica en la generación de plasmina (Hajjar K.A., 1995; Redlitz A. y Plow E.F. 1995) y potencia, por tanto, la actividad fibrinolítica. Trabajos de nuestro laboratorio y de otros grupos, han mostrado que la anexina A2 (Anx2) también se sobreexpresa en tumores pancreáticos (Paciucci R., Tora M. y col., 1998; Vishwanatha J.K., Chiang Y., y col., 1993), sugiriendo un posible papel como receptor de tPA en este cáncer. En este sentido, resultados recientes en nuestro laboratorio apoyan la hipótesis de que la AnxA2 puede actuar como receptor del tPA en adenocarcinomas ductales pancreáticos humanos (Peiró S y col., en revisión) mediando efectos funcionales como su actividad proliferativa.

A la vista de los resultados obtenidos en tejidos humanos, nos propusimos estudiar el patrón de expresión de la AnxA2 en el páncreas normal de ratón así como en los tumores pancreáticos que desarrollan los ratones Ela1-TAg y Ela1-myc. Para la inmunotinción se ha utilizado un antisuero generado en nuestro laboratorio mediante la inmunización de conejos con AnxA2 recombinante humana purificada (véase Materiales y Métodos). Como control se utilizó el suero preinmune (Figura 4, panel a). Cuando estudiamos la expresión de AnxA2 en el páncreas normal, observamos niveles indetectables de la proteína en las células acinares normales y una leve-moderada expresión en las células ductales normales (panel 4b). La especificidad del anticuerpo se refleja en la tinción observada en las células endoteliales que, como se ha mencionado anteriormente, expresan altos niveles de AnxA2. Cuando se analizó la

expresión de AnxA2 en tumores, se observó que en los tumores de tipo acinar de ratones Ela1-TAg (n=12) no había expresión de la proteína (panel 4c, e inserto). Sin embargo, en los adenocarcinomas desarrollados por los ratones Ela1-myc, aunque tampoco había expresión de AnxA2 en el componente acinar, la proteína estaba expresada a niveles altos en las células ductales tumorales (6/6, $p < 0.001$) (panel 4d). Cuando se estudió en detalle la distribución de AnxA2 en los ductos neoplásicos se observó, además, una pérdida de polarización de la expresión en las células de los ductos tumorales (panel 4d, inserto) encontrándose distribuida por toda la superficie celular, en contraste con la distribución apical en la membrana de las células ductales normales (panel 4a, inserto).

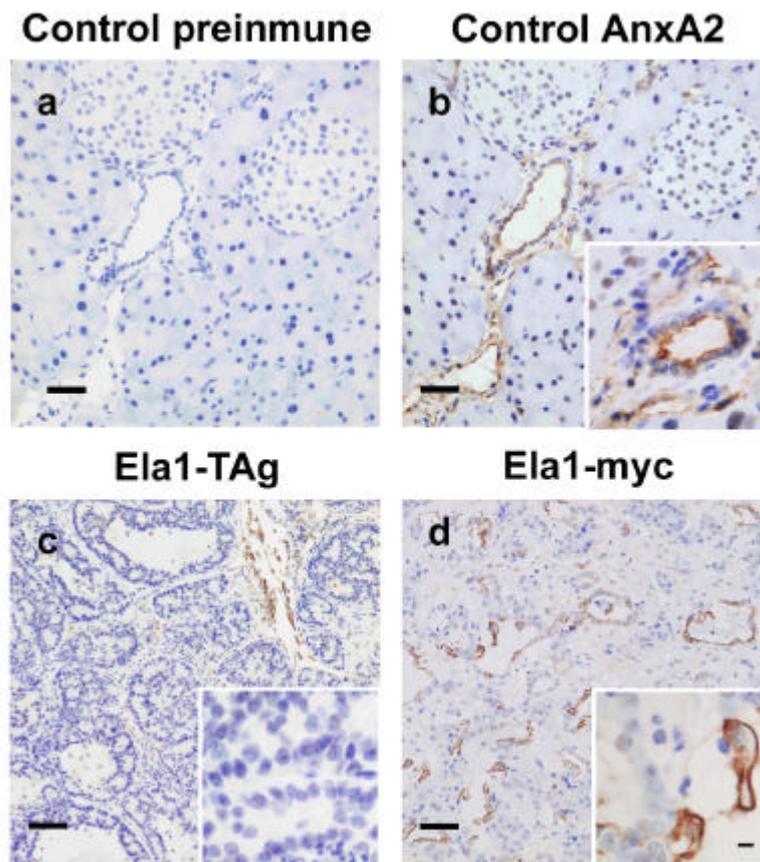


Figura 4. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de anexina A2 en tumores de ratones transgénicos Ela1-TAg y Ela1-myc.

Las secciones del tejido pancreático incluido en parafina se analizaron para la expresión de anexina A2 según Materiales y Métodos. Los paneles a, b corresponden a secciones de páncreas normal de un ratón salvaje C57Bl/6. Se muestra también, la sección de un tumor acinar de un ratón Ela1-TAg de 5 meses de edad (c) y el componente ductal de un carcinoma mixto acinar-ductal de un ratón Ela1-myc de 5 meses de edad (d). Panel a: suero preinmune; paneles b-d: suero anti-AnxA2. Se detecta expresión de AnxA2 con distribución apical en las células ductales normales (panel b, inserto) pero es indetectable en células acinares normales (b) y en los tumores acinares (c). En las células tumorales con fenotipo ductal, se detecta una elevada y despolarizada expresión de AnxA2 (panel d e inserto). También se detecta AnxA2 en las células del estroma (b, c). Barra: 50 μm (a, b); 25 μm (c, d), 40 μm (inserto de los paneles b-d).

Con el objetivo de determinar si el aumento de la expresión de AnxA2 estaba asociado a la diferenciación ductal o a la transformación neoplásica, estudiamos los complejos ductales no neoplásicos en el páncreas de ratones Ela1-TAg, Ela1-myc y MT-TGF α . En los tumores Ela1-myc se detectó AnxA2 en los complejos ductales normales (Figura 5, panel a) y en las áreas de transdiferenciación ductal (inserto panel 5a), manteniendo una distribución apical. La misma distribución se observaba en las lesiones ductales obstructivas en los tumores Ela1-TAg (no mostrado). Por otro lado, se observó una elevada expresión de AnxA2, también con distribución apical, en los complejos ductales no neoplásicos (panel 5b) y en las zonas de metaplasia acinar-ductal (inserto, panel 5b) del páncreas de los ratones MT-TGF α (n=7). En estos ratones, AnxA2 era indetectable en las células que mantenían diferenciación acinar en las estructuras metaplásicas. Tampoco se observó expresión en los ratones control inducidos con Zn²⁺. Estos resultados indican que la sobreexpresión de AnxA2 no está asociada exclusivamente al fenotipo neoplásico aunque sí hay una diferencia en el patrón de expresión de la proteína en los ductos neoplásicos respecto a los que no lo son, mostrándose despolarizada sólo en los primeros.

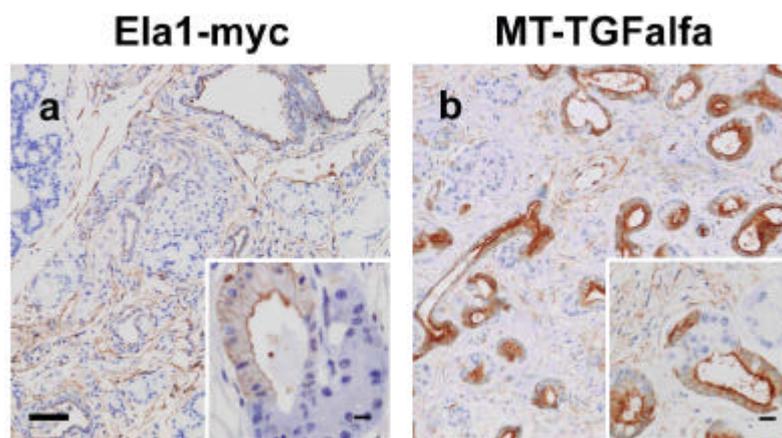


Figura 5. Análisis de la expresión de anexina A2 en complejos ductales no neoplásicos y metaplasia.

Se utilizaron secciones de tejidos en parafina de ratones Ela1-myc (a) y MT-TGF α (b) para estudiar la expresión de AnxA2 en los complejos ductales no neoplásicos y metaplasia acinar ductal (insertos de los paneles a, b). AnxA2 se expresa en los complejos ductales no tumorales en los dos modelos de ratones transgénicos (paneles a, b). Los insertos de los paneles a y b muestran la fuerte expresión de AnxA2, con distribución apical, en las áreas de diferenciación ductal y la ausencia de expresión en las áreas con diferenciación acinar. Barra: 25 μ m (a, b), 20 μ m (inserto panel a), 40 μ m (inserto panel b).

3.- Efecto de la ausencia de tPA en la tumorigénesis pancreática murina.

Con el fin de analizar en mayor detalle el papel de tPA en la progresión tumoral pancreática murina *in vivo*, generamos ratones híbridos mediante cruzamiento de los modelos ya mencionados Ela1-TAg y Ela1-myc y ratones *Knock out* para tPA (tPA^{-/-}) (Carmeliet P., Schoonjans L. y col., 1994). De este modo pretendíamos analizar como la falta de tPA podía afectar al desarrollo de los tumores pancreáticos de dichos animales.

3.1.- Cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-TAg y ratones KO tPA^{-/-}

El objetivo era generar ratones híbridos Ela1-TAg:tPA^{-/-} mediante el cruzamiento de los dos genotipos correspondientes y analizar así el efecto de la ausencia de tPA en los tumores a nivel histológico y en la supervivencia de los animales. En la generación F1 obtenida (Ela1-TAg:tPA^{+/-}) no se observó ningún cambio en la histología tumoral ni en la supervivencia. El análisis estadístico de esta última mostró una vida media de 170 días en los animales Ela1-TAg (n=47) y de 175 en los híbridos Ela1-TAg:tPA^{+/-} (n=12), no siendo la diferencia estadísticamente significativa (p=0.462, test de log-rank) (Figura 6). Dado que en los animales F1 sólo hay pérdida parcial de la expresión de tPA (son tPA^{+/-}), para determinar si realmente la ausencia de tPA puede modificar la progresión tumoral era necesario analizar la progenie F2, Ela1-TAg:tPA^{-/-}. Sin embargo, cuando se iniciaron estos estudios no teníamos evidencias de la expresión de tPA en los tumores Ela1-TAg. Paralelamente al curso de estos experimentos *in vivo*, se analizó dicha expresión (ver Apartado 1) observándose que por ser tumores exclusivamente de tipo acinar, las células no presentaban expresión de tPA. Por esta razón, y dada la laboriosidad de estos abordajes *in vivo*, no tenía sentido proseguir con la generación de ratones F2 y nos centramos en el modelo Ela1-myc, como se describe a continuación.

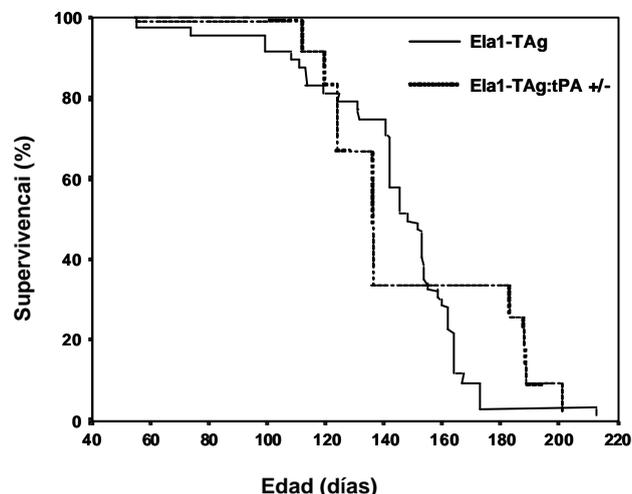


Figura 6. Efecto de la mutación parcial de tPA en la supervivencia de los ratones transgénicos Ela1-TAg.

Comparación de la supervivencia de los ratones Ela1-TAg y Ela1-TAg:tPA^{+/-} utilizando el método de Kaplan-Meier.

3.2.- Cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-myc y ratones KO tPA-/-

Hemos comparado a nivel histológico y de supervivencia los ratones transgénicos Ela1-myc y los híbridos generados mediante su cruzamiento con animales KO tPA-/-, tanto la F1 (Ela1-myc tPA+/-) como la F2 (Ela1-myc tPA-/-). Al nivel histológico, tal y como se observa en la Figura 7 y en la Tabla 1, no se apreciaron diferencias en la progresión tumoral en el páncreas de los ratones Ela1-myc:tPA-/- respecto los animales Ela1-myc. El páncreas de los ratones jóvenes Ela1-myc:tPA-/- presenta displasia acinar (Figura 7, paneles a, b) que evoluciona a tumores con fenotipo acinar puro (panel 7c más inserto) y que, en aproximadamente la mitad de los casos, se diferencian a carcinomas pancreáticos mixtos acinar/ductal (inserto panel 7d). En estos tumores, se pueden distinguir amplias zonas de diferenciación ductal en las que se observan zonas de metaplasia acinar-ductal (panel 7e, flechas) y de complejos ductales (panel 7f).

La proporción de tumores que exhiben un componente puramente acinar o que presentan un componente mixto acinar/ductal es muy similar entre los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/- (55% vs 63.16%, Tabla 1). No obstante, la presencia de cuerpos apoptóticos parece más frecuente en los ratones Ela1-myc (35% vs 10.53%). Respecto a lesiones asociadas a la progresión tumoral, no existen diferencias entre los dos grupos observándose displasia celular (irregularidad celular y nuclear y pérdida de polaridad) en la totalidad de los tumores de los ratones de ambos genotipos. Además, un elevado porcentaje de los tumores de ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/- analizados (75% vs 73.68%) presentan hiperplasia, así como necrosis tisular (55% vs 63% de los tumores) (Tabla 1).

Patrón histológico (carcinoma de tipo acinar)	Ela 1-myc (n=20)	Ela1-myc:tPA-/- (n= 19)
Bien diferenciado	5 %	10.53 %
Moderado o mal diferenciado sin apoptosis	5 %	15.78 %
Moderado o mal diferenciado con apoptosis	35 %	10.53 %
Con presencia de diferenciación ductal	55 %	63.16 %
Displasia	100 %	100 %
Hiperplasia	75 %	73.68 %
Necrosis	55 %	63.16%

Tabla 1. Características histológicas de los tumores pancreáticos en los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/-.

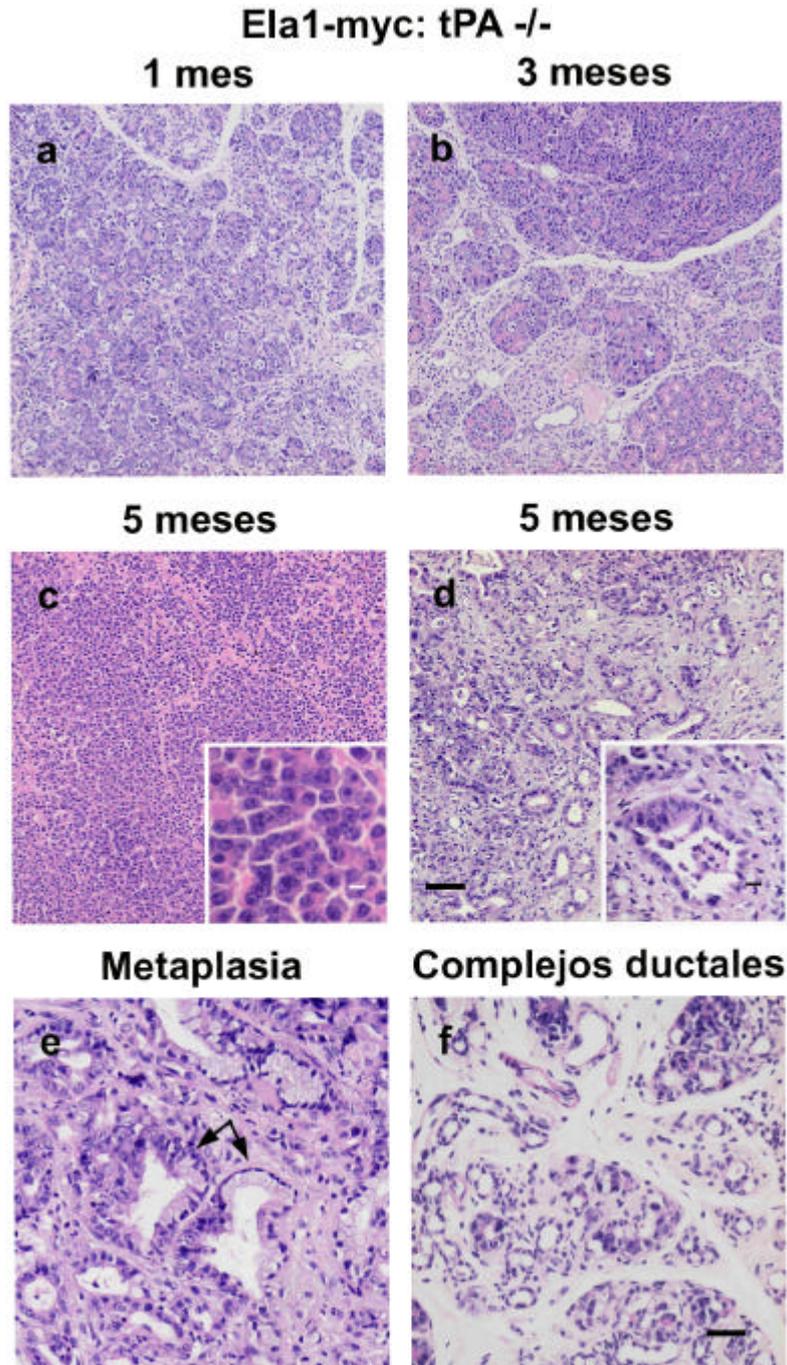


Figura 7. Análisis histológico de tumores de ratones transgénicos Ela1-myc deficientes en tPA (Ela1-myc:tPA $-/-$).

Las secciones del tejido pancreático incluido en parafina se tiñen con hematoxilina y eosina para el análisis histopatológico. El páncreas de los ratones jóvenes presenta zonas de displasia acinar diseminadas (a, b). En animales de 5 meses de edad se aprecian tumores con diferenciación acinar (panel c, inserto) y con diferenciación ductal (panel d, inserto). Los paneles c, d y los correspondientes insertos representan diferentes áreas de un mismo tumor. Los animales de 5 meses de edad presentan, además, áreas de metaplasia acinar-ductal (panel e, flechas) y zonas de complejos ductales no neoplásicos (f). Barra: 25 μ m (a-d), 50 μ m (e-f), 40 μ m (inserto del panel c), 20 μ m (inserto del panel d).

El otro parámetro analizado para determinar si la ausencia de tPA podía afectar a la progresión tumoral fue la supervivencia. Para ello utilizamos los siguientes grupos de animales: Ela1-myc (n=107), Ela1-myc:tPA+/- (n=31) y Ela1-myc:tPA-/- (n=41). Las curvas de supervivencia se estudiaron con el método estadístico de Kaplan-Meier (Figura 8 y Tabla 2). Cuando comparamos los ratones Ela1-myc con los Ela1-myc:tPA+/-, las curvas eran muy similares (Figura 8A) y no existían diferencias estadísticamente significativas (p=0.06) en la supervivencia de los ratones de ambos grupos (139 ± 2.3 vs 134 ± 1.65 días) (Tabla 2). Estos resultados indican que el diferente fondo genético de las cepas de los ratones Ela1-myc y de los Ela1-myc:tPA+/- no tiene efecto sobre la supervivencia de los animales.

Cuando comparamos los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/- se apreciaba que las gráficas se podían superponer hasta los 4 meses de edad. Sin embargo, a partir de ese momento las curvas divergían considerablemente hasta los últimos estadios de vida (Figura 8B), siendo estadísticamente significativa la diferencia de supervivencia entre los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/- (139± 2.3 vs 149± 6.7, Tabla 2). Si analizamos el porcentaje de animales que sobreviven más de 6 meses de vida, se observa que sólo un 4% de los ratones salvajes para el tPA sobreviven frente al 15 % de los ratones Ela1-myc:tPA-/. Los datos concuerdan con el hecho de que el tPA está ausente en los tumores acinares pero se expresa en todos los tumores con fenotipo ductal que aparecen en los últimos estadios de la progresión tumoral pancreática. Se utilizaron dos pruebas estadísticas para valorar la significación estadística de los resultados. Cuando utilizamos la prueba de Breslow, en la que se da más peso al inicio de la curva, no se obtuvieron diferencias significativas entre la supervivencia de los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/. Por el contrario, cuando utilizamos la prueba de log-rank la comparación de las diferencias en la supervivencia de ambos grupos fue claramente significativa (p=0.02). Esta segunda prueba es más apropiada para nuestros estudios ya que permite comparar mejor la parte final de las curvas (Peto 1984; Breslow 1984).

Genotipo	n	Supervivencia (días)*	Supervivencia (4 meses)**	Supervivencia (5 meses)**	Supervivencia (6 meses)**	P***
Ela1-myc	107	139	70 %	26 %	4 %	/
Ela1-myc:tPA +/-	31	134	71 %	19.3%	0 %	0.06
Ela1-myc:tPA -/-	41	149	73 %	46 %	15 %	0.02

Tabla 2. Análisis de la supervivencia de ratones transgénicos Ela1-myc e híbridos Ela1-myc:tPA+/- y Ela1-myc tPA-/-.

* Mediana. ** Proporción de animales vivos. *** Nivel de significación mediante el test de log-rank

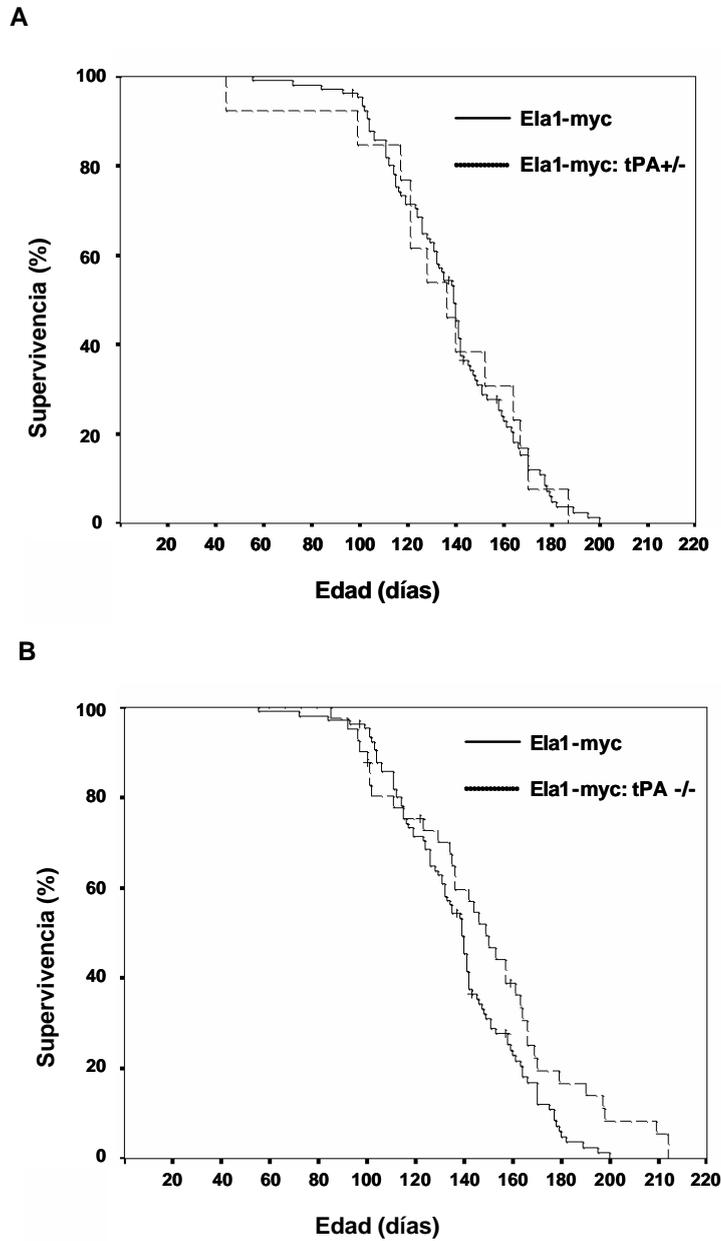


Figura 8. Efecto de la mutación de tPA completa o parcial en la supervivencia de los ratones transgénicos Ela1-myc.

A: comparación de la supervivencia de los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA+/- . B: comparación de la supervivencia de los Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/-, utilizando en ambos casos el método de Kaplan-Meier.

Para averiguar los posibles mecanismos responsables del aumento de la supervivencia en los ratones *Ela1-myc:tPA^{-/-}* respecto los ratones *Ela1-myc*, estudiamos varios parámetros implicados en el proceso tumoral: a) invasión y metástasis; b) angiogénesis y c) proliferación.

a) Invasión y metástasis

Cuando analizamos la proporción de tumores que presentaban invasión vascular o nerviosa en los dos grupos de ratones, no se detectaron diferencias significativas (Tabla 3). En el caso de la invasión ganglionar, nos encontramos con la limitación de que en gran parte de los tumores no se podían detectar los ganglios pequeños y únicamente se podía analizar la invasión ganglionar en áreas del tumor donde los ganglios eran reconocibles. A pesar de que el número de tumores analizables para este factor fue más limitado respecto al total de los ratones estudiados, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales (Tabla 3).

Tipo de invasión	<i>Ela1-myc</i> (n=18)	<i>Ela1-myc:tPA^{-/-}</i> (n=18)	P*
Invasión nerviosa	1/18	4/18	0.338
Invasión vascular	2/18	4/18	0.658
Invasión ganglionar	2/4**	6/8**	0.548

Tabla 3. Invasión nerviosa, vascular y ganglionar en los ratones *Ela1-myc* vs *Ela1-myc:tPA^{-/-}*. Proporción de ratones que presentan invasión en nervios, vasos y ganglios respecto al total de animales analizados.

* Nivel de significación utilizando el test estadístico Mann-Whitney.

** Tumores en los que se detectan ganglios

También estudiamos la presencia de metástasis en el hígado tanto de los ratones *Ela1-myc* como *Ela1-myc:tPA^{-/-}*. Los resultados obtenidos revelan que no existen diferencias en la frecuencia de aparición de las metástasis entre los dos grupos (resultados no mostrados). En relación a este hecho, está descrito que sólo uno de cada 10 animales presentan focos metastáticos en hígado o tejidos peritoneales (Sandgren E.P., Quaife C.J. y col. 1991). Por todo ello, consideramos que este estudio no permite concluir nada sobre el papel del tPA en la aparición de metástasis ya que los animales empleados no son un buen modelo para estos análisis.

b) Angiogénesis

Para determinar la angiogénesis del tumor se estudiaron marcadores de densidad vascular mediante ensayos de inmunohistoquímica y una posterior cuantificación de los vasos

positivos. Para ello, se escogieron diferentes imágenes de microscopía óptica (200x) de cada tumor en las que estuvieran igualmente representadas las zonas con diferenciación acinar y ductal (entre 6 y 10 imágenes por zona). Se utilizó un anticuerpo específico que reconoce el factor von Willebrand localizado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (ver Materiales y Métodos). Cuando se analizaron las áreas acinares y mixtas con predominio acinar (Figura 9, paneles a, b), no se observaron diferencias significativas entre los tumores Ela1-myc y Ela1-myc:tPA^{-/-} (Tabla 4). Por el contrario, en las áreas con diferenciación ductal y mixtas con predominio ductal se observó una mayor densidad de vasos en los tumores de los ratones silvestres para el tPA (Figura 9, paneles c, d y Tabla 4). Las diferencias observadas casi alcanzaron la significación estadística utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney (13.5 ± 3.1 tPA^{+/+} vs 9.3 ± 1.3 tPA^{-/-}) ($p=0.06$).

c) Proliferación

La detección y cuantificación de la proliferación celular se realizó mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo que reconoce el marcador nuclear de células proliferativas, ki-67. Los resultados obtenidos muestran una tasa de proliferación más elevada en los tumores Ela1-myc que en los Ela1-myc:tPA^{-/-}, tanto en zonas de diferenciación acinar como ductal (Figura 9, paneles e-h). No obstante, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas mediante el método de Mann-Whitney (Tabla 4).

Histología	Factor von Willebrand			Ki-67		
	Ela1-myc	Ela1-myc:tPA ^{-/-}	p*	Ela1-myc	Ela1-myc:tPA ^{-/-}	P*
Acinar + Mixto acinar	8.3 ± 5.7 (6)**	5.5 ± 1.7 (6)	0.39	37.9 ± 21.8 (6)	30.7 ± 19.1 (6)	0.31
Ductal + Mixto ductal	13.5 ± 3.1 (4)	9.3 ± 1.3 (4)	0.06	33.4 ± 12.5 (5)	22.3 ± 14.3 (4)	0.29

Tabla 4. Análisis de los marcadores de angiogénesis y proliferación en los tumores de los ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA^{-/-}.

Los resultados de vWF están expresados en número de vasos positivos/área conocida (480 x 640 μ m), y los resultados de Ki-67 se refieren al porcentaje de células inmunoreactivas respecto al total del mismo tipo celular. En ambos casos se indica la media \pm desviación estándar.

* Nivel de significación utilizando el test estadístico Mann-Whitney. ** Los números entre paréntesis indican el número total de tumores analizados.

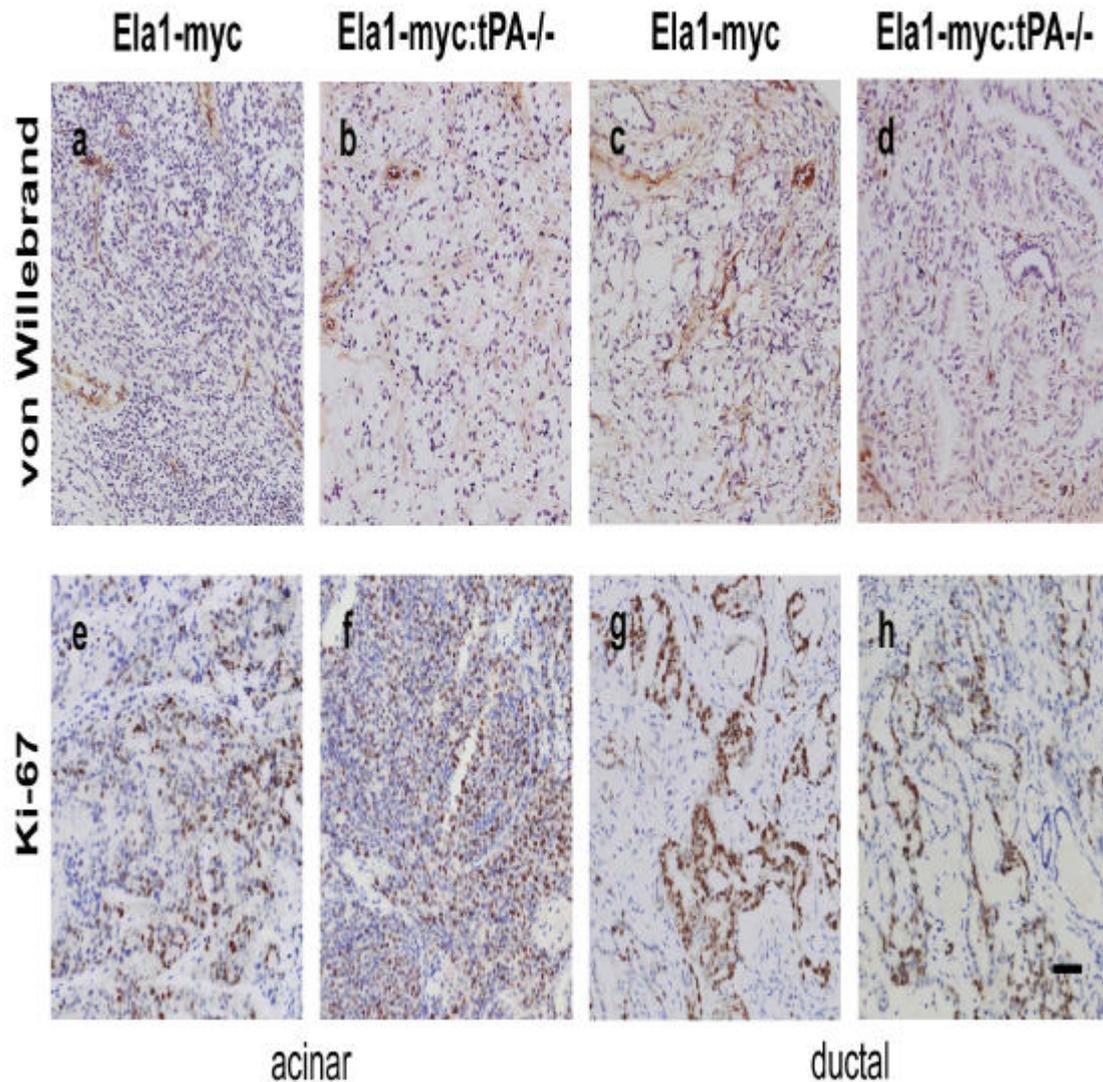


Figura 9. Análisis inmunohistoquímico de von Willebrand y Ki-67 en tumores de ratones transgénicos Ela1-myc y Ela1-myc:tPA-/-. Para el estudio de la detección del factor de von Willebrand (vWB) y Ki-67 se utilizaron secciones de tumores incluidos en parafina de ratones transgénicos mayores de 4 meses de edad Ela1-myc (a, c, e, g) y Ela1-myc:tPA-/- (b, d, f, h), que presentan zonas de diferenciación acinar (a-b; e-f) y áreas con diferenciación ductal (c-d; g-h). El estudio de vascularización se realizó calculando la densidad de vasos positivos con vWB respecto a un área conocida (480 x 640 μ m). La densidad de vasos reactivos en las zonas con diferenciación acinar fue similar para los tumores de ambos genotipos (a,b). En cambio, en las áreas de diferenciación ductal, se observa más densidad de vasos positivos para vWB en los tumores Ela1-myc (c) que en los Ela1-myc deficientes en tPA (d). Para el análisis de la proliferación se estudió la expresión de ki-67 en las células en proliferación. A nivel microscópico, no se detectaron diferencias en la cantidad de células positivas para Ki-67 respecto el número total de células, ni en las zonas con diferenciación acinar (e, f) ni en las áreas con fenotipo ductal (g, h) entre los dos grupos de ratones. Barra: 50 μ m.

4.- Análisis de expresión génica diferencial entre tumores de ratones Ela1-myc y Ela1-myc:tPA^{-/-}.

Dada la complejidad molecular que suponen los procesos tumorales, el aumento de supervivencia que observamos en los ratones Ela1-myc:tPA^{-/-} comparado con los Ela1-myc, nos hace pensar que la ausencia de tPA puede desencadenar alteraciones en otras moléculas y que el efecto sobre la supervivencia sea el resultado conjunto de todas estas modificaciones. Con este planteamiento, nos propusimos analizar, mediante la utilización de *microarrays*, las diferencias en el patrón de genes expresados entre los animales Ela1-myc:tPA^{-/-} y los animales control Ela1-myc. Como hemos visto que la expresión de tPA está restringida al componente ductal de los tumores, se utilizó esta región para la obtención de muestra mediante microdissección láser a partir de tumores de cada uno de los genotipos mencionados.

El experimento se realizó, por duplicado, a partir del RNA obtenido de dos tumores Ela1-myc:tPA^{-/-} (muestra problema) y de 1 tumor Ela1-myc (muestra control) marcados con el fluorocromo Cy-5 (rojo) e hibridados con un RNA de referencia de ratón (*Universal mouse reference RNA*, Stratagene) marcado con el fluorocromo Cy-3 (verde). En la Tabla 5 se incluyen los genes con una relación problema vs control P/C ≥ 2 (inducidos) y $\leq 0,5$ (reprimidos). Se muestran en cursiva aquellos genes posiblemente relacionados con la función del tPA en la tumorigénesis pancreática y su putativo papel se analizan en el capítulo de la Discusión.

Acceso GB	Gen	P/C
<i>Genes inducidos</i>		
	Receptor	
NM_018776	Cytokine receptor-like factor 3 (Crlf3)	2,65
	Proteasa y relacionado	
<i>NM_007969</i>	<i>Extracellular proteinase inhibitor (Expi)</i>	<i>8,15</i>
	Transcripción y relacionado	
NM_009324	T-box 2 (Tbx2)	2,06
	Otros	
AK010800	RIKEN cDNA 2410137M14 gene	2,20
BC010229	Mus musculus, Similar to guanylate nucleotide binding protein 3	2,10
NM_019998	RIKEN cDNA 1300013N08 gene	2,10
AB011678	Doublecortin	2,10
BC019405	RIKEN cDNA 2410012P20 gene	2,02
AK012642	RIKEN cDNA 2810002I04 gene	2,01

Acceso GB	Gen	P/C
<i>Genes inhibidos</i>		
Citoesqueleto/Adhesión/ECM		
NM_018764	Protocadherin 7 (Pcdh7)	0,35
NM_008729	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (Ctnnd2)	0,48
NM_015776	Microfibrillar associated protein 5 (Mfap5)	0,49
Proteasas y relacionadas		
NM_009430	Trypsin 2	0,36
NM_010810	Matrix metalloproteinase 7 (MMP7), matrilisina	0,39
NM_030127	RIKEN cDNA 9530081K03 gene	0,42
NM_008411	Integral membrane-associated protein 1 (Itmap1)	0,48
NM_008871	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (Serpine1)	0,50
Quinasas y Fosfatasas		
NM_080850	PAS domain containing serine/threonine kinase (Pask)	0,44
BC004012	Mus musculus, Similar to hypothetical protein FLJ13052, clone M	0,46
Transcripción y relacionados		
NM_008452	Kruppel-like factor 2 (lung) (Klf2)	0,49
NM_023322	Zinc finger protein 99 (Zfp99)	0,49
Otros		
BC021831	Mus musculus, clone IMAGE:3983821	0,18
AK017287	RIKEN cDNA 5430409I18 gene	0,30
AK011593	RIKEN cDNA 2610028J07 gene	0,31
BC009120	Matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein (Mglap)	0,33
NM_013558	Heat shock 70kD protein 1-like (Hspa1l)	0,37
NM_013492	Clusterin	0,37
AF147785	Zinc finger protein regulator of apoptosis and cell cycle arrest (Zac1)	0,38
NM_010745	Lymphocyte antigen 86 (Ly86)	0,40
NM_015795	F-box only protein 16 (Fbxo16)	0,43
NM_019975	2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase (Hpcl-pending)	0,45
AK002981	RIKEN cDNA 0710001P18 gene	0,47
AK016755	RIKEN cDNA 4933409I19 gene	0,47
NM_011312	S100 calcium binding protein A5 (S100a5)	0,49
NM_007769	Crp-ductin	0,49
NM_007481	ADP-ribosylation factor 6 (Arf6)	0,50

Tabla 5. Genes diferencialmente expresados en los ductos neoplásicos de los tumores de los ratones transgénicos *Ela1-myc:tPA*^{-/-} vs los *Ela1-myc*.

Relación de la muestra Problema vs Control obtenidos a partir del análisis de *microarrays*. P/C ≥ 2: genes inducidos; P/C ≤ 0,5 genes inhibidos. Acceso GB: acceso Gene Bank.

5.- Papel de otros componentes del sistema del plasminógeno en la progresión tumoral pancreática murina.

5.1.- Efecto de la ausencia de plasminógeno: cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-myc y ratones KO Plg+/-.

Como ya hemos mencionado, el papel proteolítico del tPA puede ser bien directo o bien a través de la conversión de plasminógeno a plasmina, la cual es capaz de degradar componentes de la membrana extracelular favoreciendo procesos de reorganización tisular y migración celular. Así como para uPA está bien caracterizado que su papel en la progresión tumoral es en muchos casos mediado por su actividad proteolítica directa o por activación de señales intracelulares tras la unión a su receptor (uPAR), en el caso de tPA estos procesos no están bien caracterizados. Los resultados mencionados hasta ahora indican que el tPA participa en la progresión tumoral pancreática pero no tenemos ninguna evidencia de su mecanismo de acción molecular.

Con el fin de determinar si la actividad de tPA en estos tumores estaba mediada por la generación de plasmina, decidimos obtener ratones híbridos mediante cruzamiento de los transgénicos Ela1-myc y los KO Plg+/- . En este caso fue necesario partir de los KO heterocigotos para el Plg (Plg+/-) ya que los ratones Plg-/- no son fértiles. Por esta razón, la obtención del genotipo final Ela1-myc:Plg-/- fue más prolongada que en el estudio realizado para tPA. Cuando se analizaron las curvas de supervivencia, utilizando el método de Kaplan Meier, del grupo control (Ela1-myc:Plg+/, n=8) en comparación al genotipo Ela1-myc:Plg+/- (n=13), se observó un ligero aumento de la supervivencia en los animales heterocigotos para Plg (147 ± 7.07 vs 161 ± 20.37)(Figura 10A). Sin embargo dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (log-Rank, $p=0.44$). Además, en este caso sí parece existir un efecto del diferente fondo genético de las cepas Ela1-myc control (100% C57Bl/6) y los ratones Plg+/- (75% C57Bl/6-25% SV129), ya que cuando se compara la supervivencia de los ratones Ela1-myc:Plg +/+ (n=8) con los Ela1-myc (n=107) en los hermanos de camada de la generación F1 Ela1-myc:Plg+/, también se observó un incremento de la vida mediana (147 ± 7.07 vs 139 ± 2.3)(Figura 10B). Por esta razón, los datos de los ratones Ela1-myc:Plg+/- no son concluyentes.

Además, a la vista de los resultados que hemos obtenido para tPA, seguramente es necesaria la supresión total de la proteína para observar un efecto y hasta el momento, debido a las dificultades de cría de esta colonia, disponemos sólo de 4 animales Ela1-myc:Plg-/-, un número insuficiente para poder realizar el estudio estadístico. En conjunto, nuestros resultados son demasiado preliminares para poder determinar si el papel que observamos para tPA en la progresión tumoral pancreática murina es mediado por plasmina o si es un efecto directo del

tPA. La ampliación de la colonia de animales con genotipo *Ela1-myc:Plg^{-/-}* nos permitirá establecer resultados concluyentes sobre la participación de estos mecanismos.

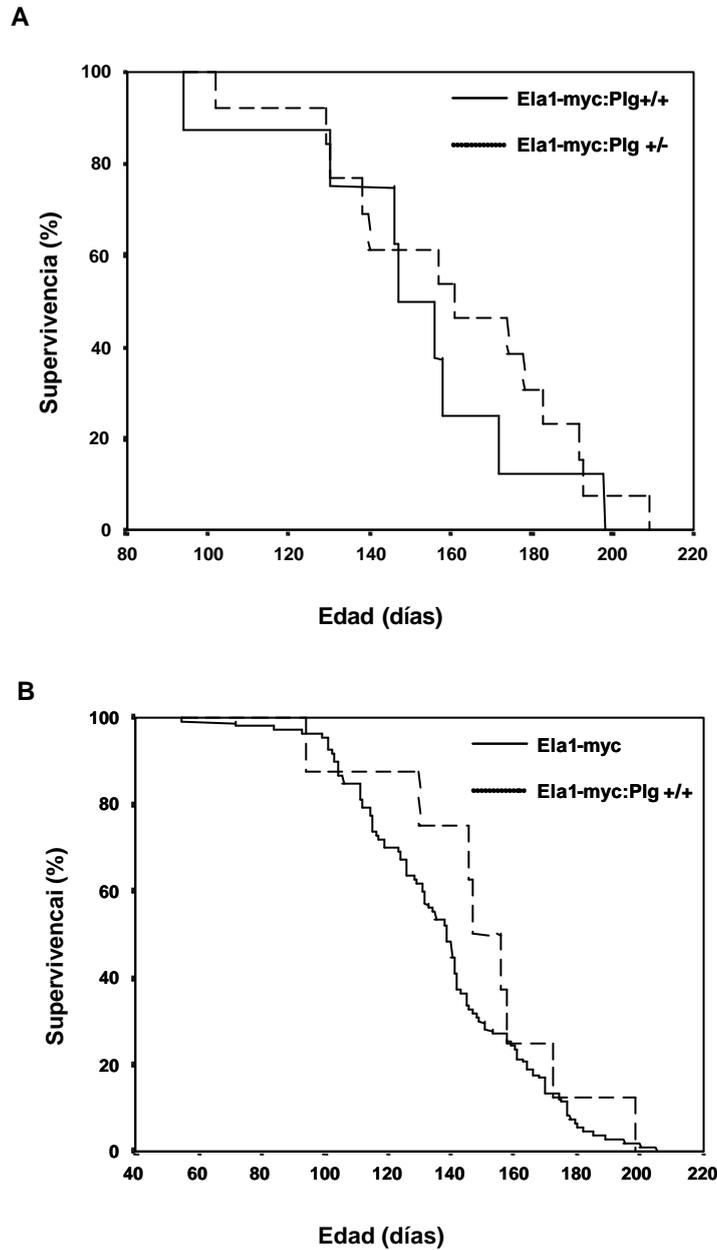


Figura 10. Análisis de supervivencia de los ratones *Ela1-myc* y *Ela1-myc:Plg^{+/-}*

A: comparación de la supervivencia de los ratones *Ela1-myc:Plg^{+/-}* y *Ela1-myc:Plg^{+/+}*. B: comparación de la supervivencia de los *Ela1-myc* y *Ela1-myc:Plg^{+/-}*, utilizando en ambos casos el método de Kaplan-Meier.

5.2.- Efecto de la ausencia de uPA: cruzamiento entre ratones transgénicos Ela1-myc y ratones KO uPA^{-/-}.

Los resultados de nuestro laboratorio han evidenciado que la expresión de uPA en el adenocarcinoma ductal pancreático humano está asociada más a las zonas de pancreatitis que al propio fenotipo tumoral. En nuestros modelos murinos, no hemos podido analizar la expresión de uPA porque, a pesar de numerosos intentos, no hemos encontrado ningún anticuerpo que reconozca la proteína de ratón. Por esta razón, no podemos descartar que esta proteasa también pueda ser importante en la progresión tumoral murina, ya que uPA juega un importante papel en numerosos procesos tumorales (ver Introducción, Apartado 4.3.1). Para estudiar este aspecto, decidimos analizar el efecto de la ausencia de esta proteína generando ratones híbridos mediante el cruzamiento de Ela1-myc y uPA^{-/-}. Al igual que hemos mencionado en el apartado anterior, la consecución del genotipo final, Ela1-myc:uPA^{-/-}, se ha visto enlentecida por los numerosos problemas que presenta la colonia uPA para la cría (baja tasa de fertilidad) así como otros problemas sanitarios (p.ej: úlceras, prolapso rectal) que impiden la obtención de un número de animales necesarios para el análisis estadístico de las curvas de supervivencia. Los datos disponibles sólo han permitido el análisis comparativo (Kaplan-Meier) de las curvas de supervivencia de Ela1-myc (n=107) y Ela1-myc:uPA^{+/-} (n=30). Ambas curvas son muy similares (Figura 11) y no existen diferencias significativas (139 ± 2.3 vs 128 ± 6.4) no afectan a la supervivencia. Por otro lado, para poder determinar si uPA puede jugar algún papel en la progresión tumoral pancreática murina es necesario esperar a la obtención de los animales completamente nulos para la proteína, Ela1-myc:uPA^{-/-}.

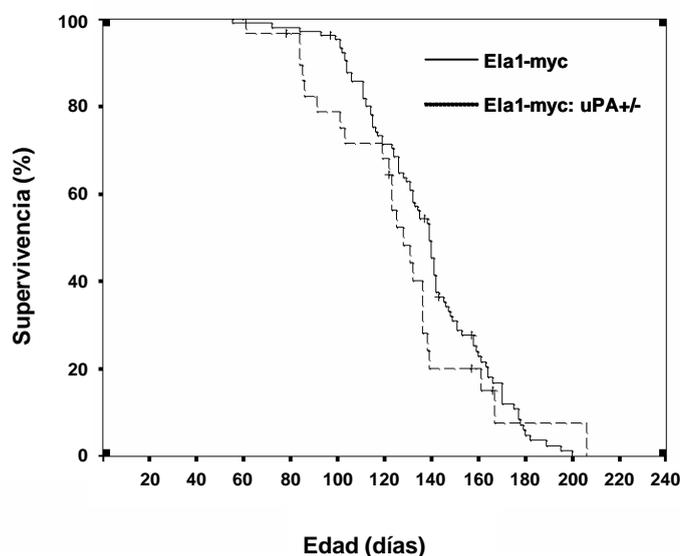


Figura 11. Análisis de supervivencia de los ratones Ela1-myc:uPA ^{+/-} respecto los ratones Ela1-myc.

Estudio comparativo de la supervivencia de los Ela1-myc (n=107) y Ela1-myc:uPA+/- (n=30) utilizando el método estadístico de Kaplan-Meier. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (p=0.29).

SOBREEXPRESION DE tPA EN PÁNCREAS MURINO: TRANSGÉNICOS Ela1-tPA y CK19-tPA

1.-Transgénico Ela1-tPA

1.1- Generación de los ratones Ela1-tPA y análisis de la expresión del transgén

En función de los resultados hasta ahora descritos y junto con los datos ya existentes en humanos (Paciucci R., Tora M. y col., 1998), se evidencia que el tPA juega un papel relevante en la progresión del cáncer de páncreas exocrino. Con el fin de determinar qué efectos tiene la sobreexpresión de tPA en el páncreas exocrino, y la posible contribución del contexto celular en el que se produzca, generamos dos ratones transgénicos que presentan el gen del tPA humano bajo el promotor específico de células acinares (elastasa 1) o bien de células ductales (CK19).

1.1.1.- Selección de la línea celular para clonaje del tPA humano

Con el objetivo de clonar el cDNA del tPA humano, analizamos la expresión del mRNA de esta proteína en cinco líneas celulares pancreáticas tumorales humanas mediante la técnica de RT-PCR. Se detectó la expresión de mRNA de tPA en 3 líneas celulares (Hs766t, RWP-1 y SK-PC-1) y se escogió la línea SK-PC-1 por ser aquella que expresaba niveles más elevados (Figura 12).

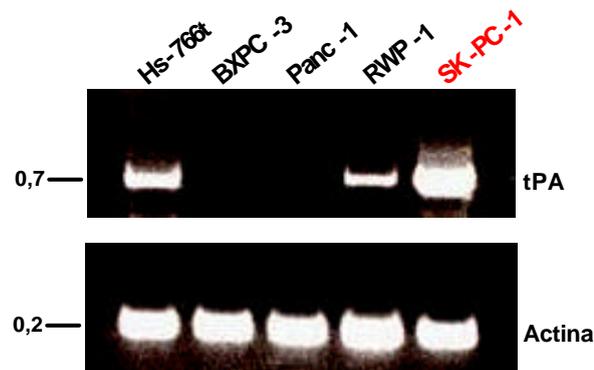


Figura 12. Expresión del mRNA del tPA humano en células de cáncer de páncreas: análisis por RT-PCR.

La RT-PCR se llevó a cabo con 0,1µg de RNA total de 5 líneas de células tumorales pancreáticas humanas (Hs-766t, BxPC-3, Panc-1, RWP-1 y SK-PC-1). Como control de la calidad del RNA se utilizó la actina. Pesos moleculares de las secuencias amplificadas del tPA y actina indicados en Kb.

1.1.2.- Construcción del plásmido elastasa-htPA-b-globina-Bluescript (pEla1-htPA)

A partir del RNA extraído de las células SK-PC-1, se obtuvo y amplificó el cDNA del tPA humano de 1786pb y se clonó en el plásmido pBluescript. Posteriormente, se insertó el

fragmento -205/+8 del gen del promotor de la elastasa 1 de rata. Dicho promotor confiere un elevado nivel de expresión del transgén en las células acinares del páncreas, aunque también confiere una leve expresión dispersa en las células beta de los islotes de Langerhans. A la construcción se le introdujo un fragmento del gen de la β -globina de conejo (1,2 Kb) que aumenta la estabilidad de los transcritos del transgén (ver Materiales y Métodos, Apartado 4.1). La construcción obtenida con las respectivas dianas se muestra en la Figura 13.

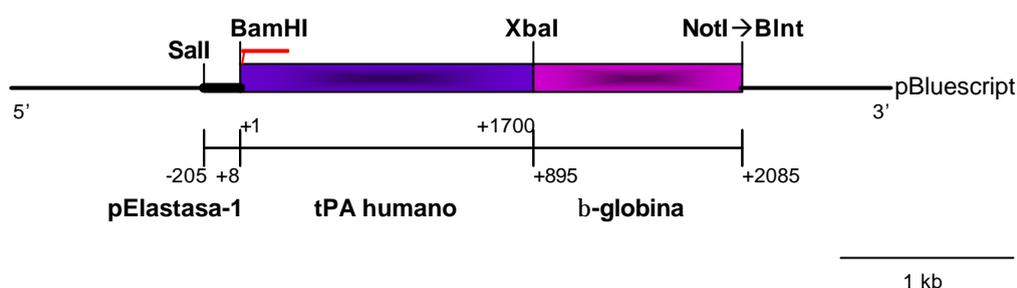


Figura 13. Obtención del plásmido elastasa 1-htPA-bglobina-Bluescript.

El fragmento de 1,7 kb (+1/+1700) del cDNA del tPA humano se clonó en el vector pBluescript (3Kb) y se unió por su extremo 5' al promotor de la elastasa 1 de 0,2 Kb (-205/+8). Al extremo 3' de la secuencia del gen del tPA se añadió el fragmento de 1,2 Kb (+895/+2085) de β -globina de conejo que contiene un intrón y la secuencia de poliadenilación. La construcción final elastasa1-htPA- β globina-pBluescript tiene un tamaño de 6,1 Kb. La flecha roja indica el inicio de la transcripción. Se indican los enzimas de restricción utilizados.

1.1.3.- Análisis de la integración y expresión del tPA en los ratones transgénicos Ela1-tPA.

La construcción anteriormente mencionada fue inyectada en oocitos fertilizados C57Bl/6-DBA2 F₂ para la generación de los animales transgénicos. Los animales fundadores fueron analizados mediante *Southern-blot* (ver Materiales y Métodos), detectándose el fragmento esperado de 3,1 kb en 4 de los 9 ratones analizados (Figura 14A).

Los ratones transgénicos (Ela1-tPA 273, 275, 280 y 281) fueron seguidamente cruzados con ratones salvajes C57Bl/6 y se analizó la progenie mediante PCR (ver Materiales y Métodos) para determinar si el transgén se había integrado en la línea germinal y el grado de transmisión. Tres de las líneas fundadoras (Ela1-tPA 273, 275 y 281) transmitían el gen a la descendencia con una eficiencia del 40-50%, mientras que la línea Ela1-tPA 280 presentaba un nivel de transmisión muy bajo (5-10%) por lo que se descartó. La Figura 14B muestra la detección del fragmento de tPA esperado de 1,1 Kb en los descendientes de las líneas fundadoras.

Analizamos si la construcción insertada en las tres líneas transgénicas fundadoras permitía la expresión del tPA humano específicamente en páncreas, como corresponde a la utilización del promotor de elastasa 1. Para ello se realizó una RT-PCR a partir del RNA total de los extractos de páncreas e hígado (control negativo) de los descendientes de cada animal

fundador. Como se observa en la Figura 14C, se detectó la expresión del mRNA de tPA específicamente en el páncreas y no en el hígado, únicamente en los descendientes con el cDNA insertado. Como control del estado del RNA se amplificó el mRNA de la actina. Estos resultados confirmaron la correcta inserción y expresión del gen del tPA humano en las líneas fundadoras.

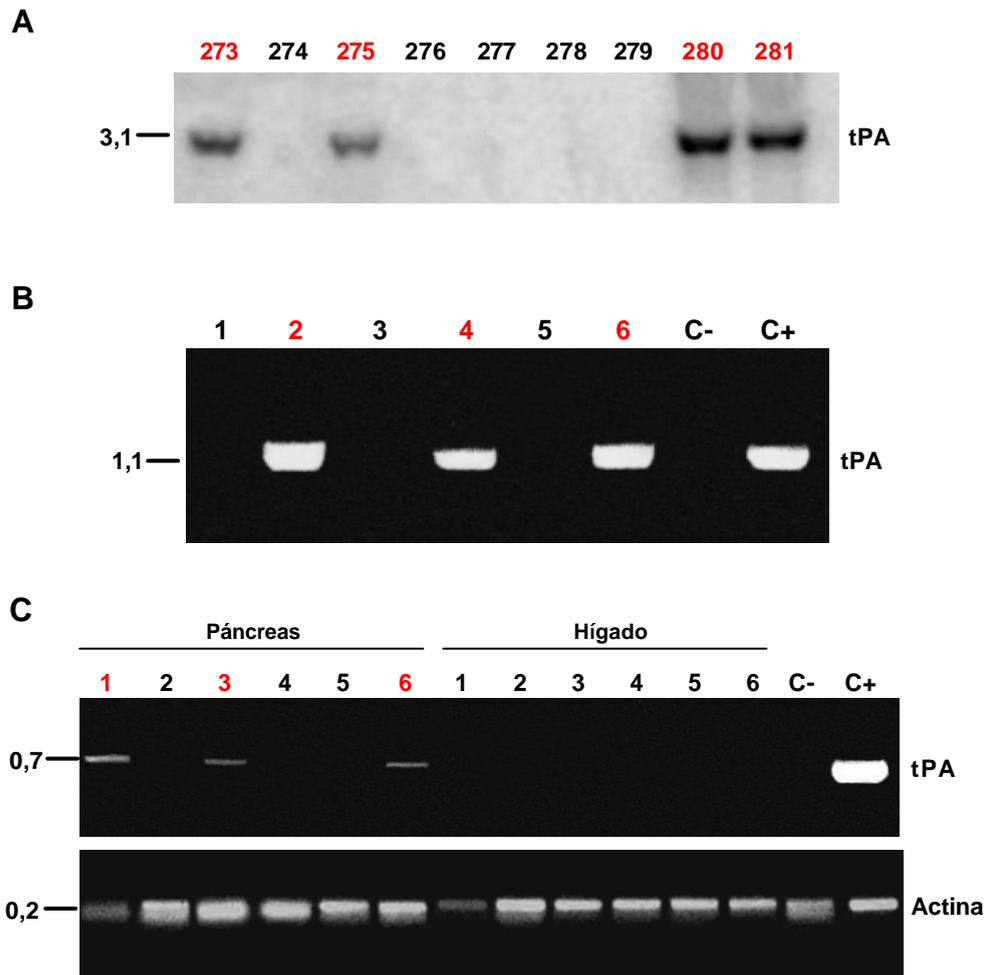


Figura 14. Análisis de la integración y expresión del tPA en los ratones transgénicos Ela-tPA.

(A) *Southern-blot* a partir de 10 μ g de DNA genómico, digerido con Xba I, de ratones candidatos para fundar la colonia transgénica Ela-tPA. La membrana se hibridó con la sonda de la construcción elastasa-htPA- β globina; peso molecular de la banda indicada en Kb. (B) Comprobación por PCR de la integración del cDNA en la descendencia de los ratones transgénicos fundadores Ela1-tPA 273, 275 y 281. Se utilizó 1 μ l de DNA genómico de cada ratón para la PCR. Muestras 1, 2: línea 273, muestras 3, 4: línea 275, muestras 5, 6: línea 281. Control negativo: 1 μ l de DNA de ratón no transgénico hermano de camada, control positivo: 30 ng de DNA de la construcción elastasa-htPA. Peso molecular de la secuencia amplificada del tPA del transgén indicado en Kb. (C) Análisis por RT-PCR de la expresión del transgén en páncreas e hígado de ratones transgénicos (1, 3 y 6) y hermanos de las camadas no transgénicos (2, 4 y 5) descendientes de los ratones fundadores Ela1-tPA 273 (1 y 2), 275 (3 y 4) y 281 (5 y 6), mediante la amplificación de 0,4-0,6 μ g de mRNA. Los ratones transgénicos 1, 3 y 6 expresan específicamente en el

páncreas el mRNA del transgén (indicado en rojo). Control negativo: 0,6 µg de RNA total de un ratón salvaje C57Bl/6, control positivo: 0,5 µg de RNA total de células SK-PC-1. Pesos moleculares de las secuencias amplificadas de tPA y actina indicados en Kb.

1.2.- Caracterización del ratón transgénico Ela1-tPA: análisis histológico pancreático.

El estudio fenotípico de los descendientes de las líneas fundadoras Ela-tPA reveló que no había diferencias respecto los ratones control (hermanos de la camada que no han incorporado el transgén). Posteriormente se sacrificaron animales a determinados tiempos (3, 6, 9 y 12 meses) para el estudio histológico del páncreas. El análisis macroscópico no reveló diferencias en las masas pancreáticas respecto a ratones control. Al nivel microscópico, no se observaron alteraciones pancreáticas en los ratones de 3 y 6 meses ni tampoco en animales de más de un año de edad descendientes de las tres líneas fundadoras (ver Figura 15). Todos estos análisis se realizaron en animales portadores del transgén en heterocigosis.

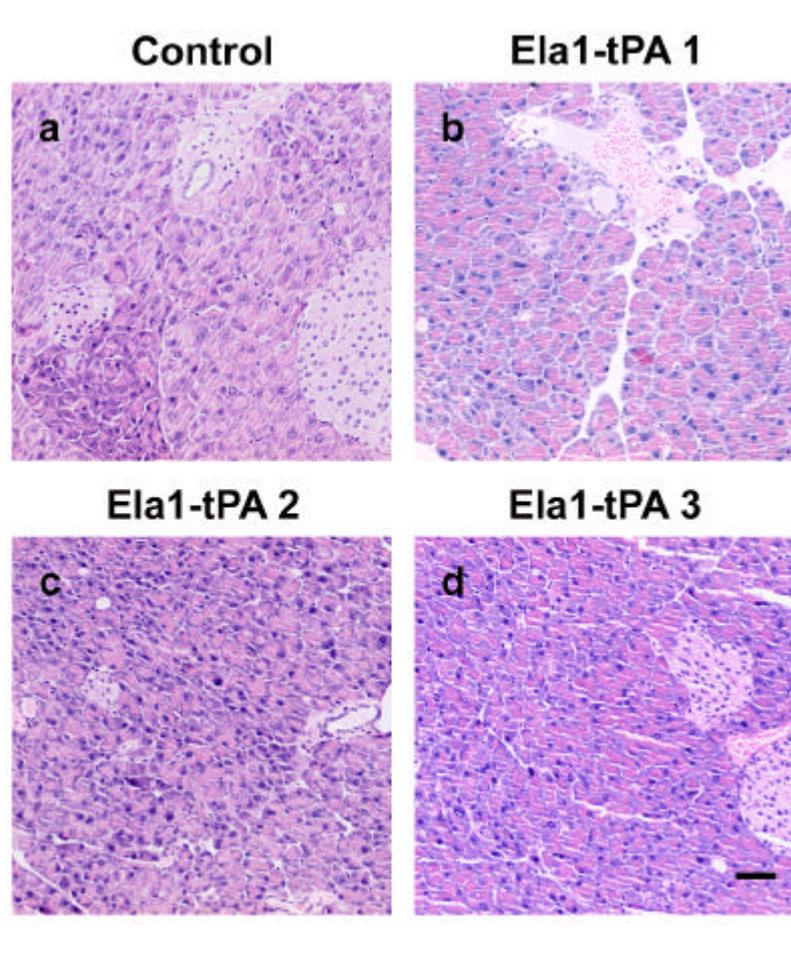


Figura 15. Análisis histológico del páncreas de ratones transgénicos Ela1-tPA.

Secciones del páncreas de ratones mayores de 1 año de edad, incluido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina para el análisis histopatológico. Igual que en el páncreas del ratón normal no transgénico (a), no se detectan alteraciones histológicas en el páncreas de los ratones transgénicos Ela1-tPA descendientes de las líneas fundadoras Ela1-tPA 273 (b), 275 (c) y 281 (d). Barra: 50 µm.

1.3.- Estudio de los genes modificados por la sobreexpresión de tPA en páncreas murino mediante análisis de expresión génica diferencial.

Con el fin de identificar posibles genes regulados por la presencia del tPA en el páncreas murino, realizamos un análisis diferencial mediante la técnica de *microarrays*. El estudio se realizó comparando el páncreas de los ratones transgénicos Ela1-tPA respecto los correspondientes hermanos de camada que no han integrado el transgén. El análisis se realizó por triplicado, marcando la muestra problema (Ela1-tPA) con el fluorocromo Cy-3 (fluorescencia de color verde) y la muestra control con Cy-5 (fluorescencia de color roja). Adicionalmente, se realizó un segundo experimento, también por triplicado, en el que el marcaje de las muestras fue en el sentido opuesto: la muestra problema con Cy-5 (rojo) y el control con Cy-3 (verde). Este segundo análisis sirvió para validar los resultados obtenidos en el primer experimento.

El análisis de las imágenes reveló que la mayoría de genes no estaban expresados de forma diferencial en la muestra problema respecto a la control (puntos rojos o verdes) debido a la gran similitud del perfil génico de los dos grupos estudiados. Los resultados obtenidos tras el análisis de los datos revelaron pequeñas diferencias de expresión génica entre ambas muestras. Se muestran en la Tabla 6 los genes diferencialmente expresados cuando se marcó la muestra problema con Cy-3 (verde). Los filtros de selección fueron estrictos (ver Materiales y Métodos), por ello sólo algunos genes del experimento con el marcaje inverso cumplieron todos los requisitos y sólo el gen *Thrombospondin repeat containing 1* (Tsrc1) presentaba el mismo aumento de expresión (1,8). No obstante, dichos resultados son preliminares y son necesarios análisis adicionales.

Acceso GB	Gen	P/C
<i>Genes inducidos</i>		
Receptores		
NM_010189	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter (Fcgrt)	1,67
NM_013523	Follicle stimulating hormone receptor (Fshr)	1,5
Canales y transportadores		
NM_021551	Organic cation transporter	1,77
BC012497	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal beta 56/58 kDa, isoform 2	1,76
AF263836	Potassium voltage-gated channel Q5 (Kcnq5)	1,6
NM_009195	Solute carrier family 12, member 4 (Slc12a4)	1,58
NM_011334	Chloride channel 4-2 (Clcn4-2)	1,55
Citoesqueleto/Adhesión/ECM		
NM_031404	Actin-like 6	1,74
AF406641	Crumbs-like protein 1 precursor	1,56
NM_012031	Sperm associated antigen 1 (Spag1)	1,55
Metabolismo y Redox		
D89669	Cytochrome P450, 24	1,7
NM_026925	RIKEN cDNA 1810007A24 gene	1,67
NM_019758	Mitochondrial carrier homolog 2 (Mtch2)	1,67

NM_011514	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	1,61
AF297860	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	1,6
NM_008084	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd)	1,59
NM_009293	Steroid sulfatase	1,57
AF169620	Arginine methyltransferase	1,57
Proteasas y relacionados		
AK007392	Elastase 1, pancreatic	1,75
NM_025469	Colipase, pancreatic	1,67
AK003088	Carboxypeptidase A1 precursor homolog <i>rattus norvegicus</i>	1,67
NM_009430	Trypsin 2	1,67
NM_009885	Carboxyl ester lipase	1,58
Quinasas y Fosfatasas		
U39066	Mitogen activated protein kinase kinase 6 (Map2k6)	1,57
NM_019800	Acid phosphatase 6, lysophosphatidic (Acp6)	1,51
GTPasas		
BC016549	GPI-anchored metastasis -associated protein homolog	1,63
NM_021792	Interferon-inducible GTPase (Iigp)	1,54
Transcripción y relacionados		
NM_010905	Nuclear factor I/A (Nfia)	1,67
NM_011767	Zinc finger RNA binding protein (Zfr)	1,64
NM_010592	Jun proto-oncogene related gene d1 (Jund1)	1,61
NM_011378	Transcriptional regulator, SIN3A (yeast) (Sin3a)	1,61
BC019414	Homeo box B2	1,57
Traducción		
BC011426	Similar to zinc finger protein 97, clone MGC:18740	1,63
NM_025586	Mus musculus ribosomal protein L15	1,63
NM_009082	Ribosomal protein L29 (Rpl29)	1,53
Señalización		
NM_023622	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator like 3	1,8
BC016255	Mus musculus, clone MGC:28892 IMAGE:4912	1,52
Otros		
BC016215	<i>Thrombospondin repeat containing 1 (Tsrc1)</i>	1,8
NM_025977	RIKEN cDNA 2510048L02 gene	1,75
NM_033146	Comparative gene identification transcript 112	1,65
NM_007553	Bone morphogenetic protein 2 (Bmp2)	1,65
BC020156	Tripartite motif-containing 41	1,63
AK016302	RIKEN cDNA 4930578I06 gene	1,6
NM_011615	Death effector domain-containing (Dedd)	1,59
BC021493	RIKEN cDNA 1110001A12 gene	1,58
AK007400	RIKEN cDNA 1810009F10 gene	1,58
AK018327	RIKEN cDNA 6530406P05 gene	1,57
AK005924	RIKEN cDNA 1700012M13 gene	1,53
AK007598	RIKEN cDNA 1810024J13 gene	1,51
Genes inhibidos		
BC018367	RIKEN cDNA 2010200I23 gene	0,55
AK018641	RIKEN cDNA 9130020K17 gene	0,58
NM_026238	RIKEN cDNA 9030612I22 gene	0,58

Tabla 6. Genes diferencialmente expresados entre el páncreas de ratones transgénicos Ela-tPA y controles (hermanos de la camada).

Relación de la muestra Problema vs Control obtenidos a partir del análisis de *microarrays*. P/C \geq 1,5: genes inducidos; P/C \leq 0,6: genes inhibidos. Acceso GB: acceso Gene Bank.

2.- Transgénico CK19-tPA

2.1- Generación de los ratones CK19-tPA y análisis de la expresión del transgén

Para analizar los posibles efectos de la sobreexpresión de tPA en células ductales pancreáticas, generamos un ratón transgénico que expresara el tPA humano bajo el promotor de CK19, CK19-tPA. Este promotor no confiere total especificidad para páncreas, ya que la CK19 también se expresa en otras células del tracto digestivo (p.ej: estómago, intestino, colonocitos) pero hasta ahora es el único promotor disponible para células ductales y ha sido ya utilizado con éxito para dirigir la expresión de genes a células ductales pancreáticas (Brembeck F.H. y Rustgi A.K., 1999; Brembeck F.H. y col., Rustgi A.K., 2001).

2.1.1.- Obtención de la construcción CK19-htPA-b-globin Bluescript.

A partir del RNA extraído de las células SK-PC-1, se obtuvo y amplificó el cDNA del tPA humano de 1786pb y se clonó en el plásmido pBluescript. Posteriormente, se insertó el fragmento +51/+2100 del gen del promotor de CK19 de ratón. A la construcción se le introdujo el fragmento del gen de la β -globina de conejo (1,2 Kb) que aumenta la estabilidad de los transcritos del transgén (ver Materiales y Métodos, Apartado 4.1). La construcción obtenida con las respectivas dianas se muestra en la Figura 16.

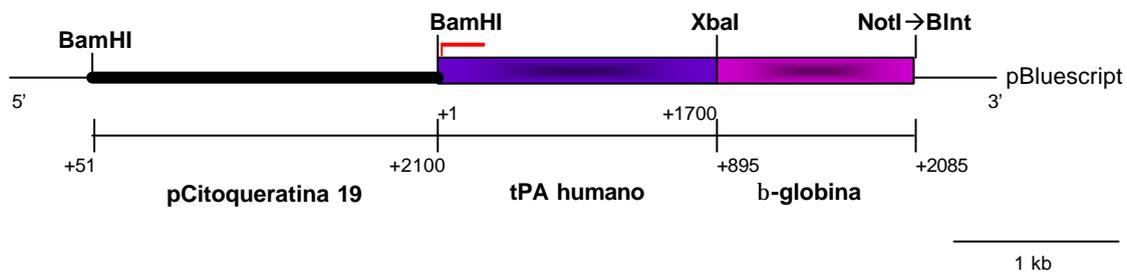


Figura 16. Obtención del plásmido CK19-htPA-b-globina-Bluescript.

El fragmento de 1,7 kb (+1/+1700) del cDNA del tPA humano se clonó en el vector pBluescript (3Kb) y se unió por su extremo 5' al promotor de CK19 de 2,050 Kb (+51/+2100). Al extremo 3' de la secuencia del gen del tPA se añadió el fragmento de 1,2 Kb (+895/+2085) de β -globina de conejo. La construcción final CK19-htPA- β globina-pBluescript tiene un tamaño de 7,95 Kb. La flecha roja indica el inicio de la transcripción. Se indican los enzimas de restricción utilizados.

2.1.2.- Análisis de la integración y expresión del tPA en los ratones transgénicos CK19-tPA

La construcción que contiene la secuencia CK19-tPA-βglobin se microinyectó en embriones de ratones híbridos C57Bl/6-DBA2. El análisis mediante *Southern-blot* de los animales obtenidos evidenció la presencia del inserto correspondiente (5,1 Kb) en 3 ratones: CK19-tPA 832, 833, y 885 (Figura 17A).

Dichos ratones transgénicos fueron cruzados con ratones salvajes C57Bl/6 para valorar la integración y eficiencia de transmisión del gen de *tPA* humano. La progenie derivada de estos cruzamientos fue analizada mediante PCR, observándose que todos ellos habían integrado el transgén en la línea germinal y lo transmitían a la descendencia (Figura 17B).

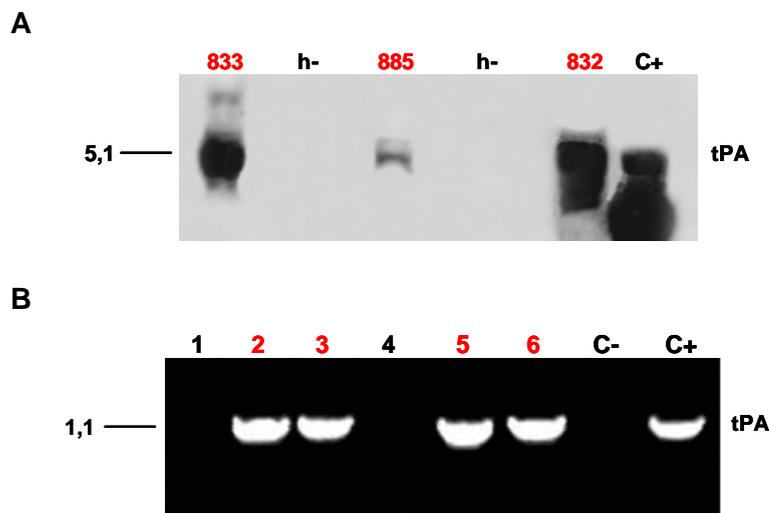


Figura 17. Análisis de la integración y expresión del tPA en los ratones transgénicos CK19-tPA.

(A) *Southern-blot* a partir de 10 µg de DNA genómico, digerido con Xba I, de ratones candidatos para fundar la colonia transgénica CK19-tPA. La membrana se hibridó con la sonda de la construcción CK19-htPA-βglobina. Control positivo: DNA de ratón no transgénico con 10 copias del fragmento inyectado. Peso molecular de la banda indicada en Kb. (B) Comprobación por PCR de la transmisión del transgén en la descendencia de los ratones transgénicos fundadores CK19-tPA 832 (1, 2 y 3) y 833 (4, 5 y 6). Se utilizó 1µl de DNA genómico de cada ratón para la PCR. Control negativo: DNA de un ratón salvaje C57Bl/6, control positivo: DNA de ratón transgénico Ela1-tPA. Peso molecular de la secuencia amplificada del tPA en Kb.

DISCUSIÓN

1.- Expresión de tPA en el carcinoma pancreático murino

En estudios previos de nuestro laboratorio utilizando tejidos y cultivos de células de páncreas humano, se observó que la expresión de tPA estaba fuertemente asociada al fenotipo neoplásico en el cáncer de páncreas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998). Estos datos sugerían que dicha proteasa podría estar implicada en el proceso tumoral pancreático y abrían nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de este tumor tan agresivo. Sin embargo, para analizar estas posibles aplicaciones es necesario recurrir a modelos animales que nos permitan aproximaciones experimentales no factibles en humanos. Por este motivo, el inicio de nuestro trabajo se centró en analizar la expresión de tPA en el páncreas normal de ratón y en tumores de páncreas de varios modelos murinos de tumorigénesis pancreática. En concreto se utilizaron ratones transgénicos que desarrollaban tumores de páncreas como consecuencia de la sobreexpresión de un gen determinado (*myc*, antígeno T de SV40 o CCK2/gastrina) bajo el control del promotor de la elastasa 1.

Los resultados descritos en esta tesis muestran que el tPA es indetectable en el epitelio del páncreas exocrino normal murino así como en los complejos ductales no neoplásicos, mientras que se expresa en los tumores que presentan diferenciación ductal. Por el contrario, no se detectó expresión de esta proteasa en células acinares de ningún tumor con fenotipo acinar estudiado en los diferentes modelos empleados. Dichos resultados dan validez a la utilización de estos modelos murinos como una aproximación a la enfermedad humana, ya que los resultados obtenidos en ratón concuerdan con los que se habían descrito en humano. Al nivel histológico, los tumores pancreáticos humanos son, en el 90% de los casos, adenocarcinomas ductales. Se ha detectado la sobreexpresión de tPA en varias líneas tumorales pancreáticas humanas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998; Escaffit R., Estival A. y col., 2000) así como en las células ductales neoplásicas de tumores de páncreas humanos (Paciucci R., Tora M. y col., 1998). Dicha coincidencia apoya la utilización de los modelos murinos como herramienta para el estudio del sistema del tPA como diana terapéutica en la progresión tumoral pancreática mediante la utilización de fármacos que bloqueen su actividad.

Los mecanismos moleculares que promueven la expresión del tPA en los tumores pancreáticos ductales no se conocen. Previamente, se describió en nuestro laboratorio que la sobreexpresión de tPA en líneas celulares pancreáticas y en tumores pancreáticos humanos estaba asociada a mutaciones activadoras de *K-ras* (Paciucci R., Tora M. y col., 1998), una de las alteraciones génicas más comunes asociadas a este tipo de tumor (Hruban R.H., Yeo C.J., y Kern S.E., 2001). Al contrario de lo que ocurre en el cáncer de páncreas exocrino humano, los tumores que desarrollan los ratones *Ela1-myc* y *Ela1-TAg* no presentan el gen *K-ras* mutado ni en los tumores con fenotipo acinar ni en los tumores *Ela1-myc* con diferenciación ductal (Schaeffer B.K., Terhune P.G. y Longnecker D.S., 1994). No obstante, es posible que en

los tumores de tales modelos murinos las proteínas Ras no se activen por mutaciones puntuales sino que lo hagan en respuesta a señales extracelulares (Seufferlein T., Van Lint J., y col., 1999), o bien que sean otros eventos moleculares por debajo de Ras en la vía de señalización los que estén activados en los tumores con el fenotipo ductal. De acuerdo con esta idea, se ha observado que los ratones Ela1-TGF α , sin mutaciones en *K-ras*, presentan la vía de señalización Ras/ERK activada de forma selectiva en los complejos ductales, que representan las lesiones pre-malignas (Wagner M., Greten F.R., y col., 2001). Aun así, datos recientes sugieren que los genes *ras* presentan algunas funciones diferentes en la oncogénesis en ratones y en humanos (Hamad N.M., Elconin J.H., y col., 2002).

Existen numerosos estudios que demuestran la presencia de mutaciones en el gen supresor de tumores *p53* en el carcinoma pancreático humano (Pellegata N.S., Sessa F. y col., 1994; Redston M.S., Caldas C. y col., 1994; Rozenblum E., Schutte M. y col., 1997). Por otro lado, se ha descrito que la forma normal y, no la mutada, de la proteína *p53* es capaz de reprimir la actividad del promotor del tPA humano y jugar un papel en la regulación de su expresión (Kunz C., Pebler S. y col., 1995). Por lo tanto, la mutación y pérdida de función del gen supresor de tumores *p53* podría provocar, entre otras alteraciones, la sobreexpresión de tPA. No obstante, se sabe poco acerca de la importancia de las mutaciones en *p53* en los modelos murinos de carcinogénesis pancreática, aunque sí se ha descrito que los ratones transgénicos Ela1-TAg utilizados en este trabajo desarrollan tumores que expresan la forma normal de la proteína *p53* (Tevethia M.J., Bonneau R.H. y col., 1997). A pesar de ello, son necesarios más estudios para establecer el papel de *p53* en los modelos murinos ya que no existe una relación clara entre las mutaciones del gen y la expresión de tPA, como sí se ha descrito en los tumores humanos.

En el promotor del tPA también se han descrito elementos de respuesta funcionales para CREB y para receptores de hormonas esteroideas (Costa M., Shen Y. y col., 1998; Levenson A.S., Kwaan H.C. y col., 1998; Merchiers P., Bulens F. y col., 1999) pero la contribución precisa de éstos en la regulación de la expresión del tPA en los tumores no se conoce todavía. Hay que añadir además, que todos los estudios del promotor del tPA se han realizado sobre el gen de *tPA* humano. La comparación del gen de *tPA* en rata, ratón y humano muestra la existencia de diferencias en el promotor según la especie que explican la diferente regulación del gen por cAMP (Holmberg M., Leonardsson G. y Ny T., 1995). Por lo tanto, no podemos descartar que existan otras diferencias en cuanto a los factores que regulan la expresión del tPA en ratón y por ello es necesaria una mejor caracterización del promotor murino.

Recientemente se ha descrito la amplificación de *c-myc* y sobreexpresión de la proteína en tumores pancreáticos humanos (Schleger C., Verbeke C. y col., 2002; Han H., Bearss D.J. y col., 2002), aunque hasta el momento no existen evidencias de que *c-myc* o sus proteínas

relacionadas tengan un papel en la regulación de la expresión del tPA. Un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la adquisición del fenotipo ductal de los tumores Ela1-myc puede contribuir a entender mejor la activación de la expresión del tPA. En este sentido, un estudio reciente en el que se expresa *myc* bajo un promotor inducible, demuestra que es necesaria la presencia continua del oncogén para la persistencia de los tumores. La regulación a la baja de *myc* permite la activación del programa apoptótico, diferenciación celular y pérdida de tumorigenicidad (D'Cruz C.M., Gunther E.J. y col., 2001; Jain M., Arvanitis C. y col., 2002). El sistema tumoral que hemos utilizado es notoriamente más complejo, ya que en los tumores de los ratones Ela1-myc el promotor de la elastasa 1 restringe la sobreexpresión de *c-myc* a las células acinares pancreáticas. Sin embargo, dicho evento no es suficiente para dificultar la progresión tumoral, observándose una sobreexpresión de tPA en las células neoplásicas ductales donde *c-myc* exógeno no se expresa.

Varias explicaciones podrían contribuir a explicar tal situación. Es posible que la hiperproliferación forzada por la expresión de *c-myc* en las células acinares provoque la adquisición de alteraciones estables, como mutaciones en genes necesarios para la promoción del fenotipo tumoral. Por otro lado, es frecuente en estos tumores la presencia de metaplasia ductal. Así pues, es posible que las alteraciones presentes en las células acinares se mantengan tras la diferenciación acinar-ductal, por lo que las células ductales incorporarían las mutaciones adquiridas por las células acinares. Estas alteraciones promoverían parte de las características tumorales observadas en las células ductales neoplásicas y podrían explicar porqué se observa un elevado número de ductos neoplásicos en los tumores de los ratones Ela1-myc sin que éstos expresen el transgén *c-myc*. Al mismo tiempo, la adquisición de un fenotipo ductal sería permisiva para la expresión de genes, u otros rasgos fenotípicos, que estarían reprimidos en el contexto de un programa de diferenciación acinar.

Otra explicación atiende a la posibilidad de que en la progresión tumoral pancreática sea el contexto tisular alterado lo que promueva la transformación de los ductos tumorales. Así pues, es posible que las características adquiridas en las células acinares tumorales, debido a expresión de *c-myc*, provoquen tal desequilibrio en el páncreas que se estimule la progresión tumoral de las células ductales. La desmoplasia asociada al tumor puede generar un contexto en el que los ductos neoplásicos, aun sin expresar *c-myc* exógeno, sean estimulados tanto por las células acinares como por las células mesenquimales. Todo ello implicaría una estimulación paracrina intensa, mediada por moléculas que podrían ser objeto en estudios futuros. De forma no excluyente, ambas hipótesis podrían explicar la selección y progresión eficaz del componente ductal tumoral en un considerable número de los tumores analizados de los ratones Ela1-myc.

Teniendo en cuenta la baja proporción de células ductales en el páncreas normal, es sorprendente observar como en muchos tumores el componente ductal adquiere una proporción tan importante en los ratones Ela1-myc así como en los tumores pancreáticos humanos, donde el 90% del tumor es de fenotipo ductal. Todo ello, no sólo confirma que dichos

ratones son un buen modelo para entender la patología tumoral pancreática humana, sino que apunta concretamente a algunos de los mecanismos que la promueven. Así son interesantes estudios acerca de la importancia de la transición acinar-ductal, del papel de la desmoplasia y de los mecanismos de estimulación paracrina entre los diferentes tipos celulares del tumor pancreático.

2.- Efecto de la deficiencia de tPA en la progresión tumoral y mecanismos de acción del tPA

Los estudios realizados hasta el momento reflejaron que el modelo murino de tumorigénesis pancreática *Ela1-myc* era el que mejor reproducía el adenocarcinoma ductal humano. Los tumores de dichos ratones presentaban el componente ductal característico de los carcinomas humanos y además, exhibían sobreexpresión de tPA en estas regiones. Por ello, el estudio del papel de la deficiencia de tPA en la progresión tumoral se realizó sobre este modelo animal.

El análisis histológico de los tumores *Ela1-myc* y *Ela1-myc:tPA^{-/-}* reveló una gran semejanza en la histología de los tumores con estos genotipos. En dicho análisis no se observaron diferencias en la presencia de lesiones asociadas al tumor (displasia, hiperplasia, necrosis) ni en la frecuencia de diferenciación ductal en los tumores, sugiriendo que el tPA no es necesario para la transdiferenciación acinar-ductal. No obstante, se requieren estudios más detallados para entender el papel del tPA en el proceso de diferenciación ductal. Recientemente, se ha propuesto que la metaloproteasa de matriz MMP-7 es crucial para el desarrollo de los complejos ductales en respuesta a la ligación del conducto pancreático principal (Crawford H.C., Scoggins C.R., y col., 2002). Satake y colaboradores, describieron que la ligación del conducto pancreático (PDL) en ratones simula la pancreatitis crónica en humanos, exhibiendo reacción inflamatoria, fibrosis y metaplasia acinar-ductal (Satake K. y Hiura A., 1998). Crawford y colaboradores, observaron que cuando dicha manipulación experimental se realiza en ratones deficientes en MMP-7 (*MM-7^{-/-}*) se inhibe la pérdida de células acinares y la formación de estructuras ductales, indicando que esta metaloproteasa es importante para el proceso de metaplasia ductal. Dicha estrategia podría utilizarse para analizar con más profundidad el papel del tPA en la transición acinar-ductal pancreática. Resultados preliminares indican que, en efecto, el tPA es prescindible para la inducción de una metaplasia acinar-ductal por medio de la ligación del conducto pancreático (Aguilar S. y Pereira J.A., resultados no mostrados).

Aunque la deficiencia de tPA no afecta a las características histológicas de los tumores y el tPA no parece estar implicado al menos directamente, en la diferenciación ductal, sí observamos un aumento en la supervivencia de los ratones *Ela1-myc:tPA^{-/-}* respecto a los

Ela1-myc. Estos resultados sugieren que el tPA juega un papel en la progresión tumoral pancreática murina.

Los efectos en la supervivencia observados no se deben a las diferencias de fondo genético que existen entre los ratones Ela1-myc *salvajes* para el tPA (C57Bl/6 puros) y los Ela1-myc:tPA^{-/-} (75% C57Bl/6 y 25% 129SV/SL) ya que la supervivencia de los ratones hermanos de camada Ela1-myc:tPA^{+/-} con el mismo fondo genético no se ve alterada. Los ratones Ela1-myc:tPA^{-/-} presentan un aumento en la supervivencia respecto los ratones Ela1-myc que aunque modesto, es significativo estadísticamente. No obstante, ningún animal ha sobrevivido más de 8 meses de vida. La falta de ratones de edad más avanzada puede explicarse por el hecho de que la agresividad de los tumores desarrollados es tan alta que la inactivación de una única proteasa no es suficiente para prevenir completamente la progresión tumoral. Otra explicación posible, no excluyente, es que tPA se expresa únicamente en las etapas tardías de la progresión tumoral, en aquellos tumores que presentan diferenciación ductal, los cuales aparecen en aproximadamente el 50% de los animales. Además, en los tumores con fenotipo ductal generalmente persisten zonas de diferenciación acinar en las que la ausencia de tPA no tendría ningún efecto.

Estudios con otros modelos murinos podrían aclarar el posible papel terapéutico de la inhibición del tPA en la progresión tumoral pancreática. Este era uno de los objetivos en el planteamiento inicial de nuestro proyecto y por ello también incluimos el modelo Ela1-TAg. Sin embargo, los resultados que obtuvimos en el de curso de los experimentos realizados con estos animales, no nos fueron útiles para estudiar el papel del tPA, ya que los ratones Ela1-TAg solo desarrollan tumores acinares que han resultado siempre negativos para la expresión de tPA. Por esta razón, aunque se iniciaron experimentos de cruce con ratones *knock out* para tPA para estudios de supervivencia, éstos no fueron continuados (ver sección 6 de Resultados). Por otro lado, está descrito que los ratones transgénicos que sobreexpresan TGF α desarrollan tumores con un patrón histológico muy similar al adenocarcinoma ductal pancreático humano (Sandgren E.P., Luetke N.C. y col., 1990). Si bien analizamos la expresión de tPA y anexina A2 en el páncreas de estos ratones, no fue posible realizar estudios de supervivencia debido a que solo tuvimos acceso a muestras de tejido y no a los ratones ya que en ellos los tumores sólo aparecen infrecuentemente y a edades avanzadas. Recientemente se ha descrito otro modelo de ratón transgénico que sobreexpresa *K-ras* mutado bajo el promotor de la elastasa 1 (Grippio P.J., Nowlin P.S. y col., 2003). Estos ratones son interesantes porque representan el primer modelo murino que conjuga la presencia de lesiones histológicas con fenotipo ductal y la alteración genética inicial descrita en el cáncer de páncreas humano. Ambos modelos, serían útiles para aumentar el conocimiento del papel del tPA en el carcinoma pancreático.

Los mecanismos por los cuales tPA contribuye a la progresión tumoral no están bien definidos. Estudios previos en nuestro laboratorio utilizando inhibidores químicos y anticuerpos

neutralizantes apoyan la idea de que la actividad proteolítica del tPA es importante para el proceso de invasión tumoral. Recientemente, Díaz y colaboradores han publicado datos que demuestran que el tPA es capaz de estimular la proliferación de las células pancreáticas *in vitro* así como el crecimiento del tumor y angiogénesis *in vivo* (Díaz V.M., Planaguma J. y col., 2002). Estos autores, demuestran que la inhibición estable de la expresión de tPA en células tumorales pancreáticas humanas (RWP-1) transfectadas con el transcrito antisentido del tPA, permite reducir el crecimiento de dichas células *in vivo*. En el mismo estudio proponen, de acuerdo con resultados de otros laboratorios (De Petro G., Copeta A. y Barlati S., 1994; Welling T.H., Huber T.S. y col., 1996; Herbert J.M., Lamarche I. y Carmeliet P., 1997) que la generación de plasmina es importante para la invasividad *in vitro* mediada por tPA pero no para la actividad mitogénica.

Con el fin de averiguar si la plasmina está implicada en el papel de tPA en la progresión tumoral pancreática en los modelos murinos utilizados en nuestro trabajo, realizamos análisis de supervivencia sobre los ratones Ela1-myc deficientes en el gen del *Plg*. Los estudios realizados con los ratones Ela1-myc:Plg +/- no nos permiten conocer el papel de la plasmina ya que, si bien estos ratones sobreviven más tiempo que los Ela1-myc, los hermanos de la camada Ela1-myc:Plg+/+ también presentan una supervivencia mayor. Dichos resultados indican que las diferencias observadas en la supervivencia se deben a variaciones en el fondo genético (Plg +/-: C57Bl75%-SJL129 25%). Por lo tanto, es necesario esperar hasta obtener los datos de supervivencia de los ratones Ela1-myc:Plg-/- para conocer si existe un efecto en la supervivencia, hecho que indicaría que el mecanismo de acción del tPA está mediado por la plasmina. Tal hipótesis sería factible ya que la plasmina puede degradar fibronectina, vitronectina y otras proteínas de la ECM así como activar o liberar factores de crecimiento (incluyendo el TGF α , FGF y VEGF latentes), y activar otras proteasas que degradan la matriz extracelular, tales como las MMPs (Saksela O. y Rifkin D.B., 1988).

El papel de tPA, uPA y plasmina en el proceso de crecimiento tumoral varía en cada modelo experimental y para cada tipo de tumor. Así, se ha observado que la producción endógena de uPA o tPA estimula la proliferación *in vitro* de células de melanoma y neuroblastoma (Menouny M., Binoux M., y Babajko S., 1997; Kirchheimer J.C., Wotja J. y col., 1989) y la pérdida combinada de la actividad de uPA y tPA provoca una reducción en la tasa de proliferación de las células endoteliales *in vitro* y frena la progresión del tumor (Shapiro R.L., Duquette J.G. y col., 1996). De forma similar, experimentos *in vitro* con células endoteliales transformadas, establecidas a partir de tumores inducidos por el antígeno T mediano del poliomavirus (PymT), muestran que la pérdida de actividad de uPA o tPA no limita el establecimiento ni la proliferación tumorales. En cambio, la pérdida combinada de la actividad de ambas proteasas permite una marcada reducción en la tasa de proliferación. Además, el proceso de invasión de dichas células es dependiente del estado de los PAs y plasmina (Sabapathy K.T., Pepper M.S. y col., 1997). En otro modelo experimental de tumores de mama inducidos por la expresión de PymT, la deficiencia de Plg aumenta el potencial metastático

pero no afecta al crecimiento del tumor (Bugge T.H., Lund L.R., y col., 1998). En cambio, la deficiencia de los PAs y Plg en el fibrosarcoma T241 provoca una disminución del crecimiento del tumor (Curino A., Mitola D.J. y col., 2002). Bugge y colaboradores, observaron que el crecimiento del tumor primario tras la inyección subcutánea dorsal de células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC), no se ve afectado por la deficiencia de Plg (Bugge T.H., Kombrinck K.W. y Xiao Q., 1997). En cambio, si la inyección se hace en las almohadillas de la pata, los ratones deficientes en Plg presentan una supresión drástica del crecimiento del tumor (Palumbo J.S., Talmage K.E. y col., 2003), indicando la importancia del contexto celular en el desarrollo tumoral. Los datos existentes confieren un papel al Plg en la invasión tumoral aunque el efecto sobre la proliferación depende del modelo experimental.

Durante el desarrollo tumoral, factores como la angiogénesis y proliferación celular favorecen el avance del tumor y la adquisición de capacidad invasiva y metastásica. Dichos factores así como la invasión ganglionar, nerviosa y vascular fueron estudiados con el fin de ampliar el conocimiento de los mecanismos responsables del aumento en la supervivencia en los ratones *Ela1-myc* deficientes en tPA. Estudios histopatológicos revelaron una baja proporción de tumores *Ela1-myc* y *Ela1-myc:tPA^{-/-}* con presencia de invasión nerviosa (1/18 vs 4/18) y vascular (2/18 vs 4/18), no observando diferencias entre ambos grupos. En el caso de la invasión ganglionar, aunque se observó en una mayor proporción de casos (2/4 vs 6/8), tampoco detectamos diferencias entre los diferentes genotipos. Dichas observaciones están de acuerdo con la baja frecuencia de metástasis en el hígado o cavidad peritoneal descrita en los ratones *Ela1-myc* (Sandgren E.P., Quaife C.J. y col., 1991), que se explica por la elevada agresividad del tumor que avanza tan rápidamente que el animal muere antes de que se produzca la invasión y metástasis a otros órganos distantes. La ausencia del tPA favorece el aumento de la supervivencia en los ratones *Ela1-myc*, aunque probablemente este tiempo resulte insuficiente para observar diferencias en la invasión y metástasis, procesos que suelen tardar más tiempo en aparecer.

Análisis inmunohistoquímicos en los tumores *Ela1-myc* y *Ela1-myc* con genotipo tPA^{-/-} muestran que en las áreas del tumor con diferenciación ductal existe una disminución del número de vasos por campo en los ratones *Ela1-myc:tPA^{-/-}*, siendo las diferencias casi significativas al nivel estadístico. Por el contrario, en las zonas acinares o mixtas con diferenciación acinar, no se observan cambios en el número de vasos entre los diferentes genotipos. Estos resultados indican que el tPA puede estar implicado en la estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos sugiriendo que el aumento en la supervivencia de los ratones *Ela1-myc:tPA^{-/-}* podría ser consecuencia de una menor angiogénesis tumoral. A pesar de que existe algún trabajo en contra de esta idea, como estudios *in vivo* en los que se observó que la deficiencia de la proteasa tPA, uPA o ambas, no disminuye la angiogénesis del tumor (Bajou K., Masson V. y col., 2001), otras publicaciones han demostrado el papel del tPA en el proceso angiogénico. En algunos de estos trabajos se ha observado, mediante estudios *in*

vitro, que el tPA regula la angiogénesis a través de la estimulación de la formación de los capilares endoteliales (Sato Y., Okamura K. y col., 1993; Ito K., Ryuto M. y col., 1995; Schnaper H.W., Barnathan E.S. y col., 1995). Más recientemente se ha propuesto, a partir de estudios con xenoinjertos de células de cáncer de páncreas humano en ratones inmunodeprimidos, que el tPA producido por las células tumorales es necesario para el correcto desarrollo de la angiogénesis en el tumor (Díaz V.M., Planaguma J., y col., 2002).

Por otro lado, tanto en los tumores con diferenciación ductal como acinar se observa menos proliferación en los ratones *Ela1-myc:tPA^{-/-}* respecto los ratones normales para el tPA. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, es posible que el efecto observado en la supervivencia sea debido, en parte, a cambios en la proliferación celular. Esta posibilidad se refuerza si consideramos los tumores que presentan diferenciación ductal pura, en los que observamos una marcada disminución de las células positivas para Ki-67 en los ratones con fondo genético *tPA^{-/-}* (57.3 ± 20.4 vs 29.4 ± 21). Dicha disminución no se observó en los tumores puramente acinares. El posible efecto mitogénico del tPA en las células tumorales pancreáticas concuerda con los resultados obtenidos por Díaz y colaboradores, tanto *in vitro*, inhibiendo con digonucleótidos antisentido la expresión endógena de tPA en células CAPAN-1, como *in vivo*, mediante xenotransplantes de células tumorales pancreáticas en ratones inmunodeprimidos (Díaz V.M., Planaguma J., y col., 2002).

Así pues, nuestros datos indicarían que el tPA es necesario para la formación de nuevos vasos sanguíneos y podría estar implicado en la hiperproliferación característica de la tumorigénesis pancreática, siendo las células ductales neoplásicas las principales dianas de su acción.

El análisis histopatológico reveló que los tumores de los ratones *Ela1-myc* deficientes en tPA presentan menos apoptosis que los tumores de ratones *salvajes* para la proteasa (10.5% vs 35%). El papel del tPA en la apoptosis celular del cáncer de páncreas no se conoce, no obstante los resultados descritos en este trabajo y en el de otros grupos, sugieren varias explicaciones posibles. Generalmente, las células tumorales desarrollan mecanismos que bloquean el programa de muerte celular (apoptosis) y sobreviven pese a la acumulación de daño genético (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000). Sin embargo, algunos tumores malignos, como el cáncer de páncreas, presentan un rápido crecimiento que provoca la aparición de zonas con hipoxia debido a una vascularización insuficiente. Tanto la falta de nutrientes como de oxígeno en estas áreas del tumor induce la apoptosis de las células tumorales (Holmgren L., O'Reilly M.S., y Folkman J., 1995; Barnhill R.L., Piepkorn M.W. y col., 1998). El efecto proliferativo descrito por Díaz y colaboradores en el carcinoma pancreático humano (Díaz V.M., Planaguma J. y col., 2002) y sugerido en la presente tesis en los tumores de los ratones *Ela1-myc* podría explicar el aumento de la apoptosis observado en los tumores con el tPA salvaje.

Así, podría suceder que el efecto mitogénico de tPA favorezca el rápido crecimiento del tumor apareciendo zonas de hipoxia que conllevan la apoptosis celular.

Recientemente se ha descrito el papel del sistema del plasminógeno en el proceso de un tipo de apoptosis (anoikis) en células de músculo liso vasculares (VSMCs). En el sistema *in vitro* estudiado, tPA proteoliza el Plg de la superficie celular generando plasmina pericelular capaz de inducir anoikis mediante la degradación de glicoproteínas de la ECM como la fibronectina, vitronectina y laminina. Dicha proteólisis implica que las células VSMC dejan de estar ancladas a la ECM, sufriendo retracción celular y muerte por anoikis (Meilhac O., Ho-Tin-Noe B. y col., 2003). Podría suceder que dicho mecanismo por el que tPA induce apoptosis en las VSMCs, a través de la activación de plasmina, fuera similar al que se da en las células tumorales de los tumores desarrollados por los ratones Ela1-myc.

Por otro lado, se ha descrito la sobreexpresión de la caspasa pro-apoptótica 3 en lesiones primarias del carcinoma pancreático (Meggiato T., Calabrese F., M. y col., 2003), así como una elevada expresión del precursor de la caspasa 1 en pancreatitis y cáncer de páncreas y de su forma activa en los tumores (Ramadani M., Gansauge F. y col., 2001). Pero también se ha detectado la sobreexpresión de la proteína con actividad anti-apoptótica BAG-3, tanto en líneas celulares pancreáticas tumorales como en tejidos de cáncer de páncreas humanos (Liao Q., Ozawa F. y col., 2001). Estos datos indican la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la apoptosis en los tumores Ela1-myc, para establecer una posible conexión entre la expresión de tPA y la activación de los componentes de la vía apoptótica.

Con el fin de obtener mayores indicios sobre el mecanismo de acción del tPA, realizamos análisis de *microarrays* de las diferencias en los perfiles de expresión génica entre los tumores de los ratones Ela1-myc y los Ela1-myc deficientes en tPA. Comparamos las diferencias de expresión específicamente en las regiones ductales neoplásicas, que es donde el tPA podría jugar un papel importante. Con ellos pretendíamos identificar moléculas que se expresaran de forma diferencial y que puedan estar relacionadas con la función del tPA en el cáncer de páncreas murino. El estudio comparativo del perfil de expresión génica entre ambos grupos reveló la existencia de 27 genes inhibidos en los ratones deficientes en tPA (ver Tabla 5 de Resultados), mientras que el número de genes inducidos era sensiblemente menor (9 genes).

Entre los genes inducidos es interesante destacar el *Extracellular proteinase inhibitor* (Expi o WDNM1). Dicho gen codifica para una proteína de 60 aminoácidos que presenta una alta homología con los inhibidores de proteasas, sugiriendo que puede codificar para una proteína con capacidad inhibidora de proteasas (Dear T.N. y Kefford R.F., 1991). Se ha detectado la sobreexpresión de WDNM-1 en líneas celulares de adenocarcinoma de rata que no poseen capacidad metastática (Dear T.N., Ramshaw I.A. y Kefford R.F., 1988) y su inhibición en un modelo de fibroblastos embrionarios de rata con potencial metastático (Steege

P.S., 1989). Dichos resultados apoyan la idea de que WDNM-1 puede actuar como supresor de metástasis en los modelos tumorales descritos. El análisis comparativo de expresión génica muestra la sobreexpresión de WDNM-1 en los ratones *Ela1-myc* deficientes en *tPA* respecto a los *Ela1-myc*. Este dato indicaría que dichos ratones tienen la capacidad metastática inhibida respecto a los ratones *salvajes* para *tPA*. El análisis previo de la aparición de focos metastáticos en estos animales, reveló una baja frecuencia de metástasis de acuerdo con lo descrito previamente (Sandgren E.P., Quaife C.J. y col., 1991), sin observar diferencias entre ambos grupos. No obstante, son necesarios experimentos adicionales para confirmar la expresión de WDNM-1 y su posible efecto en la formación de metástasis en este modelo de tumorigénesis pancreática.

De los genes regulados a la baja, puede ser de gran interés la metaloproteasa de matriz MMP-7 o matrilisina. Dicha proteasa se ha detectado expresada en lesiones premalignas epiteliales de diversos tejidos glandulares como mama, próstata e intestino (Powell W.C. y Matrisian L.M., 1996). Más interesante aún, es la sobreexpresión de matrilisina en ductos metaplásicos, tanto en humanos como en ratones, y en lesiones neoplásicas intraepiteliales pancreáticas (Crawford H.C., Scoggins C.R. y col., 2002) y en el carcinoma pancreático ductal humano (Bramhall S.R., Neoptolemos J. y col., 1997; Crnogorac-Jurcevic T., Efthimiou E., y col., 2002). En algunos estudios su expresión se correlaciona con tumores de mayor tamaño, con la presencia de metástasis en los nódulos linfáticos (Nakamura H., Horita S. y col., 2002), y con mutaciones en *K-ras* (Fukushima K., Yamamoto H. y col., 2001). La relación entre el sistema del plasminógeno y las MMPs en el cáncer de páncreas se describe en estudios en los que la plasmina, generada por la proteólisis del Plg mediante *uPA*, es capaz de degradar componentes de la ECM y también activar la pro-colagenasa MMP-1 y pro-estromelina MMP-3 (Lim Y.T., Sugiura Y. y col., 1996; Baramova E.N., Bajou K. y col., 1997). El análisis comparativo de *microarrays* muestra que la deficiencia de *tPA* conlleva una menor expresión de MMP-7. Por lo tanto, cabría esperar que la actividad de *tPA* indujera la activación de la matrilisina, al aumentar su expresión. Si esta hipótesis se confirmara con los análisis necesarios, reflejaría que *tPA* puede estar modulando la activación de MMP-7, ya sea por acción directa o bien a través de plasmina.

El gen de la *Matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein (Mglap)* está también regulado a la baja en los ratones *Ela1-myc* deficientes en *tPA*. Distribuida en el tejido conectivo, pulmón, corazón y riñón de rata (Fraser J.D. y Price P.A., 1988), *Mglap* es una proteína de matriz que requiere la vitamina-K para su *gamma*-carboxilación (Price P.A. y Williamson M.K., 1985). Se ha detectado la sobreexpresión de *Mglap* en tumores malignos de mama en humanos, tanto en tejido como en líneas celulares (Chen L., O'Bryan J.P. y col., 1990). Del mismo modo, la expresión de *Mglap* está aumentada en tumores urogenitales humanos aunque en este tipo de cáncer el aumento de indiferenciación y del tamaño del tumor así como la

presencia de metástasis en nódulos linfáticos se correlacionan con la inhibición de la expresión de Mglap (Levedakou E.N., Strohmeyer T.G., Effert P.J., and Liu E.T., 1992). Igual que en los tumores urogenitales, la expresión de Mglap está disminuída en tumores colorectales humanos malignos (Fan C., Sheu D. y col., 2001). Por otro lado, en un estudio *in vivo* de osteosarcoma metastático se observa la sobreexpresión de uPA y Mglap en las metástasis formadas en el pulmón (Fisher J.L., Mackie P.S. y col., 2001). A pesar de que en dicho estudio no se relaciona directamente el sistema del uPA con la expresión de Mglap, los resultados obtenidos con los *microarrays* en los tumores de los ratones Ela1-myc muestran que los ratones deficientes en tPA presentan una regulación a la baja de la expresión de Mglap, por lo que sería posible que tPA puede estar modulando su expresión.

Clusterin, conocida también como Apolipoproteína J es una glicoproteína con funciones diversas como la respuesta al estrés (Poon S., Easterbrook-Smith S.B. y col., 2000), senescencia (Gonos E.S., Derventzi A. y col., 1998), tumorigénesis (Marinelli M, Quaglini D. y col., 1994) y apoptosis (Trogakos I.P. y Gonos ES, 2002). Se ha detectado la sobreexpresión de *Clusterin* en varios tumores humanos incluyendo el cáncer de vejiga (Miyake H., Cleave M. y col., 2002) y el carcinoma de células renales (Miyake H., Gleave M.E. y col., 2002). En ambos se ha detectado además, que la sobreexpresión de *Clusterin* correlaciona con el aumento del potencial metastático e invasivo de los tumores y la menor supervivencia de los pacientes. En el páncreas, la sobreexpresión de la proteína *Clusterin* está asociada a los procesos de pancreatitis, cistoadenoma mucinoso y al carcinoma pancreático, sobretodo en los tumores bien o moderadamente diferenciados (Xie M.J., Motoo Y. y col., 2002). El análisis comparativo de expresión génica entre los ratones Ela1-myc y los Ela1-myc deficientes en tPA, muestra una mayor expresión de *Clusterin* cuando se expresa tPA. Dado el posible papel de *Clusterin* en el carcinoma pancreático humano y su elevada expresión en los tumores de ratones que expresan tPA, sería de interés profundizar en una posible relación entre tPA y *Clusterin* en la tumorigénesis pancreática.

Otro gen de interés es *Zinc finger protein regulador of apoptosis and cell cycle arrest (Zac-1)*. Este gen codifica para una proteína con actividad antiproliferativa que induce, mediante vías independientes, apoptosis y parada del ciclo celular en G1 (Spengler D., Villalba M. y col., 1997). También se ha descrito que puede actuar como co-activador transcripcional de p53 (Huang S.M., Schonthal A.H. y Stallcup M.R., 2001). El análisis de *microarrays* muestra que la expresión de Zac-1 está regulada a la baja en los ratones Ela1-myc deficientes para tPA, indicando que cuando hay expresión de tPA, hay más expresión de Zac-1. No obstante, la expresión de Zac-1 se asocia a un bloqueo de la proliferación y tumorigénesis, de forma contraria a lo descrito para tPA. Por ello, sería interesante aclarar esta aparente contradicción mediante otras técnicas, analizando la expresión de Zac-1 en los ratones Ela1-myc.

3.-Expresión de la anexina A2 en los tumores de páncreas murinos.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, existen datos que sugieren que diferentes funciones del tPA pueden estar mediadas por receptores de superficie celular. La AnxA2 ha sido bien caracterizada como receptor de tPA en células endoteliales (Hajjar K.A., Jacovina A. y Chacko J., 1994) pero no existen evidencias de un papel similar en células de páncreas. Estudios previos han descrito que AnxA2 está sobreexpresada en un pequeño número de tumores exocrinos pancreáticos en humanos (Vishwanatha J.K., Chiang Y. y col., 1993), en hámster (Kumble K.D., Hirota M. y col., 1992) y recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el 70% de los adenocarcinomas humanos sobreexpresan este receptor del tPA (Peiró S. y col., en revisión). Por ello analizamos la expresión de la anexina A2 en los tumores desarrollados por los ratones Ela1-TAg, Ela1-myc y Ela1-CCK2 así como en el páncreas de ratones que sobreexpresan el TGF α bajo el promotor de metalotioneina-I, MT-TGF α . Se observó expresión de AnxA2 en los tumores que presentan diferenciación ductal pero no en aquellos con fenotipo acinar, coincidiendo con la expresión de tPA anteriormente descrita. Estos resultados sugieren la existencia de un circuito funcional, en el que participa la AnxA2, que se activa en los tumores con fenotipo ductal permitiendo un aumento de la actividad catalítica del tPA en los ductos neoplásicos. Resultados recientes en nuestro laboratorio, a partir de estudios *in vitro* con anticuerpos bloqueantes anti-AnxA2, muestran que la inactivación de AnxA2 utilizando ARNs interferentes provoca la inhibición de la unión del tPA en las células tumorales pancreáticas, apoyando la idea de que la AnxA2 es el receptor fisiológico del tPA en las células del páncreas (Peiró S. y col., en revisión). Además, se ha observado que la AnxA2 está implicada en la activación de la vía de señalización de la quinasa regulada extracelularmente 1/2 (ERK1/2) inducida por tPA en las células tumorales pancreáticas, sugiriendo que la AnxA2 participa en la señalización intracelular y proliferación mediada por tPA a través de mecanismos aún desconocidos.

Por otro lado, mientras que el tPA se detecta exclusivamente en los ductos neoplásicos, AnxA2 se detecta también en los complejos ductales no neoplásicos y en zonas de diferenciación ductal en los tumores Ela1-TAg, Ela1-myc, Ela1-CCK2 y en el páncreas de los ratones MT-TGF α . Esto indicaría que la hipotética acción del tPA a través de su unión a la AnxA2 sucedería exclusivamente en los ductos neoplásicos, mientras que la función de la AnxA2 comprendería todas las estructuras ductales, sugiriendo que este receptor podría mediar funciones ajenas al tPA a través de otros ligandos y mecanismos moleculares distintos. Dichos resultados indican que los mecanismos moleculares implicados en la activación del tPA y de la AnxA2 en las células ductales no tumorales son independientes.

Finalmente, la pérdida de polaridad en la localización en la membrana de AnxA2 observada en cultivos de células pancreáticas humanas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998) se confirma en el presente estudio, en el que observamos la despolarización de la expresión de AnxA2 en las células ductales neoplásicas de los tumores Ela1-myc. Dichos resultados apoyan

la idea de que AnxA2 puede participar en la localización de la actividad proteolítica del tPA en la membrana basal de las células neoplásicas, contribuyendo a la degradación de los componentes de la ECM. No obstante, son necesarios estudios más detallados para entender mejor el papel de la AnxA2 en la tumorigénesis pancreática, siendo de gran ayuda el análisis estructural de la interacción tPA/AnxA2 (Roda O., Valero M.L. y col., 2003) y el estudio de ratones deficientes en el gen que codifica para esta proteína.

4.- El uPA en los tumores pancreáticos murinos

Numerosos estudios relacionan el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) con gran variedad de cánceres humanos. Existen evidencias, a partir de ensayos de migración *in vitro*, que apoyan el papel de uPA en la migración celular mediante la generación de plasmina en los sitios de adhesión focal (Andreasen P.A., Kjoller L., y col., 1997). No obstante, uPA también es capaz de inducir la migración independiente de la generación de plasmina en células de cáncer de mama (Nguyen D.H., Hussaini I.M. y Gonias S.L., 1998), de pulmón (Busso N., Masur S.K. y col., 1994) y de colon (Wilson A.J. y Gibson P.R., 2000), mediante la estimulación de la unión de uPAR a vitronectina y la modulación de las interacciones uPAR a integrinas y/o la iniciación de cascadas de transducción de señales (Andreasen P.A., Kjoller L., y col., 1997). Por otro lado, estudios de invasión *in vitro*, sugieren que la generación de plasmina en la superficie de las células por la unión de uPA a uPAR es necesaria para la invasión de las células a través de la ECM. La necesidad de la activación del Plg, catalizada por uPA, también se ha puesto de manifiesto en la progresión tumoral, invasión local del tumor y formación de metástasis distantes en modelos experimentales de metástasis tumoral y en cánceres humanos (Andreasen P.A., Kjoller L. y col., 1997).

Estudios previos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demuestran que uPA, igual que tPA, contribuye al comportamiento invasivo de las células tumorales pancreáticas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998). Adicionalmente, se observó *in vitro*, que el HGFS/SF estimula la motogénesis (o invasión) de las células tumorales pancreáticas IMIM-PC-2 gracias a la activación del sistema uPA/uPAR y la generación de plasmina (Paciucci R., Vila M.R. y col., 1998). En el análisis inmunohistoquímico, la sobreexpresión de uPA y uPAR se detecta mayoritariamente en las zonas de pancreatitis peritumoral pero no en zonas neoplásicas (Paciucci R., Tora M. y col., 1998), apoyando la idea de que uPA/uPAR están implicados en los procesos de remodelación tisular e invasión de células tumorales pero no en la tumorigénesis pancreática humana.

Para estudiar el papel de uPA en nuestro sistema, nos propusimos analizar la expresión de la proteasa en los mismos modelos murinos utilizados para el análisis de tPA. No obstante, existe una gran dificultad para obtener anticuerpos que reconozcan específicamente el uPA en tejido murino y, pese a probar varios, no fue posible poner a punto la técnica de

inmunotinción. Por ello, no tenemos datos de la expresión de uPA en el páncreas exocrino normal murino ni en los tumores pancreáticos de los diferentes modelos murinos de tumorigénesis pancreática utilizados. Paralelamente se había iniciado el estudio de supervivencia de los ratones *Ela1-myc* deficientes en uPA a partir del cruce de los ratones transgénicos *Ela1-myc* con los *knock out* para uPA (*uPA^{-/-}*). Los resultados obtenidos en los ratones *Ela1-myc:uPA^{+/-}* no muestran diferencias en la supervivencia respecto a los *Ela1-myc*. No obstante, a pesar de que los datos en humanos apoyan la idea de que uPA no está implicado en la tumorigénesis pancreática, no podemos descartar un posible papel del uPA en el progresión tumoral pancreática murina. Por ello, necesitamos los datos de una muestra significativa de animales *Ela1-myc:uPA^{-/-}* para tener resultados más concluyentes.

5.- Efecto de la sobreexpresión del tPA en el páncreas murino

Una vez observado el papel del tPA en la progresión tumoral pancreática murina, nos interesó estudiar si la proteasa por si sola puede ser importante en la patología pancreática, y por otro lado, como influye el contexto celular en el que se expresa tPA a sus efectos. Para ello, hemos generados dos ratones transgénicos que sobreexpresan tPA tanto en células acinares como en células ductales, utilizando los promotores de elastasa 1 (*Ela1-tPA*) y citoqueratina 19 (*CK19-tPA*) respectivamente. El segundo modelo se encuentra en una fase preliminar por lo que todavía no tenemos resultados.

Respecto a los ratones *Ela1-tPA*, hemos observado que los animales son viables y llegan a la edad adulta sin síntomas visibles. A nivel macroscópico, el páncreas de los animales adultos presenta un aspecto normal y los análisis histológicos no muestran alteraciones en el tejido pancreático, sugiriendo que la sola expresión de tPA no es suficiente para inducir patología en el páncreas. No obstante, no se puede descartar que para observar algún efecto sean necesarios niveles superiores de expresión de tPA. A pesar de que los promotores utilizados son muy activos en células pancreáticas, es posible que sea necesario su acción en homocigosis para observar efectos patológicos. Con el fin de mejorar las condiciones del estudio, se están realizando cruces entre los animales portadores del transgén *Ela1-tPA^{+/-}* entre ellos para obtener animales transgénicos *Ela1-tPA^{+/+}*, que presentarán niveles de expresión de la proteína más elevados.

Con el objetivo de analizar las moléculas inhibidas o activadas por la inducción de tPA, utilizamos los ratones *Ela1-tPA* para hacer análisis de expresión génica diferencial, mediante *microarrays*, entre estos ratones y ratones control (*salvajes*). Debido a la gran similitud del perfil génico de los dos grupos estudiados, así como la temprana edad de los animales analizados (2 meses) y a la condición heterocigota de los ratones *Ela1-tPA*, no se han observado grandes diferencias en los niveles de expresión. No obstante, es interesante resaltar el gen

Thrombospondin Repeat Containing 1 (TSRC-1) por ser el único que está sobreexpresado en los dos experimentos realizados. Dicho gen, caracterizado recientemente, codifica para una proteína que contiene siete repeticiones de tipo 1 trombospondina (Buchner D.A. y Meisler M.H., 2003). La trombospondina es un inhibidor de la angiogénesis que modula la proliferación, motilidad y adhesión celular, presentando su actividad antiproliferativa en una secuencia de la repetición tipo 1 del dominio amino-terminal (Vogel T., Guo N.H. y col., 1993). Estudios de la repetición 1 de trombospondina revelan que su capacidad de inhibir la vascularización se da a través de dos dominios independientes, uno de ellos bloquea las señales angiogénicas de las células endoteliales inhibiendo FGF-2, mientras que la otra región inhibe VEGF (Iruela-Arispe M.L., Lombardo M. y col., 1999). En el estudio comparativo de expresión génica entre los ratones *Ela1-tPA+/-* y control, se observa una ligera sobreexpresión de TSRC-1 en los ratones que sobreexpresan tPA, contradiciendo el efecto proliferativo y angiogénico de tPA anteriormente descrito. Este dato se debería confirmar ya que el análisis es muy preliminar y no se ha realizado en las mejores condiciones. Por ello es necesario repetir el experimento con animales homocigotos *Ela1-tPA+/+* y de edad más avanzada.

CONCLUSIONES

- 1- El tPA no se expresa en ningún tipo celular epitelial en el páncreas normal de ratón ni en los ductos metaplásicos.
- 2- En los modelos murinos de tumorigénesis pancreática, tPA se detecta específicamente en las regiones del tumor que presentan diferenciación ductal pero no es detectable en los tumores con diferenciación acinar.
- 3- El receptor de tPA, anexina A2 se expresa en los conductos pancreáticos normales, en los conductos metaplásicos y en las regiones del tumor que presentan diferenciación ductal. Esta distribución sugiere que, si bien anexina A2 puede actuar como receptor de tPA en el tumor, también puede desempeñar otras funciones independientes de tPA en situaciones donde no hay transformación tumoral.
- 4- tPA no es necesario para la transdiferenciación acinar ductal.
- 5- La inactivación del gen del *tPA* en los tumores correlaciona con una mayor supervivencia. Además, los tumores de los ratones *Ela1-myc:tPA^{-/-}* presentan menor vascularización y proliferación celular mientras que no se observan diferencias en invasión nerviosa, vascular o ganglionar. Estos datos indican que el mecanismo de acción del tPA *in vivo* sería promoviendo la angiogénesis y crecimiento tumoral.
- 6- Se han generado ratones transgénicos que sobreexpresan *tPA* bajo el control del promotor de elastasa 1 (*Ela1-tPA*) y de citoqueratina 19 (*CK19-tPA*) que se encuentran en fase de caracterización.

BIBLIOGRAFÍA**A**

AGA. 1999. American gastroenterological association medical position statement: epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 117:1463-1484.

Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N, and Perucho M. 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53:549-554.

Andreasen,P.A., R.Egelund, and H.H.Petersen. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol. Life Sci.* 57:25-40.

Andreasen,P.A., Kjoller L., L.Christensen, and Duffy M.J. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J Cancer* 72:1-22.

Andreasen,P.A., Petersen L.C., and K.Dano. 1991. Diversity in catalytic properties of single-chain and two chain tissue-type plasminogen activator. *Fibrinolysis* 5:207-215.

Appella E., Robinson E.A., Ullrich S.J., M.P.Stoppelli, Corti A., and Cassani G. 1987. The receptor-binding sequence of urokinase: a biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol. Chem.* 262:4437-4440.

Au Y.P., Dobrowolska G., Morris D.R., and Clowes A.W. 1994. Heparin decreases activator protein-1 binding to DNA in part by posttranslational modification of Jun B. *Circ. Res.* 75:15-22.

B

Bajou,K., V.Masson, R.D.Gerard, P.M.Schmitt, V.Albert, M.Praus, L.R.Lund, T.L.Frandsen, N.Brunner, K.Dano, N.E.Fusenig, U.Weidle, G.Carmeliet, D.Loskutoff, D.Collen , P.Carmeliet, J.M.Foidart, and A.Noel. 2001. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol.* 152:777-784.

Balague C, Audie J.P., Porchet N., and F.X.Real. 1995. In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign, and malignant pancreas tissues. *Gastroenterology* 109:953-964.

Baramova E.N., Bajou K., Remacle A., L'Hoir C., Krell H.W., Weidle U.H., Noel A., and Foidart J.M. 1997. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP9 and in the second step of pro-MMP2 activation. *FEBS Lett.* 405:157-162.

Bardeesy, N., N.E. Sharpless, R.A. DePinho, and G. Merlino. 2001. The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model. *Semin. Cancer Biol.* 11:201-218.

Barnard J.A., Beauchamp R.D., Russell W.E., Dubois R.N., and Coffey R.J. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 108:564-580.

Barnard J.A., Graves-Deal R., Pittelkow M.R., Dubois R.N., Cook P., Ramsey G.W., Bishop P.R., Damstrup L., and Coffey R.J. 1994. Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. *J Biol. Chem.* 269:22817-22822.

Barnhill R.L., Piepkorn M.W., Cochran A.J., Flynn E., Karaoli T., and Folkman J. 1998. Tumor vascularity, proliferation, and apoptosis in human melanoma micrometastases and macrometastases. *Arch. Dermatol.* 134:991-994.

Barton C.M., Hall P.A., Huges C.M., Gullick W.J., and Lemoine N.R. 1991. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol.* 163:111-116.

Bell R.H.Jr., Memoli V.A., and Longnecker D.S. 1990. Hyperplasia and tumors of the islets of Langerhans in mice bearing an elastase I-SV40 T-antigen fusion gene. *Carcinogenesis* 11:1393-1398.

Birchmeier C. and Gherardi E. 1998. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 8:404-410.

Blasi, F. 1993. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15:105-111.

Blasi, F. and Carmeliet P. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:932-943.

Blasi, F., Vassalli J.D., and K. Dano. 1987. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol.* 104:801-804.

Bockman D.E. 1993. Anatomy of the Pancreas. In *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. Vay Liang W.go, E.P. Di Magno, Gardner J.D., Lebenthal E., Reber H.A., and Scheele G.A, editors. Raven Press, Ltd., New York. 1-8.

Bramhall S.R., J. Neoptolemos, G. Stamp, and Lemoine N.R. 1997. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol.* 182:347-355.

Brembeck F.H., Moffett J., Wang T.C., and Rustgi A.K. 2001. The keratin 19 promoter is potent for cell-specific targeting of genes in transgenic mice. *Gastroenterology* 120:1720-1728.

Brembeck F.H. and Rustgi A.K. 1999. The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. *J Biol. Chem.* 275:28230-28239.

Brownstein, C., Falcone D.J., Jacovina A., and Hajjar K.A. 2001. A mediator of cell surface-specific plasmin generation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947:143-155.

Buchner D.A. and Meisler M.H. 2003. TSR1, a widely expressed gene containing seven thrombospondin type I repeats. *Gene* 307:23-30.

Bugge T.H., Kombrinck K.W., and Xiao Q. 1997. Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. *Blood* 90:4522-4531.

Bugge, T.H., Flick M.J., Danton M.J., Daugherty C.C., Romer J., and K.Dano. 1996. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:5899-5904.

Bugge, T.H., Flick M.J., Daugherty C.C., and J.Degen. 1995. Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev.* 9:794-807.

Bugge, T.H., Kombrinck K.W., Flick M.J., Daugherty C.C., Danton M.J., and J.Degen. 1996. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 87:709-719.

Bugge, T.H., L.R.Lund, Kombrinck K.K., Nielsen B.S., Holmback K., A.Drew, Flick M.J., Witte D.P., Dano K., and J.L.Degen. 1998. Reduced metastasis of Polyoma virus middle T antigen-induced mammary cancer in plasminogen-deficient mice. *Oncogene* 16:3097-3104.

Bulens, F., Ibanez-Tallon I., Van Acker P., De Vriese A., Nelles L., A.Belayew, and Collen D. 1995. Retinoic acid induction of human tissue-type plasminogen activator gene expression via a direct repeat element (DR5) located at -7 kilobases. *J Biol. Chem.* 270:167-175.

Bulens, F., P.Merchiers, Ibanez-Tallon I., De Vriese A., Nelles L., Claessens F., A.Belayew, and Collen D. 1997. Identification of a multihormone responsive enhancer far upstream from the human tissue-type plasminogen activator gene. *J Biol. Chem.* 272:663-671.

Busso N., Masur S.K., Lazega D., Waxman S., and Ossowski L. 1994. Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J Cell Biol.* 126:259-270.

C

Cajot J.F., Bamat J., Bergonzelli G.E., Kruithof E.K., R.L.Medcalf, Testuz J., and Sordat B. 1990. Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:6939-6943.

Cajot J.F., Sordat B., and Bachmann F. 1986. Human primary colon carcinomas xenografted into nude mice. II. Modulation of tumor plasminogen activator activity by the host tissue environment. *J Natl. Cancer Inst.* 77:1099-1107.

Caldas C, Hahn S.A., Hruban R.H., Redston M.S, Yeo C.J. and Kern S.E. 1994. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Research* 54:3568-3573.

Carballo F. y de la Morena J. Enfermedades del páncreas. *Tratado de Medicina Interna*. Díaz-Rubio M., Espinós D. editores. Editorial Panamericana. 1345-1363.

Carder P., Wyllie A.H., Purdie C.A., Morris R.G., White S., Piris J., and Bird C.C. 1993. Stabilised p53 facilitates aneuploid clonal divergence in colorectal cancer. *Oncogene* 8:1397-1401.

Carmeliet P. and Collen D. 1998. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb. Res.* 91:255-285.

Carmeliet P., L.Moons, H.R.Lijnen, Janssens S., F.Lupu, Collen D., and R.D.Gerard. 1997. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation.* 96:3180-3191.

Carmeliet,P., Schoonjans L., L.Kieckens, B.Ream, J.Degen, R.Bronson, R.De Vos, J.J.van den Oord, D.Collen, and R.C.Mulligan. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368:419-424.

Ceci J.D., Kovatch R.M., Swing D.A., Jones J.M., Snow C.M., Rosenberg M.P., Jenkins N.A., Copeland N.G., and Meisler M.H. 1991. Transgenic mice carrying a murine amylase 2.2/SV40 T antigen fusion gene develop pancreatic acinar cell and stomach carcinomas. *Oncogene* 6:323-332.

Cesarman,G.M., Guevara C.A., and Hajjar K.A. 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol. Chem.* 269:21198-21203.

Chambers A.F., and Matrisian L.M. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:1260-1270

Chapman, H.A. 1997. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:714-724.

Chen L., O'Bryan J.P., Smith H.S., and Liu E.T. 1990. Overexpression of matrix Gla protein mRNA in malignant human breast cells: isolation by differential cDNA hybridization. *Oncogene*. 1990 Sep;5(9):1391-5. 5:1391-1395.

Chen, Z.L. and Strickland S. 1997. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91:917-925.

Choong P.F, Ferno M., Akerman M., Willen H., Langstrom E., Gustafson P., Alvegard T., and Rydholm A. 1996. Urokinase-plasminogen-activator levels and prognosis in 69 soft-tissue sarcomas. *Int. J Cancer* 69:268-272.

Christofori G., Naik P., and Hanahan D. 1995. Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* 9:1760-1770.

Clarke A.R., Cummings M.C., and Harrison D.J. 1995. Interaction between murine germline mutations in p53 and APC predisposes to pancreatic neoplasia but not to increased intestinal malignancy. *Oncogene* 11 :1913-1920.

Clerc, P., S. Leung-Theung-Long, T.C.Wang, G.J.Dockray, M.Bouisson, M.B.Delisle, N.Vaysse, L.Pradayrol, D.Fourmy, and M.Dufresne. 2002. Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia. *Gastroenterology* 122:428-437.

Collen, D. 1980. On the regulation of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 43:77-89.

Collen, D. and H.R.Lijnen. 1995. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb. Haemost.* 74:167-171.

Colombi M., Belloti D., De Petro G., and S.Barlati. 1995. Plasminogen activators in nude mice xenotransplanted with human tumorigenic cells. *Invasion Metastasis* 15:22-33.

Costa, M., Y.Shen, F.Maurer, and R.L.Medcalf. 1998. Transcriptional regulation of the tissue-type plasminogen-activator gene in human endothelial cells: identification of nuclear factors that recognise functional elements in the tissue-type plasminogen-activator gene promoter. *Eur J Biochem.* 258:123-131.

Crawford, H.C., C.R.Scoggins, M.K.Washington, L.M.Matrisian, and S.D.Leach. 2002. Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin. Invest* 109:1437-1444.

Crnogorac-Jurcevic,T., E.Efthimiou, T.Nielsen, J.Loader, B.Terris, G.Stamp, A.Baron, A.Scarpa, and N.R.Lemoine. 2002. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. *Oncogene* 21:4587-4594.

Cubellis M.V., Andreasen P.A., Ragno P., Mayer M., Dano K., and Blasi F. 1989. Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:4828-4832.

Cubilla A.L. and Fitzgerald P.J. 1976. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res.* 36:2690-2698.

Curino A., Mitola D.J., Aaronson H., McMahon G.A, Raja K., Keegan A.D., Lawrence D.A., and Bugge T.H. 2002. Plasminogen promotes sarcoma growth and suppresses the accumulation of tumor-infiltrating macrophages. *Oncogene* 21:8830-8842.

Czekay, Kuemmel T.A., Orlando R.A., and Farquhar M.G. 2001. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein (LRP) is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol. Cell* 12:1467-1479.

D

D'Cruz,C.M., E.J.Gunther, R.B.Boxer, J.L.Hartman, L.Sintasath, S.E.Moody, J.D.Cox, S.I.Ha, G.K.Belka, A.Golant, R.D.Cardiff, and L.A.Chodosh. 2001. cMYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat. Med.* 7:235-239.

Dano,K., Andreasen P.A., Grondahl-Hansen J., P.Kristensen, L.S.Nielsen, and L.Skriver. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44:139-266.

Davis B.P., Messing A., Hammer R.E., and MacDonald R.J. 1992. Selective expression of trypsin fusion genes in acinar cells of the pancreas and stomach of transgenic mice. *J Biol. Chem.* 267:26070-26077.

De Petro G., Tavian D., A.Copeta, Portolani N., Giulini S.M., and Barlati S. 1998. Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), uPA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 58:2234-2239.

De Petro,G., A.Copeta, and S.Barlati. 1994. Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 213:286-294.

de Vries T.J., Mooy C.M., Van Balken M.R., Luyten G.P., Quax P.H., H.W.Verspaget, Weidle U.H., D.J.Ruiter, and G.N.van Muijen. 1995. Components of the plasminogen activation system in uveal melanoma--a clinico-pathological study. *J Pathol.* 175:59-67.

Dear T.N. and Kefford R.F. 1991. The WDNM1 gene product is a novel member of the 'four-disulphide core' family of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:247-254.

Dear T.N., Ramshaw I.A., and Kefford R.F. 1988. Differential expression of a novel gene, WDNM1, in nonmetastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 48:5203-5209.

Derynck R., Goeddel D.V., Ullrich A., Gutterman J.U., Williams R.D., Bringman T.S., and Berger W.H. 1987. Synthesis of mRNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by humans tumors. *Cancer Res.* 47:707-712.

Deutinger J., Kirchheimer J.C., Reinthaller A., Christ G., Tatra G., and Binder B.R. 1988. Elevated tissue type plasminogen activator in human granulosa cells correlates with fertilizing capacity. *Hum. Reprod.* 3:597-599.

DiGiusseppe J.A., Hruban R.H, Goodman S.N., Polak M., van den Berg F.M., Allison D.C., Cameron J.L., and Offerhaus G.J.A. 1994. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 101:684-688.

Díaz,V.M., Planaguma J., T.M.Thomson, J.Reventos, and R.Paciucci. 2002. Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 122:806-819.

Duffy M.J., O'Grady P., Simon J., Rose M., and H.R.Lijnen. 1986. Tissue-type plasminogen activator in breast cancer: relationship with estradiol and progesterone receptors. *J Natl. Cancer Inst.* 77:621-623.

Duffy,M.J., O'Grady P., Devaney d., O'Siorain L., Fennelly J.J., and H.R.Lijnen. 1988. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62:531-533.

Duffy,M.J., Reilly D., O'Sullivan C., O'Higgins N., Fennelly J.J., and Andreasen P.A. 1990. Urokinase-plasminogen activator, a new independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res.* 50:6827-6829.

Dugan M.C., Dergham S.T., Kucway R., Singh K., Biernat L., Du W., Vaitkevicius V.K., Crissman J.D., and Sarkar F.H. 1997. HER2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 14:229-236.

Duggan C., Maguire T., McDermott E., O'Higgins N., Fennelly J.J., and Duffy M.J. 1995. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. *Int. J Cancer* 61:597-600

E

Ebert M., Yokoyama M., Kobrin M.S., H.Friess, Lopez M.E., Buchler M.W., Johnson G.R., and Korc M. 1994. Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 54:3959-3962.

Edlund H. 2002. Pancreatic organogenesis developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Rev Genetics* 3:524-532.

Ehrlich, J.S., Keijer J., K.T.Preissner, Gebbink R.K., and Pannekoek H. 1991. Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. *Biochemistry* 30:1021-1028.

Ellis V., Behrendt N., and K.Dano. 1990. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase: a kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol. Chem.* 266:12752-12758.

Ellis V. and K.Dano. 1992. The urokinase receptor and the regulation of cell surface plasminogen activation. *Fibrinolysis* 6:27-34.

Emoto, K., Sawada H., Y.Yamada, H.Fujimoto, Y.Takahama, M.Ueno, T.Takayama, H.Uchida, K.Kamada, A.Naito, S.Hirao, and Y.Nakajima. 2001. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 21:1339-1345.

Escaffit, F., A.Estival, C.Bertrand, N.Vaysse, E.Hollande, and F.Clemente. 2000. FGF-2 isoforms of 18 and 22.5 kDa differentially modulate tPA and PAI-1 expressions on the pancreatic carcinoma cells AR4-2J: consequences on cell spreading and invasion. *Int. J Cancer* 85:555-562.

Evans D.M. and Lin P.L. 1995. Suppression of pulmonary metastases of rat mammary cancer by recombinant urokinase plasminogen activator inhibitor. *Am. Surg.* 61:692-696.

Evans, D.B., J.L.Abbuzzese, and C.G.Willet. 2001. Cancer of the pancreas. In *Cancer. Principles and practice of oncology*. V.H.De Vita, S.Hellman, and S.Rosenberg, editors. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1126-1161.

F

Fages C., Nolo R., Huttunen H.J., Eskelinen E., and Rauvala H. 2000. Regulation of cell migration by amphotericin. *J Cell Sci.* 113:611-620.

Falcone, D.J., McCaffrey T.A., Haimovitz-Friedman A., Vergilio J.A., and Nicholson A.C. 1993. Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors: role of plasminogen activation. *J Biol. Chem.* 268:11951-11958.

Fan C., Sheu D., Fan H., Hsu K., Allen Chang C., and Chan E. 2001. Down-regulation of matrix Gla protein messenger RNA in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Lett.* 165:63-69.

Felez J., Chanquia C.J, and Fabregas P. 1993. Competition between plasminogen and tPA for cellular binding sites. *Blood* 82:2433-2441.

Fisher J.L., Mackie P.S., Howard M.L, Zhou H., and Choong P.F. 2001. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1654-60 7:1654-1660.

Fisher P.B. and Grant S. 1985. Effects of interferon on differentiation of normal and tumor cells. *Pharmacol Ther.* 27:143-166.

Forrester K, Almoguera C, Han K., Grizzle W.E., and Perucho M. 1987. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*298-303.

Fraser J.D. and Price P.A. 1988. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. *J Biol. Chem.* 263:11036.

Friedman,G.C. and Seeds N.W. 1994. Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 81:41-49.

Friess,H., Yakamada Y., Kobrin M.S., Do D.A., M.Buchler, and Korc M. 1995. Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumour progression. *Clin Cancer Res.* 1:1413-1420.

Fukushima K., Yamamoto H., Itoh F., Nakamura H., Min Y., Horiuchi S., Iku S., Sasaki S., and Imai K. 2001. Association of matrilysin mRNA expression with K-ras mutations and progression in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 22:1049-1052.

G

Ganesh S., Sier C.F., Griffioen G., Vloedgraven H.J., de Boer A., Welvaart K., van de Velde C.J., van Krieken J.H., Verheijen J.H., and Lamers C.B. 1994. Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res.* 54:4065-4071.

Genton C., Kruithof E.K., and W.D.Schleuning. 1987. Phorbol ester induces the biosynthesis of glycosylated and nonglycosylated plasminogen activator inhibitor 2 in high excess over urokinase-type plasminogen activator in human U-937 lymphoma cells. *J Cell Biol.* 104:705-712.

Gerke,V. and Moss S.E. 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1357:129-154.

Gerke, V. and Weber K. 1984. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J* 3:227-233.

Glasner S., Memoli V.A., and Longnecker D.S. 1992. Characterization of the ELSV transgenic mouse model of a pancreatic carcinoma. Histologic type of large and small tumors. *American J of Pathology* 140:1237-1245.

Goggins M., Hruban R.H, and Kern S.E. 2000. The late temporal pattern of BRCA2 inactivation in pancreatic intraductal neoplasia: evidence and implications. *Am. J Pathol.* 156:1767-1771.

Gold L.I. and Korc M. 1994. Expression of transforming growth factor-beta1, 2 y 3 mRNA and protein in human cancers. *Dig Surg* 11:150-156.

Gonias S.L., Hembrough T.A., and Sankovic M. 2001. Cytokeratin 8 functions as a major plasminogen receptor in select epithelial and carcinoma cells. *Front Biosci.* 6:D1403-D1411.

Gonos E.S., Derventzi A., Kveibog M., Agiostratidou G., Kassem M., Clark B.F., Jat P.S., Rattan S.I. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp. Cell. Res.* 240:66-74.

Gospodarowicz D., Neufeld G., and Schweigerer L. 1986. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ.* 19:1-17.

Grenberger N., Toskes P., and Isselbacher K.J. 1991. Acute and chronic pancreatitis. *In Harrison's. Principles of internal medicine.* Wilson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Martin J.B., Fauci A., and Root R., editors. McGraw-Hill, Inc., New York, St.Louis, San Francisco, Colorado Springs, Auckland, Bogota, Caracas, Hamburg, Lisbon, London, Madrid, Mexico, Milan, Montreal, New Delhi, Paris, San Juan, Sao Paulo, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto. 1372-1383.

Grippo P.J., Nowlin P.S., Demeure M.J., Longnecker D.S., and Sandgren E.P. 2003. Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer Res.* 63:2016-2019.

Grondahl-Hansen, J., Bach F., and Munkholm-Larsen P. 1990. Tissue-type plasminogen activator in plasma from breast cancer patients determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Br. J Cancer* 61:412-414.

Grondahl-Hansen, J., Lund L.R., E.Ralfkiaer, Ottvanger V., and K.Dano. 1988. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest. Dermatol.* 90:790-795.

Gunzler,W.A., Steffens G.J., Otting F., Kim S.M., Frankus E., and Flohe L. 1982. The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine: the complete amino acid sequence of the A chain. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 363:1155-1165.

Gyetko M.R., Chen G.H., MacDonald R.A., Goodman R., Huffnagle G.B., and Wilkinson C.C. 1996. Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*: a murine transgenic model. *J Clin. Invest* 97:1818-1826.

H

Hajjar,K.A. 1995. Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. *Thromb. Haemost.* 74:294-301.

Hajjar,K.A. and S.S.Acharya. 2000. Annexin II and regulation of cell surface fibrinolysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902:265-271.

Hajjar,K.A., Guevara C.A., Lev E., K.Dowling, and Chacko J. 1996. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol. Chem.* 271:21652-21659.

Hajjar,K.A., P.C.Harpel, E.A.Jaffe, and R.L.Nachman. 1986. Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. *J Biol. Chem.* 261:11656-11662.

Hajjar,K.A., Jacovina A., and Chacko J. 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol. Chem.* 269:21191-21197.

Hajjar,K.A. and Krishnan S. 1999. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc. Med.* 9:128-138.

Hajjar,K.A., Mauri L., Jacovina A., F.Zhong, U.A.Mirza, J.C.Padovan, and B.T.Chait. 1998. Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol. Chem.* 273:9987-9993.

Hajjar,K.A. and R.L.Nachman. 1988. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. *J Clin. Invest* 82:1769-1778.

Hall P.A., Huges C.M., Staddon S.L., Richman P.I., Gullick W.J., and Lemoine N.R. 1990. The c-erbB-2 proto-oncogene in human pancreatic cancer. *J Pathol.* 161:195-200.

Hall P.A. and Lemoine N.R. 1992. Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. *J Pathol.* 166:97-103.

Hamad,N.M., Elconin J.H., A.E.Karnoub, W.Bai, J.N.Rich, R.T.Abraham, C.J.Der, and C.M.Counter. 2002. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev.* 16:2045-2057.

Han,H., D.J.Bearss, L.W.Browne, R.Calaluce, R.B.Nagle, and D.D.Von Hoff. 2002. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res.* 62:2890-2896.

Hanahan D. 1989. Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 246:1265-1274.

Hanahan D. and Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.

Hanahan D. and Weinberg R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57-70.

Harvey M., McArthur M.J., Montgomery C.A.Jr, Bradley A., and Donehower L.A. 1993. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J* 7:938-943.

Hastings G.A., Coleman T.A., Haudenschild C.C., Stefansson S., Smith E.P., Barthlow R., Cherry S., Sandkvist M., and Lawrence D.A. 1997. Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *J Biol. Chem.* 272:33062-33067.

Hasui Y., Marutsuka k., Suzumiya J., Kitada S., Osada Y., and Sumiyoshi A. 1992. The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer. *Int. J Cancer* 50:871-873.

Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry* 62:1180-1190.

Heeb M.J., Espana F., Geiger M., D.Collen, Stump D.C., and Griffin J.H. 1987. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol. Chem.* 262:15813-15816.

Heicappell,R., Wettig I.C., M.Schostak, M.Muller, U.Steiner, T.Sauter, and K.Miller. 1999. Quantitative detection of human complement factor H-related protein in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol.* 35:81-87.

Heiss M.M., Allgayer H., Gruetzner K.U., Funke I., Babic R., Jauch K.W., and Schildberg F.W. 1995. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat. Med.* 1:1035-1039.

Herbert J.M., Lamarche I., and Carmeliet P. 1997. Urokinase and tissue-type plasminogen activator are required for the mitogenic and chemotactic effects of bovine fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB for vascular smooth muscle cells. *J Biol. Chem.* 272:23585-23591.

Herlyn D., Iliopoulos D., Jensen P.J., Parmiter A., Baird J., Hotta H., Adachi K., Ross A.H., Jambrosic J., Koprowski H., and y col. 1990. In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res.* 50:2296-2302.

Hilgers W and Kern S.E. 1999. Molecular Genetic Basis of Pancreatic Adenocarcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* 26:1-12.

Hofmann R., Lehmer A., Buresch M., Hartung R., and Ulm K. 1996. Clinical relevance of urokinase plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 78:487-492.

Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., and Harris C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.

Holmberg M., Leonardsson G. and Ny T. 1995. The species-specific differences in the cAMP regulation of the tissue-type plasminogen activator gene between rat, mouse and human is caused by a one-nucleotide substitution in the cAMP-responsive element of the promoters. *Eur J Biochem.* 231:466-474.

Holmgren L., O'Reilly M.S., and Folkman J. 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* 1:149-153.

Hruban RH and et.al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. 25[American journal of Surgical Pathology], 579-586. 2001.
Ref Type: Generic

Hruban,R.H., Wilentz R.E., and Kern S.E. 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J Pathol.* 156:1821-1825.

Hruban,R.H., C.J.Yeo, and Kern S.E. 2001. Pancreatic cancer. *In* The metabolic and molecular basis of inherited disease. C.R.Scriver, A.L.Beaudet, W.S.Sly, and D.Valle, editors. McGraw-Hill, New York. 1077-1090.

Huang S.M., Schonthal A.H., and Stallcup M.R. 2001. Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Oncogene* 20:2134-2143.

I

Iacobuzio-Donahue C.A., Maitra A, Olsen M., Lowe A.W., van Heek N.T., Sato N., Parker A., Ashfaq R., Jafee E., Ryu B., Jones J., R.Eshleman H, Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H., Brown P.O., and Goggins M. 2003. Exploration of Global Gene expression Patterns in Pancreatic Adenocarcinoma using cDNA Microarrays. *Am. J Pathol.* 162:1151-1162.

Ichinose A., Kisiel W., and Fujikawa K. 1984. Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Lett.* 175:412-418.

Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P., Montero L., Koziczak M., and Nagamine Y. 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* 56:104-132.

Iruela-Arispe M.L., Lombardo M., Kruttsch H.C., Lawler J., and Roberts D.D. 1999. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100:1423-1431.

Itakura J., Ishiwata T, H.Friess, Fujii H., Matsumoto Y., M.Buchler, and Korc M. 1997. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res.* 3:1309-1316.

Ito K., Ryuto M., Ushiro S., Ono M., Sugeno A., Kuraoka A., Shibata Y., and Kuwano M. 1995. Expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor couples with development of capillary network by human microvascular endothelial cells on Matrigel. *J Cell Physiol.* 162:213-224.

J

Jacks T., Remington L., Williams B.O., Scmitt E.M, Halachmi S., Bronson R.T., and Weinberg R.A. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol.* 4:1-7.

Jaffee,E.M., Hruban R.H., M.Canto, and Kern S.E. 2002. Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell* 2:25-28.

Jain,M., C.Arvanitis, K.Chu, W.Dewey, E.Leonhardt, M.Trinh, C.D.Sundberg, J.M.Bishop, and D.W.Felsher. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297:102-104.

Janicke F., Schmitt M., Pache L., Ulm K., Harbeck N., Hofler H., and Graeff H. 1993. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 24:195-208.

Jhappan C., Stable C., Harkins R.N., Fausto N., Smith G.H., and G.Merlino. 1990. TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61:1137-1146.

Johnson G.R., Saeki T., Gordon A.W., Shoyab M., Salomon D.S., and Stromberg K. 1992. Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol.* 118:741-751.

Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., and Edlund H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-609.

K

Kang,H.M., Kassam G., S.E.Jarvis, S.L.Fitzpatrick, and Waisman D.M. . 1997. Characterization of human recombinant annexin II tetramer purified from bacteria: role of N-terminal acetylation. *Biochemistry* 36:2041-2050.

Kassam,G., Choi K.S., J.Ghuman, Kang H.M. , S.L.Fitzpatrick, T.Zackson, S.Zackson, M.Toba, A.Shinomiya, and Waisman D.M. 1998. The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol. Chem.* 273:4790-4799.

Keski-Oja J. and Vaheri A. 1982. The cellular target for the plasminogen activator, urokinase, in human fibroblasts -66,000 dalton protein. *Bichim. Biophys. Acta* 720:141-146.

Kiehne k., Herzig K.H., and Folsch U.R. 1997. C-met expression in pancreatic cancer and effects of hepatocyte growth factor on pancreatic cancer cell growth. *Pancreas* 15:35-40.

Kim J.H., Ho S.B, Montgomery C.K., and Kim Y.S. 1990. Cell lineage markers in human pancreatic cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 880:1-4.

Kim S.J, Shiba E., Kobayashi T., Yayoi E., Furukawa J., Takatsuka Y. , Shin E., Koyama H., Inaji H., and Takai S. 1998. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (uPA), PA inhibitor type-1, and tissue-type PA antigen levels in node-negative breast cancer: a prospective study on multicenter basis. *Clin Cancer Res.* 4:177-182.

Kim,J. and Hajjar K.A. 2002. Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci.* 7:D341-D348.

Kinder D.H., Berger M.S., Mueller B.A., and Silber J.R. 1993. Urokinase plasminogen activator is elevated in human astrocytic gliomas relative to normal adjacent brain. *Oncol. Res.* 5:409-414.

Kinzler K.W. and Vogelstein B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87:159-70.

Kirchheimer J.C., Wotja J., Christ G., and Binder B.R. 1989. Functional inhibition of endogenously produced urokinase decreases cell proliferation in a human melanoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:5424-5428.

Kitching A.R., Holdsworth S.R., Ploplis V.A., Plow E., Collen D., Carmeliet P., and P.Tipping. 1997. Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp. Med.* 185:963-968.

Klein,W.M., Hruban R.H, Klein-Szanto A.J.P., and Wilentz R.E. 2002. Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): Addicitional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod. Pathol.* 15:441-447.

Klöppel G., Bommer G., Rückert K., and Seifert G. 1980. Intraductal proliferation in the pancreas and its relationship to human and experimetnal carcinogenesis. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Hist.* 387:221-233.

Klöppel G. and Maillet B. 1996. Pathomorphology of Ductal Pancreatic Cancer. *In Cancer of the Pancreas. Molecular Biology, Recent progress in diagnostics and therapy.* Beger H.G., Büchler M.W., and Schoenberg M.H., editors. Universitätsverlag Ulm GmbH, Ulm, Germany. 33-46.

Klöppel,G.a.F.P.J. 1986. *In The exocrine pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases.* V.L.W.G.J.D.B.F.P.L.E.D.-M.E.P.a.S.G.A.Go, editor. Raven Press, New York. 649-674.

Kobayashi H., Fujishiro S., and Terao T. 1994. Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res.* 54:6539-6548.

Konakova,M., Hucho F., and Schleuning W.D. 1998. Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction. *Eur J Biochem.* 253:421-429.

Kooistra T., Schrauwen Y., Arts J., and Emeis J.J. 1994. Regulation of endothelial cell tPA synthesis and release. *Int. J Hematol.* 59:233-255.

Kook,Y.H., J.Adamski, A.Zelent, and L.Ossowski. 1994. The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma on malignancy. *EMBO J* 13:3983-3991.

Krueger S.R., Ghisu C.P., Cinelli P., Gschwend T.P., Osterwalder T., D.P.Wolfer, and Sonderegger P. 1997. Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J Neurosci.* 17:8984-8996.

Kruithof E.K., Baker M.S., and Bunn C.L. 1995. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 86:4007-4024.

Kruse F., Rose S.D., Swift G.H., Hammer R.E., and MacDonald R.J. 1993. An endocrine-specific element is an integral component of an exocrine-specific pancreatic enhancer. *Genes Dev.* 7:774-786.

Kuhlmann E.T., Terhune P.G., and Longnecker D.S. 2003. Evaluation of c-K-ras in pancreatic carcinomas from Ela1-SV40T transgenic mice. *Carcinogenesis* 1993:2649-2651.

Kuhn W., Pache L., Schmalfeldt B., Dettmar P., Schmitt M., Janicke F., and Graeff H. 1994. Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based hemotherapy. *Gynecol. Oncol.* 55:409.

Kuiper J., Otter M., Voorschuur A.H., Zonneveld A.J., Rijken D.C., and Berkel T.J. 1995. Characterization of the interaction of a complex of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 with rat liver cells. *Tromb. Haemostasis* 74:1298-1304.

Kumble, K.D., M.Hirota, P.M.Pour, and J.K.Vishwanatha. 1992. Enhanced levels of annexins in pancreatic carcinoma cells of Syrian hamsters and their intrapancreatic allografts. *Cancer Res.* 52:163-167.

Kunz, C., S.Pebler, J.Otte, and A.D.von der. 1995. Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res.* 23:3710-3717.

L

Lawrence D.A. 1996. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw.* 7:363-374.

Lemoine N.R., Huges C.M., Barton C.M., Poulson R., Jeffery R.E., G.Kloppel, Hall P.A., and Gullick W.J. 1992. The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer. *J Pathol.* 166:7-12.

Leung H.Y, Huges C.M., G.Kloppel, Williamson R.C.N., and Lemoine N.R. 1994. Localization of expression of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic adenocarcinoma by in situ hybridization. *Int. J Oncol.* 4:1219-1223.

Levedakou E.N., Strohmeyer T.G., Effert P.J., and Liu E.T. 1992. Expression of the matrix Gla protein in urogenital malignancies. *Int. J Cancer* 52:534-537.

Levenson, A.S., H.C.Kwaan, K.M.Svoboda, I.M.Weiss, S.Sakurai, and V.C.Jordan. 1998. Oestradiol regulation of the components of the plasminogen-plasmin system in MDA-MB-231 human breast cancer cells stably expressing the oestrogen receptor. *Br. J Cancer* 78:88-95.

Levine A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.

Liao Q., Ozawa F., Friess H., Zimmermann A., Takayama S., Reed J.C., Kleeff J., and Buchler M.W. 2001. The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett.* 503:157.

Lijnen, H.R. and D.Collen. 1982. Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Semin. Thromb. Hemost.* 8:2-10.

Lim Y.T., Sugiura Y., Laug W.E., Sun B., Garcia A., and DeClerk Y.A. 1996. Independent regulation of matrix metalloproteinase and plasminogen activators in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol.* 167:333-340.

Lindgren M., Johansson M., Sandstrom J., Jonsson Y., Bergenheim A.T., and Henriksson R. 1997. VEGF and tPA co-expressed in malignant glioma. *Acta Oncol.* 36:615-618.

Liu S.C., Sanfilippo B., Perroeau I., Derynck R., Salomon D.S., and Kidwell W.R. 1987. Expression of transforming growth factor alpha in differentiated rat mammary tumors. Estrogen induction of TGF-alpha production. *Mol. Endocrinol.* 1:683-692.

Longnecker D.S. 1981. Carcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Am. J Pathol.* 94-96.

Longnecker D.S. 1987. The azaserine-induced model of pancreatic carcinogenesis in rats. *In* Experimental Pancreatic Carcinogenesis. D.G.Scarpelli, J.K.Reddy, and Longnecker D.S., editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 117-130.

Longnecker D.S. 1986. Experimental models of exocrine pancreatic tumors. *In* The Exocrine Pancreas Biology: Biology, Pathobiology and Diseases. V.L.W.Go, F.P.Brooks, E.P.Di Magno, J.D.Gardner, E.Lebenthal, and G.A.Scheele, editors. Raven Press, New York. 443-458.

Lowenfels AB., and Maisonneuve P. 2002. Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 16(1):1-16.

Lucas M.A., Fretto L.J., and Mckee P.A. 2003. The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J Biol. Chem.* 258:4249-4256.

Luetkeke, N.C., G.K.Michalopoulos, Teixidó J., Gilmore R., Massagué J., and D.C.Lee. 1988. Characterization of high molecular weight transforming growth factor alpha produced by rat hepatocellular carcinoma cells. *Biochemistry* 27:6487-6494.

Lüttges J., Galehdari H., Bröcker V., Schwarte-Waldhoff I., Henne-Bruns D., Klöppel G., Schmiegel W., and Hahn S.A. 2001. Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am. J Pathol.* 158:1677-1683.

M

MacLeod T.J., Kwon M., N.R.Filipenko, and Waisman D.M. 2003. Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin. *J Biol. Chem.* 278:25577-25584.

Marinelli M., Quaglino D., Bettuzzi S., Strocchi P., Davalli P. and Corti A. 1994. Increased levels of clusterin mRNA in the ventral prostate of the aging rat are associated to increases in cuboidal (atrophic) cell population and not to changes in apoptotic activity. *Biochem.Cell Bio.* 72:515-521.

- Maruta H. and Burgess A.W. 1994. Regulation of the Ras signalling network. *Bioessays* 16:489-496.
- Meggiato T., Calabrese F., De Cesare C.M., Baliello E., Valente M., and Del Favero G. 2003. C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death. *Pancreas* 26:65-70.
- Meilhac O., Ho-Tin-Noe B., Houard X., Philippe M., Michel J.B., and Angles-Cano E. 2003. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J.* 17 :1301-1303.
- Menell, J.S., Cesarman G.M., Jacovina A., M.A.McLaughlin, E.A.Lev, and Hajjar K.A. 1999. Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J Med.* 340:994-1004.
- Menouny M., Binoux M., and Babajko S. 1997. Role of insulin-like growth factor binding protein-2 and its limited proteolysis in neuroblastoma cell proliferation: modulation by transforming growth factor-beta and retinoic acid. *Endocrinology* 138:683-690.
- Merchiers, P., F.Bulens, I.Stockmans, A.De Vriese, R.Convents, R.Bouillon, D.Collen, A.Belayew, and G.Carmeliet. 1999. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) induction of the tissue-type plasminogen activator gene is mediated through its multihormone-responsive enhancer. *FEBS Lett.* 460:289-296.
- Merenmies J., Pihlaskari R., Laitinen J., Wartiovaara J., and Rauvala H. 1991. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *Biol. Chem.* 266:16722-16729.
- Mignatti P. and Rifkin D.B. 1996. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 49:117-137.
- Mignatti P., Robbins E., and Rifkin D.B. 1986. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47:487-498.
- Miles, L.A., Dahlberg C.M., and Plescia J. 1991. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30:1682-1691.
- Miles, L.A. and E.F.Plow. 1987. Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb. Haemost.* 58:936-942.
- Millauer B., Witzmann-Voos S., Schnurch H, Martinez R., Moller N.P., Risau W., and Ullrich A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846.
- Miyake H., Cleave M., Kamidono S., and Hara I. 2002. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. *Urology* 59:150-154.

Miyake H., Gleave M.E., Arakawa S., Kamidono S., and Hara I. 2002. Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential. *J Urol.* 167:2203-2208.

Miyaki M., K.Tanaka, Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., and Konishi M. 1995. Familial polyposis: recent advances. *Crit Rev Oncol Hematol.* 19:1-31.

Mollenhauer J., Roether I., and Kern H.F. 1987. Distribution of extracellular matrix proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and its influence on tumour cell proliferation in vitro. *Pancreas* 2:14-24.

Morton P.A., Owensby D.A., and Sobel B.E. 1989. Catabolism of tissue-type plasminogen activator by the human hepatoma cell line Hep G2: modulation by plasminogen inhibitor type 1. *J Biol. Chem.* 264:7228-7235.

Moser A.R., Enghild J.J., Pizzo S.V., and Stack M.S. 1993. The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator. *J Biol. Chem.* 268:18917-18923.

Moser A.R., Pitot H.C., and Dove W.F. 1990. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247:322-324.

Moser T.L., Young T.N., Rodriguez G.C., Pizzo S.V., Bast R.C.Jr., and Stack M.S. 1994. Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma. *Int. J Cancer* 56:552-559.

Moskaluk,C.A., Hruban R.H, and Kern S.E. 1997. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 57:2140-2143.

Mulcahy H.E., Duffy M.J., Gibbons D., McCarthy P., Parfrey N.A., O'Donoghue D.P., and Sheahan K. 1994. Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer. *Lancet* 344:583-584.

N

Nagakawa Y., Aoki T., Kasuya K., Tsuchida A., and Koyanagi Y. 2002. Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer. *Pancreas* 24:169-178.

Nagayama M., Sato A., Hayakawa H., Urano T., Takada Y., and A.Takada. 1994. Plasminogen activators and their inhibitors in non-small cell lung cancer. Low content of type 2 plasminogen activator inhibitor associated with tumor dissemination. *Cancer* 73:1398-1405.

Nakajima K., Nagata K., and Hamanoue M. 1993. Plasminogen-binding protein associated with the plasma membrane of cultured embryonic rat neocortical neurons. *Fed. Eur Biochem. Societies* 333:223-228.

Nakajima K., Nagata K., and Kohsaka S. 1994. Plasminogen mediates an interaction between microglia and dopaminergic neurons. *Eur Neurol.* 34 (supp 3):10-16.

Nakamura H., Horita S., Senmaru N., Miyasaka Y., Gohda T., Inoue Y., Fujita M., Meguro T., Morita T., and Nagashima K. 2002. Association of matrilysin expression with progression and poor prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* 9:751-755.

Needham G.K., Nicholson S, Angus B., Farndon J.R., and Harris A.L. 1988. Relationship of membrane-bound tissue type and urokinase type plasminogen activators in human breast cancers to estrogen and epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.* 48:6603-6607.

Nekarda H., Schmitt M, Ulm K., Wenninger A., Vogelsang H., Becher K., Roder J.D., Fink U., and Siewert J.R. 1994. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res.* 54:2900-2907.

Nguyen D.H., Hussaini I.M., and Gonias S.L. 1998. Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility. *J Biol. Chem.* 273:8502-8507.

Nielsen L.S, Andreassen P.A., Grondahl-Hansen J., L.Skriver, and K.Dano. 1986. Plasminogen activators catalyse conversion of inhibitor from fibrosarcoma cells to an inactive form with a lower apparent molecular mass. *FEBS Lett.* 196:269-273.

Nilius,B., Gerke V., J.Prenen, G.Szucs, S.Heinke, Weber K., and G.Droogmans. 1996. Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. *J Biol. Chem.* 271:30631-30636.

Nordengren J., Casslen B., Gustavsson B., Einarsdottir M., and Willen R. 1998. Discordant expression of mRNA and protein for urokinase and tissue plasminogen activators (u-PA, t-PA) in endometrial carcinoma. *Int. J Cancer* 79:195-201.

Nykjaer A., Conese M., L.Christensen, Olson D., Cremona O., Gliemann J., and Blasi F. 1997. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA: serpin complexes. *EMBO J* 16:2610-2620.

O

O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., and Folkman J. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the supression of metastasis by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315-328.

Offield M.F., Jetton T.L., Labosky P.A., Ray M., Stein R.W., Magnuson M.A., Hogan B.L., and Wright C.V. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983-995.

Oka,K., Ishida T., Nishino T., and Sugimachi K. 1991. Immunohistochemical evidence of urokinase-type plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51:3522-3525.

Ornitz,D.M., Hammer R.E., Messing A., R.D.Palmiter, and R.L.Brinster. 1987. Pancreatic neoplasia induced by SV40 T-antigen expression in acinar cells of transgenic mice. *Science* 238 :188-193.

Ossowski,L. 1988. Plasminogen activator dependent pathways in the dissemination of human tumor cells in the chick embryo. *Cell* 52:321-328.

Ossowski,L., G.Clunie, M.T.Masucci, and Blasi F. 1991. In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion. *J Cell Biol.* 115:1107-1112.

Ossowski L., and Aguirre-Ghiso J.A. 2000. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signalling for cell adhesion, migration and growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:613-620.

Osterwalder T., Cinelli P., Baici A, Pennella A., Krueger S.R, Schrimpf S.P., Meins M., and Sonderegger P. 1998. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin. *J Biol. Chem.* 273:2312-2321.

Osterwalder T., Contartese J., Stoeckli E.T., Kuhn T.B., and Sonderegger P. 1996. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J* 15:2944-2953.

Otter M., Zocková P., and Kuiper J. 1992. Isolation and characterization of the mannose receptor from human liver potentially involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator. *Hepatology* 16:54-59.

P

Paciucci,R., M.Tora, Diaz V.M., and F.X.Real. 1998. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene* 16:625-633.

Paciucci,R., Vila M.R., T.Adell, Diaz V.M., Tora M., T.Nakamura, and F.X.Real. 1998. Activation of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system and redistribution of E-cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing Met. *Am. J Pathol.* 153:201-212.

- Palumbo J.S., Talmage K.E., Liu H., La Jeunesse C.M., Witte D.P., and Degen J.L. 2003. Plasminogen supports tumor growth through a fibrinogen-dependent mechanism linked to vascular patency. *Blood* 102:2819-2827.
- Parkkinen J. and Rauvala H. 1991. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activated (t-PA) with amphoterin. Enhancement of tPA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin. *J Biol. Chem.* 266:16730-16735.
- Pedersen H., N.Brunner, Francis D., Osterlind K., Ronne E., Hansen H.H. , Dano K., and Grondahl-Hansen J. . 1994. Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res.* 54:4671-4675.
- Pedersen H., Grondahl-Hansen J., Francis D., Osterlind K., Hansen H.H., Dano K., and N.Brunner. 1994. Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 54:123.
- Pellegata N.S, Sessa F, Renault B., Bonato M.S, Leone B.E., Solcia E. , and Ranzani G.N. 1994. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Research* 54:1556-1560.
- Pepper,M.S., Vasalli J.D., R.Montesano, and Orci L. 1987. Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol.* 105:2535-2541.
- Pham,H.T., N.L.Block, and V.B.Lokeshwar. 1997. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 57:778-783.
- Ploplis,V.A., P.Carmeliet, S. Vazirzadeh, I. van Vlaenderen, L.Moons, E.F.Plow, and D.Collen. 1995. Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 92:2585-2593.
- Poon S., Easterbrook-Smith S.B., Rybchyn M.S., Carver J.A. and Wilson M.R. 2000. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry.* 39:15953-15960.
- Pour,P.M. 1989. Experimental pancreatic cancer. *Am. J Surg. Pathol.* 13:96-103.
- Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y, Bryan T.M., Hamilton S.R., Thibodeau S.N., Vogelstein B., and Kinzler K.W. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359:235-237.
- Powell W.C. and L.M.Matrisian. 1996. Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr Top. Microbiol. Immunol.* 213:1-21.
- Price P.A. and Williamson M.K. 1985. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol. Chem.* 269:14975.

Q

Qian,Z., Gilbert M.E., M.A.Colicos, E.R.Kandel, and D.Kuhl. 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361:453-457.

R

Raijman I and Levin B. 1993. Exocrine Tumors of the Pancreas. *In* The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. Vay Liang W.go, E.P.Di Magno, Gardner J.D., Lebenthal E., Reber H.A., and Scheele G.A, editors. Raven Press, Ltd., New York. 899-912.

Ramadani M., Gansauge F., Schlosser S., Yang Y., Begler H.G., and Gansauge S. 2001. Overexpression of caspase-1 in pancreatic disorders: implications for a function besides apoptosis. *Gastrointest. Surg.* 5:352-358.

Raum D., Marcus D., Alper C.A., Levey R., Taylor P.D., and Starzl T.E. 1980. Synthesis of human plasminogen by liver. *Science* 208:1036-1037.

Real F.X. 1995. The cell biology of pancreatic cancer: an overview. *In* Pancreatic cancer. J.Neoptolemos and N.R.Lemoine, editors. Blackwell Science Press, Oxford. 3-17.

Real,F.X. 2003. A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression. *Gastroenterology.* 124:1958-1964.

Real,F.X., M.R.Vila, A.Skoudy, Ramackers F.C., and Corominas J.M. 1993. Intermediate filaments as differentiation markers of exocrine pancreas, II. Expression of cytokeratins of complex and stratified epithelia in normal pancreas and in pancreas cancer. *Int. J Cancer* 54:720-727.

Redlitz,A. and Plow E.F. 1995. Receptors for plasminogen and t-PA: an update. *Baillieres Clin. Haematol.* 8:313-327.

Redston M.S., Caldas C., Seymour A.B, Hruban R.H., da Costa L., Yeo C.J., and Kern S.E. 1994. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts and DNA microdeletions. *Cancer Research* 54:3025-3033.

Reiter L.S., Spertini O., and Kruithof E.K. 1997. Plasminogen activators play an essential role in extracellular-matrix invasion by lymphoblastic T cells. *Int. J Cancer* 70:461-466.

Rickles R.J., Darrow A.L., and Strickland S. 1988. Molecular cloning of complementary DNA to mouse tissue plasminogen activator mRNA and its expression during F9 teratocarcinoma cell differentiation. *J Biol. Chem.* 263:1563-1569.

Rijken D.C. 1995. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin. Haematol.* 8:291-312.

Rijken D.C., Juhan-Vague I., and Collen D. 1983. Complexes between tissue-type plasminogen activator and proteinase inhibitors in human plasma, identified with an immunoradiometric assay. *J Lab. Clin. Med.* 101:285-294.

Rivera J.A., Graeme-Cook F., Werner J., Z'graggen K., Rustgi A.K., Rattner D.W., Warshaw A.L., and Fernandez-del Castillo C. 1997. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery* 122:82-90.

Roda, O., Valero M.L., S.Peiro, D.Andreu, F.X.Real, and P.Navarro. 2003. New Insights into the tPA-Annexin A2 Interaction. IS ANNEXIN A2 CYS8 THE SOLE REQUIREMENT FOR THIS ASSOCIATION? *J Biol. Chem.* 278:5702-5709.

Romer, J., Bugge T.H., C.Pyke, Lund L.R., Flick M.J., and J.Degen. 1996. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat. Med.* 2:287-292.

Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., Hahn S.A., Lu J., Panzer S., Zahurak M., Goodman S.N., Hruban R.H., Yeo C.J., and Kern S.E. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57:1731-1734.

S

Sabapathy, K.T., M.S.Pepper, F.Kiefer, U.Mohle-Steinlein, F.Tacchini-Cottier, I.Fetka, G.Breier, W.Risau, P.Carmeliet, R.Montesano, and E.F.Wagner. 1997. Polyoma middle T-induced vascular tumor formation: the role of the plasminogen activator/plasmin system. *J Cell Biol.* 137:953-963.

Saillan-Barreau, C., P.Clerc, M.Adato, C.Escricout, N.Vaysse, D.Fourmy, and M.Dufresne. 1998. Transgenic CCK-B/gastrin receptor mediates murine exocrine pancreatic secretion. *Gastroenterology* 115:988-996.

Saito K., Nagashima M., Iwata M., Hamada H., Sumiyoshi K., Takada Y., and A.Takada. 1990. The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors. *Thromb. Res.* 58:355-366.

Saksela, O. and D.B.Rifkin. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev Cell Biol.* 4:93-126.

Salonen E.M., O.Saksela, Vartio T., Nielsen L.S., and Zeuthen J. 1985. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol. Chem.* 260:12302-12307.

Salonen E.M., Vaheri A., Pollanen J., Stephens R.W., P.A.Andreasen, Mayer M, Dano K., Gailit J., and Rouslahti E. 1989. Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin. *Biol. Chem.* 264:6339-6343.

Sandgren E.P., Luetteke N.C., Qiu T.H., R.D.Palmiter, R.L.Brinster, and D.C.Lee. 1993. Transforming Growth Factor alpha dramatically enhances oncogene-induced carcinogenesis in transgenic mouse pancreas and liver. *Mol. Cell Biol.* 13:320-330.

Sandgren E.P., Luetteke N.C., R.D.Palmiter, R.L.Brinster, and D.C.Lee. 1990. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61:1121-1135.

Sandgren E.P., Quaife C.J., Paulovich A.G., Palmiter R.D., and Brinster R.L. 1991. Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:93-97.

Sandstrom M., Johansson M., Sandstrom J., Bergenheim A.T., and Henriksson R. 1999. Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression. *Int. J Dev. Neurosci.* 17:473-481.

Sappino,A.P., Huarte J., Belin D., and Vasalli J.D. 1989. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol.* 109:2471-2479.

Sasaki T., Morita T., and Iwanaga S. 1986. Identification of the plasminogen-binding site of human alpha 2-plasmin inhibitor. *J Cell Biochem.* 99:1699-1705.

Satake K. and Hiura A. 1998. A new model for pancreatitis. *Pancreas* 16:284-288.

Sato Y., Okamura K., Morimoto A., Hamanaka R., Hamaguchi K., Shimada T., Ono M., Kohno K., and Sakata T. 1993. Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 204:223-229.

Schaeffer,B.K., P.G.Terhune, and D.S.Longnecker. 1994. Pancreatic carcinomas of acinar and mixed acinar/ductal phenotypes in Ela-1-myc transgenic mice do not contain c-K-ras mutations. *Am. J Pathol.* 145:696-701.

Schleger,C., C.Verbeke, R.Hildenbrand, H.Zentgraf, and U.Bleyl. 2002. c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod. Pathol.* 15:462-469.

Schnaper H.W., Barnathan E.S., Mazar A., Maheshwari S., Ellis S., Cortez S.L., Baricos W.H., and Kleinman H.K. 1995. Plasminogen activators augment endothelial cell organization *in vitro* by two distinct pathways. *J Cell Physiol.* 165:107-118.

Schneiderman J., Adar R., and Savion N. 1991. Changes in plasmatic tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activity during acute arterial, occlusion associated with severe ischemia. *Thromb. Res.* 62:401-408.

Schüssler M.H., Skoudy A., Ramaekers F., Real F.X. 1992. Intermediate filaments as differentiation markers of normal pancreas and pancreas cancer. *Am J. Pathology.* 140:559-568.

Schutte M., Hruban R.H, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran S.K. , C.A.Moskaluk, Hahn S.A., Schwarte-Waldhoff I., Schmiegel W. , Baylin S.B., Kern S.E., and Herman J.G. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 57:3126-3130.

Schutte M., Hruban R.H, Hedrick L., Molnar'Nadasdy G., C.L.Weinstein, Bova G.S., Isaacs W.B., Cairns P., Nawro H., Sidransky D., Casero R., Meltzer P.S, S.A.Hahn, and Kern S.E. 1996. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 56:2527-2530.

Seeds,N.W., Basham M.E., and Haffke S.P. 1999. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:14118-14123.

Serrano M., Hannon G.J., and Beach D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.

Seufferlein,T., Van Lint J., S.Liptay, G.Adler, and R.M.Schmid. 1999. Transforming growth factor alpha activates Ha-Ras in human pancreatic cancer cells with Ki-ras mutations. *Gastroenterology* 116:1441-1452.

Shapiro,R.L., Duquette J.G., I.Nunes, D.F.Roses, M.N.Harris, and E.L.Wilson. 1997. Urokinase-type plasminogen activator-deficient mice are predisposed to staphylococcal botryomycosis, pleuritis, and effacement of lymphoid follicles. *American J of Pathology* 150:359-369.

Shapiro,R.L., Duquette J.G., D.F.Roses, I.Nunes, M.N.Harris, H.Kamino, E.L.Wilson, and D.B.Rifkin. 1996. Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice: cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals. *Cancer Res.* 56:3597-3604.

Sirivatanauksorn V., Sirivatanauksorn Y., and Lemoine N.R. 1998. Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. *Langenbeck's Arch Surgical*105-115.

Slack, J.M. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 121:1569-1580.

Smith F.J., Porter R.M., Corden L.D., Lunny D.P., Lane E.B., and McLean W.H. 2002. Cloning of human, murine, and marsupial keratin 7 and a survey of K7 expression in the mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:818-827.

Sommers S.C, Murphy S.A., and Warren S. 1954. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Arch. Pathol.* 27:629-640.

Spengler D., Villalba M., Hoffmann A., Pantaloni C., Houssami S., Bockaert J., and Journot L. 1997. Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J* 16:2814-2825.

Stack M.S. and Pizzo S.V. 1993. Modulation of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by synthetic peptides derived from the amino-terminal heparin binding domain of fibronectin. *J Biol. Chem.* 268:18924-18928.

Stahl A. and B.M.Mueller. 1994. Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro. *Cancer Res.* 54:3066-3071.

Steeg P.S. 1989. Search for metastasis suppressor genes. *Invasion Metastasis* 9:351-359.

Stephens R.W., Pollanen J., Tapiovaara H., Leung K.C., Sim P.S., and Salonen E.M. 1989. Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biol.* 108:1987-1995.

Stetler-Stevenson W.G., L.A.Liotta, and Kleiner D.E.Jr. 1993. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 7:1434-1441.

Stetler-Stevenson W.G., and Yu A.E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin.Cancer Biol.* 11:143-152.

Strickland,S. 2001. Tissue plasminogen activator in nervous system function and dysfunction. *Thromb. Haemost.* 86 :138-143.

Strickland,S. and Reich E. 1976. Plasminogen activation in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm . *Cell* 9:231-240.

Stump D.C., Thienpont M., and Collen D. 1986. Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from human urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma. *J Biol. Chem.* 261:12759-12766.

Sugiura,Y., Ma L., B.Sun, H.Shimada, W.E.Laug, R.C.Seeger, and Y.A.DeClerck. 1999. The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis. *Cancer Res.* 59:1327-1336.

T

Taguchi A., Blood D.C., del Toro G., Canet A., Lee D.C., Qu W., Tanji N., Lu Y., Lalla E., Fu C., Hofmann M.A., Kislinger T., Ingram M., Lu A., Tanaka H., Hori O., Ogawa S., Stern D.M., and Schmidt A.M. 2000. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405:354-360.

Taipale J., Koli K., and Keski-Oja J. 1992. Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J Biol. Chem.* 267:25378-25384.

Taniguchi T., Matsui T., Ito M., Murayama T., Tsukamoto T., Katakami Y., Chiba T., and Chihara K. 1994. Cholecystokinin-B/gastrin receptor signaling pathway involves tyrosine phosphorylations of p125FAK and p42MAP. *Oncogene* 9:861-867.

Terhune P.G., Phifer D.M., Tosteson T.D, and Longnecker D.S. 1998. K-ras mutations in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 7:515-521.

Tevethia, M.J., R.H. Bonneau, J.W. Griffith, and L. Mylin. 1997. A simian virus 40 large T-antigen segment containing amino acids 1 to 127 and expressed under the control of the rat elastase-1 promoter produces pancreatic acinar carcinomas in transgenic mice. *J Virol.* 71:8157-8166.

Todisco A. 2000. Molecular mechanisms for the growth factor action of gastrin. *J Gastroenterol* 35:57-64.

Trougakos I.P. and Gonos E.S. 2002. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 34: 1430-1448.

Tsirka, S.E. 1997. Clinical implications of the involvement of tPA in neuronal cell death. *J Mol. Med.* 75:341-347.

Tsirka, S.E., Gualandris A., D.G. Amaral, and Strickland S. 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377:340-344.

Tsirka, S.E., Rogove A.D., Bugge T.H., J.L. Degen, and Strickland S. 1997. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 17:543-552.

U

Uhrin P., Dewerchin M., Hilpert M., Chrenek P., Schofer C., Zechmeister-Machhart M., Kronke G., Vales A., Carmeliet P., Binder B.R., and Geiger M. 2000. Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J Clin. Invest* 106:1531-1539.

Urrutia P. and Di Magno E.P. 1996. Pancreatic Cancer: Cellular and Molecular Mechanisms. *In* Enciclopedia of Cancer. Berlino J.R., editor. Academic Press Inc., Minnesota. 1201-1211.

V

Valinsky J.E. and Reich E. 1981. Plasminogen activator in the bursa of Fabricius: Correlations with morphogenetic remodeling and cell migrations. *Cell* 25:471-476.

Van Leuven F., Cassiman J.J., and van den Berghe H. 1978. Uptake and degradation of alpha2-macroglobulin-protease complexes in human cells in culture. *Exp. Cell Res.* 117:273-282.

Verspaget, H.W., C.F.Sier, S.Ganesh, G.Griffioen, and C.B.Lamers. 1995. Prognostic value of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31A:1105-1109.

Vila, M.R., J.Lloreta, and F.X.Real. 1994. Normal human pancreas cultures display functional ductal characteristics. *Lab Invest* 71:423-431.

Vishwanatha, J.K., Y.Chiang, K.D.Kumble, M.A.Hollingsworth, and P.M.Pour. 1993. Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers. *Carcinogenesis* 14:2575-2579.

Vogel T., Guo N.H., Krutzsch H.C., Blake D.A., Hartman J., Mendelovitz S., Panet A., and Roberts D.D. 1993. Modulation of endothelial cell proliferation, adhesion, and motility by recombinant heparin-binding domain and synthetic peptides from the type I repeats of thrombospondin. *J Cell Biol.* 53:74-84.

Vogelstein B., Fearon E.R., Han K., and et.al. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J Med.* 319:525-532.

W

Wada H., Kumeda Y., Ogasawara Z., Minamikawa K., Wakita Y., Nakase T., Kaneko T., Ohiwa M., Kageyama S., Kobayashi T., 1993a. Stimulation of tissue type plasminogen activator by leukaemic cell homogenates. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 4:591-597.

Wada H., Kumeda Y., Ogasawara Z., Ohiwa M., Kaneko T., Tamaki S., Ohno T., Kageyama S., Kogayashi T., Deguchi K., 1993b. Plasminogen activators and their inhibitors in leukemic cell homogenates. *Am. J Hematol.* 42:166-170.

Wagner, M., Greten F.R., Weber C.K., S.Koschnick, T.Mattfeldt, W.Deppert, H.Kern, G.Adler, and R.M.Schmid. 2001. A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes Dev.* 15:286-293.

Wagner, M., Luehrs H., Klöppel G., G. Adler, and R.M. Schmid. 1998. Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor-alpha transgenic mice. *Gastroenterology* 115:1254-1262.

Wagner, M., Weber C.K., Bressau F., F.R. Greten, Stagge V., Ebert M., S.D. Leach, Alder G., and R.M. Schmid. 2002. Transgenic overexpression of Amphiregulin induces a mitogenic response selectively in pancreatic duct cells. *Gastroenterology* 122 :1898-1912.

Waisman, D.M. 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol. Cell Biochem.* 149-150:301-322.

Welling, T.H., T.S. Huber, L.M. Messina, and J.C. Stanley. 1996. Tissue plasminogen activator increases canine endothelial cell proliferation rate through a plasmin-independent, receptor-mediated mechanism. *J Surg. Res.* 66:36-42.

Wilentz R.E., Geradts J, Maynard R, Offerhaus G.J.A, Kang M., Goggins M. , Yeo C.J., Kern S.E., and Hruban R.H. 1998. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Research* 58:4740-4744.

Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A., Pedram A., McCarthy D.M., Parsons J.L., Yeo C.J., Kern S.E., and Hruban R.H. 2000. Loss of expression of Dpc-4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Research* 60:2002-2006.

Williams T.M., Weiner D.B., Greene M.I., Ma, and Maguire H.C. 1991. Expression of c-erbB-2 in human pancreatic adenocarcinomas. *Pathobiology* 59:46-52.

Wilson A.J. and Gibson P.R. 2000. Role of urokinase and its receptor in basal and stimulated colonic epithelial cell migration in vitro. *Gut* 47:105-111.

Wilson, E.L., P. Jacobs, and E.B. Dowdle. 1983. The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells in vitro. *Blood* 61:568-574.

Wilson J.D. 1991. Endocrinology and Metabolism: Endocrinology. *In the Principles of Internal Medicine.* Part twelve, Section 1: 1647-1679. Twelve edition. Wilson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Martin J.B., Fauci A.S., Root R.K., editors. McGraw-Hill, Inc.

Wiman B., Almquist A., Sigurdardottir O., and Lindahl T. 1988. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) is bound to vitronectin in plasma. *FEBS Lett.* 242:125-128.

Wiman B. and Collen D. 1978. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* 272:549-550.

X

Xie M.J., Mto Y., Su S.B., Mouri H., Ohtsubo K., Matsubara F., and Sawabu N. 2002. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas* 25:234-238.

Y

Yakamada Y., H.Friess, Kobrin M.S., M.Buchler, Beger H.G., and Korc M. 1993. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 13:565-569.

Yamanaka Y., H.Friess, M.Buchler, Beger H.G., H.Uchida, Onda M., Kobrin M.S., and Korc M. 1993. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth-factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* 53:52889-5296.

Yamano M., Fujii H., Takagaki T., Kadowaki N., Watanabe H., and Shirai T. 2000. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am. J Pathol.* 156:2123-2133.

Yamaoka T., Yano M., Yamada T., Matsushita T., Moritani M., Li S., Yoshimoto K., Hata J., and Itakura M. 2000. Diabetes and pancreatic tumours in transgenic mice expressing Pa x 6. *Diabetologia* 43:332-339.

Yanagisawa A, Ohtak K, Ohashi K, kitagawa T, Sugano H, and Kato Y. 1993. Frequent c-ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Research* 53:953-956.