

# Papel del factor de transcripción *Myc* en el desarrollo del páncreas postnatal

José Ignacio Robaina Castillo<sup>1,2\*</sup>, Stefano Gambera<sup>2</sup>, Rui Miguel Benedito<sup>2</sup>

**1** Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. jrobainacastillo@gmail.com **2** Grupo de Genética Molecular de la Angiogénesis-Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, 28029 Madrid, España.

## Resumen

El desarrollo del páncreas está determinado por factores intrínsecos, como son el número de células progenitoras tempranas y por señales extrínsecas que concommitan con la diferenciación de los tipos de células endocrinas, exocrinas y ductales de una población única de precursores pancreáticos. El factor de transcripción *Myc* ha sido estudiado ampliamente como protooncogén, aunque en células humanas normales cumple un importante papel en el desarrollo embrionario de diversos tejidos entre ellos el páncreas, siendo un regulador de la maduración y mantenimiento de las células acinares de dicho órgano. La herramienta iFlpMosaics v2.0 introducida en ratones y desarrollada por el Grupo de Genética Molecular de la Angiogénesis del CNIC, representa un sistema inducible de mosaico genético funcional que permite inducir en el mismo tejido, células mutantes y wild-type y estudiar la competición entre ellas en el mismo entorno celular. Es por ello, que el objetivo de este estudio fue caracterizar la herramienta iFlpMosaics v2.0 en tejido pancreático y estudiar la actividad del factor de transcripción *Myc* en el desarrollo del páncreas postnatal. Mediante estudios de microscopia confocal multiespectral se pudo comprobar el funcionamiento de la herramienta iFlpMosaics recientemente desarrollada tanto en tejido de páncreas endocrino como exocrino. Además, el uso de esta herramienta ha permitido demostrar que células deficientes en el factor de transcripción *Myc* contribuyen mínimamente al desarrollo postnatal del páncreas murino.

**Palabras clave:** *Myc*; páncreas; postnatal; iFlp Mosaics; iFlp Nuclei.

**Recibido:** 19 de junio de 2023

**\*E-mail:** jrobainacastillo@gmail.com

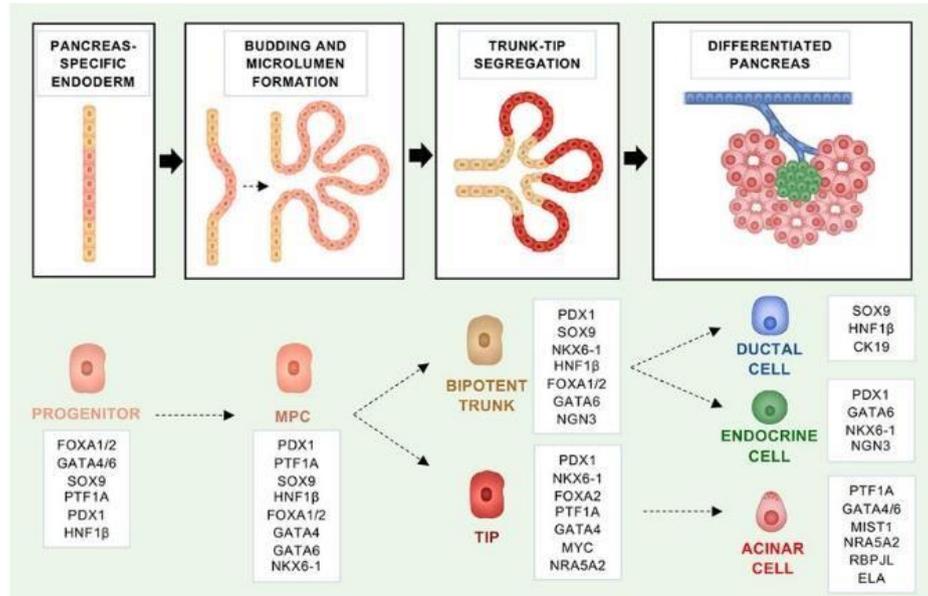
## Introducción

El páncreas humano es un órgano solitario bien definido que macroscópicamente, se puede dividir en tres partes principales: la cabeza, el cuerpo y la cola [1], sin límites claros entre estas partes. La cabeza del páncreas es una parte en forma de C alineada con la curvatura superior del duodeno. El cuerpo estrecho y plano del páncreas se encuentra debajo del estómago y se extiende casi horizontalmente en el plano medial. Se cruza con la arteria y la vena mesentérica superior, la aorta abdominal, la vena cava inferior y la vena porta. La cola del páncreas toca el hilio del bazo. La glándula mide de 14 a 18 cm de largo, de 2 a 9 cm de ancho y de 2 a 3 cm de grosor, con un peso de 50 a 100 g [2]; además está rodeado por una cápsula fibrosa desde la cual se extienden tabiques de tejido conjuntivo hacia la glándula que divide su parénquima en distintos lóbulos y lobulillos (lóbulos pequeños). El mesénquima representa aproximadamente del 15 al 25% del volumen total del páncreas y contiene numerosas células grasas [3;4].

El páncreas adulto es un órgano complejo que cumple funciones exocrinas y endocrinas que controlan la digestión y la homeostasis de la glucosa, respectivamente. Los tipos de células pancreáticas incluyen células exocrinas dispuestas en acinos que secretan enzimas digestivas, células ductales que producen bicarbonato y recubren los conductos que drenan el líquido exocrino al duodeno y células endocrinas. Estos últimos comprenden células productoras de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, que se organizan en islotes de Langerhans y secretan estas hormonas en la sangre [5].

## Desarrollo embrionario del páncreas

A pesar de las grandes diferencias en el tamaño final entre las especies de mamíferos, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes al crecimiento de los órganos generalmente se consideran muy similares. En el caso del páncreas, las células progenitoras embrionarias proliferan y se diferencian inicialmente para formar un órgano en miniatura. Después del nacimiento, las células progenitoras desaparecen en gran medida. El consenso actual es que el crecimiento postnatal del páncreas, en ratones y, por extensión, también en humanos, se basa en la duplicación simple de células diferenciadas, consistente con Leblond, 1964 en su descripción clásica del páncreas como un "tejido en expansión" (Figura 1); aunque se han informado diferencias sorprendentes en el modo de crecimiento pancreático postnatal entre diferentes mamíferos. Mientras que el páncreas humano crece por hiperplasia pura, el páncreas de roedores crece también por hipertrofia celular [6].



**Figura 1.** Reguladores del destino que gobiernan el desarrollo embrionario del páncreas de ratón y mantienen la identidad en el órgano adulto. Representación esquemática del desarrollo del páncreas embrionario de ratón. En recuadros, se destacan los reguladores del destino para cada etapa de desarrollo. Extraído de *Front. Cell Dev. Biol.*, 02 December 2021 Sec. Molecular and Cellular Pathology Volume 9 – 2021 <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.795251>

Se reconoce que el tamaño de las células en el páncreas adulto es plástico. Dado que las células acinares son el componente principal del parénquima pancreático, las variaciones en la masa de células acinares afectan directamente el tamaño del páncreas [7]. Por ejemplo, las células acinares se encogen cuando los nutrientes luminales no están disponibles y el tamaño de las células beta aumenta transitoriamente en roedores preñados [6].

Durante los procesos coordinados de morfogénesis y desarrollo, las células epiteliales se involucran en cambios dinámicos de sus conexiones intercelulares con las células vecinas. Estos reordenamientos facilitan los cambios continuos en el movimiento y la forma celular que deben ocurrir durante la remodelación epitelial y el establecimiento del tejido. Por el contrario, esta remodelación estructural tiende a estar restringida en los tejidos epiteliales maduros, donde el mantenimiento del tejido estático juega un papel más central que el crecimiento y la reorganización [8-12].

En el páncreas en desarrollo, se produce una transición entre estos distintos estados estructurales a medida que el órgano se desarrolla desde un brote embrionario primordial hasta un órgano epitelial funcionalmente específico y muy ramificado [13]. A lo largo de este proceso, los cambios dinámicos en las propiedades adhesivas de las células coinciden con la diferenciación, expansión y mantenimiento de los distintos linajes del páncreas, incluidas las células endocrinas, acinares y ductales. El centro del proceso de adhesión epitelial es la unión adherente, donde la interacción de E-cadherina (Cdh1) con proteínas citoplasmáticas (p. ej.,  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina,  $\delta$ -catenina) ayuda a regular la dinámica del citoesqueleto, la señalización intracelular y transcripción de genes. En células individuales del páncreas, el dominio extracelular de E-cadherina interactúa hemifílicamente con dominios de cadherina complementarios de células vecinas, uniendo sus citoesqueletos de actina en tejidos epiteliales funcionales. En este sentido, la adhesión célula-célula mediada por cadherina juega un papel integral en los procesos de desarrollo y mantenimiento de órganos [14].

### Papel del gen *Myc* en el desarrollo, homeostasis y en las afectaciones patológicas del páncreas

*Myc* (anteriormente conocido como *c-Myc*) es un factor de transcripción de la cremallera de leucina básica hélice-bucle-hélice (bHLH) que se ha estudiado ampliamente como protooncogén pero que también es esencial para la progresión normal del ciclo celular. Aunque *Myc* promueve el crecimiento y la proliferación celular en varios tejidos, induce o sensibiliza a las células a la apoptosis en otros [15]. En las células humanas normales el gen *c-MYC* se transcribe en diferentes tejidos, mientras que en células neoplásicas la transcripción se lleva a cabo de forma anormal [16]. La actividad oncogénica de *c-Myc* se demostró en animales transgénicos y en estudios *in vitro* con cultivos celulares [17].

En ratón, se encontró que una delección homocigótica del gen *c-Myc* es letal en embriones murinos, lo que sugiere que la expresión de este gen es esencial para el desarrollo embrionario [18]. Siguiendo con su papel crucial en el desarrollo embrionario, el gen *c-Myc* está implicado en la regulación de mecanismos de competición celular y en la eliminación de células con una menor capacidad replicativa [19]. Sin embargo,

la sobreexpresión sostenida de *c-Myc* en las células pancreáticas  $\beta$  neonatales murinas reprime la diferenciación celular y promueve la proliferación celular y la apoptosis, lo que lleva a una disfunción importante debida a la pérdida de células beta y a la diabetes [20]. De manera similar, el aumento transitorio de la señalización de  $\beta$ -catenina en el páncreas de ratones adultos induce, a través de la actividad de *c-Myc*, una hiperplasia acinar específica que conduce a la pancreatomegalia [21]. Por concluir, Claire Bonal y colaboradores, mediante estudios de rastreo del linaje celular han documentado que, la ausencia de una actividad adecuada de *c-Myc* en progenitores pancreáticos induciría la generación de células acinares mal diferenciadas durante el desarrollo y la adquisición de un fenotipo de adipocito con el envejecimiento. Basándose en estas observaciones, estos autores han propuesto que *c-Myc* es un regulador clave del crecimiento, maduración y mantenimiento de las células acinares, por lo que su inactivación conduce a una transdiferenciación degenerativa en células adiposas [7].

### Herramienta genética iFlpMosaics v2.0

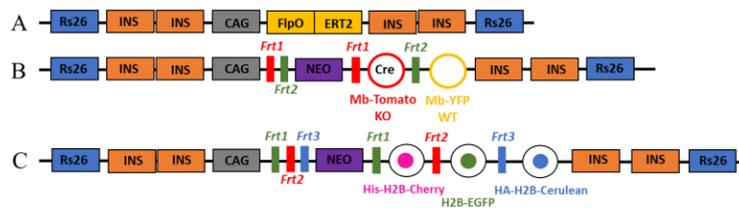
El grupo de genética molecular de la angiogénesis dirigido por el Dr. Rui Benedito en el CNIC, ha desarrollado diversas herramientas genéticas avanzadas que se fundamentan en la combinación de distintas recombinasas y sistemas reporteros, empleados para establecer lo que se denomina genética de intersección. Este enfoque implica la intersección espacio-temporal, secuencial o simultánea de dos o más recombinasas diferentes, para que la expresión de una sea condicional o dependiente de la otra, hecho que permite transformar las debilidades de cada recombinasa en virtudes.

Un ejemplo es la herramienta iFlpMosaics v2.0. Esta herramienta representa un sistema genético inducible de mosaico funcional, ya que permite inducir en el mismo tejido células mutantes y salvajes o wild-type (WT) en muy baja frecuencia y estudiar la competición entre ellas en el mismo entorno celular. Alteraciones en la frecuencia de células mutantes y WT, o en el ratio, permiten identificar si la activación o desactivación de genes de interés confieren una ventaja o desventaja replicativa a las células. Esta herramienta se basa en la combinación de recombinasas diferentes (Cre y Flpasa), las cuales se dirigen a sitios específicos (loxP y Frt) respectivamente, y en la expresión de diversas combinaciones de proteínas fluorescentes según el fenotipo celular. Esto posibilita la obtención de imágenes de microscopia de fluorescencia y posteriormente la comparación y análisis de diferentes fenotipos celulares en el mismo entorno tisular [22].

Esta herramienta se compone de distintos alelos, donde el primero es un alelo activador que cuenta con un promotor CAG que expresa de manera ubicua la recombinasa FlpO-ERT2 (Figura 2A). Tras la administración de TMX o de su metabolito activo 4-OHT, y alcanzar una concentración intracelular suficiente, la recombinasa FlpO-ERT2 es trasladada en el núcleo donde puede catalizar la recombinación de los sitios FRTs del alelo efector (Alelo iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>, Figura 2B). El alelo activador, por lo tanto, permite un control temporal de la inducción y, debido a que la recombinasa FlpO tienen una eficiencia muy baja, la recombinación del alelo efector ocurre a baja frecuencia en los tejidos. Además, tras alcanzar el pico de concentración, los riñones filtran el 4-OHT disminuyendo su concentración en sangre, inhabilitando posteriormente la acción de la recombinasa.

A diferencia del alelo activador, el alelo efector no se expresa en su estado no recombinado y contiene dos casetes de ADN con funciones distintas (Figura 2B). El primer casete contiene la secuencia codificante por la recombinasa Cre y la proteína fluorescente reportera tdTomato unida a una secuencia de localización de membrana (Mb-Tomato), mientras que el segundo casete sólo contiene la secuencia codificante por la proteína fluorescente amarilla unida a una secuencia de localización de membrana (Mb-YFP). Si la recombinasa FlpO-ERT2 del alelo A recombina los sitios Frt1 del primer casete, la célula expresará la recombinasa de alta eficiencia Cre y será marcada por Mb-Tomato, mientras que una célula que haya recombinado los sitios Frt2 no expresará ninguna otra recombinasa y será marcada por Mb-YFP. Además, la recombinación del primer casete induce la expresión constante de la recombinasa Cre, hecho que asegura que múltiples targets/genes flanqueados por sitios LoxP puedan ser recombinados a continuación.

Existe además un tercer alelo *iFlp Nuclei* basado en la tecnología RGB, capaz de teñir la cromatina/núcleos con una proteína fluorescente roja (R), o verde (G), o azul (B). De hecho, este alelo contiene tres casetes de ADN diferentes flanqueadas por sitios Frt, que codifican para H2B-Cherry, H2B-EGFP y H2B-HA-Cerulean (Figura 3C). Por lo tanto, el alelo *iFlp Nuclei* depende del alelo inductor, permitiendo la recombinación y expresión de una de las tres proteínas fluorescentes nucleares tanto en células que hayan recombinado el alelo efector (mutantes y wild-type) como en células que no hayan activado la cascada de recombinación. Debido a que la información codificante por las proteínas fluorescentes nucleares es transmitida a la progenie de células derivadas, este alelo permite realizar estudios de clonalidad, permitiendo cuantificar la capacidad proliferativa de cada célula mediante la estimación del tamaño del clon.



**Figura 2.** Imagen esquemática de los alelos del sistema iFlpMosaics v2.0. **A:** Alelo *Tg* (*Ins-CAG-FlpOERT2*) portador de la recombinasa FlpO-ERT2. **B:** Alelo *iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>*. **C:** Alelo *iFlp Nuclei* portador de los reporteros de clonalidad nuclear H2B-Cherry, H2B EGFP, y H2B-Cerulean. Extraído de Cell Biology. <https://doi.org/10.1101/2023.05.09.540000>

Teniendo en cuenta la aplicabilidad que confiere la herramienta iFlpMosaics v2.0 por su alto grado de inducibilidad en cualquier momento específico y en cualquier tipo de célula, así como las funciones que desempeña *Myc* en la transcripción de diferentes tejidos, en el mantenimiento de la homeostasis epitelial y la prevención de la señalización del crecimiento patógeno en el páncreas, la importancia de conocer dichos mecanismos y la necesidad de nuevos tratamientos dirigidos a enfermedades de origen pancreático, este proyecto tiene como un primer objetivo: caracterizar la herramienta iFlpMosaics v2.0 en tejido pancreático y en un segundo momento estudiar la actividad del factor de transcripción *Myc* en el desarrollo del páncreas postnatal.

## Materiales y Métodos

### Experimentación animal

El proceso de experimentación animal fue desarrollado por el personal autorizado, quienes indujeron a los ratones al primer día de nacidos con 4-OH Tamoxifeno y fueron sacrificados a los 15 días para extraer diferentes órganos. Los protocolos de los experimentos fueron aprobados por el comité ético del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) y por los comités y autoridades locales de ética animal (Comunidad Autónoma de Madrid), según las directrices internacionales de uso de animales de experimentación (PROEX111.7/22).

### Procesamiento de muestras

Tras la eutanasia de los animales se utilizaron páncreas de 3 ratones *Tg(Ins-CAG-FlpOERT2);iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>*; *iFlp Nuclei* control y 3 ratones *Tg(Ins-CAG-FlpOERT2); iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>*; *iFlp Nuclei*; *Myc<sup>Flox/Flox</sup>* *Myc* LOF. Los órganos extraídos se fijaron durante 2 horas en una solución al 4% PFA en PBS a 4°C. Después de lavar el tejido tres veces en PBS durante 10 minutos cada vez, los órganos se almacenaron durante la noche en sacarosa al 30 % (Ref. 102480550 Sigma) en PBS a 4 °C. Luego, las piezas de páncreas se incrustaron en OCT Mounting media (Ref. 361603E) y congeladas a -80°C. Se cortaron criosecciones de páncreas (30 µm) en un criostato (Leica).

### Preparación de las muestras para microscopía confocal

Las secciones fueron rehidratadas durante 5 minutos en PBS 1x, y permeabilizadas durante 15 minutos en 50% PBS-Triton 0.5% (Ref. 1003407650) +20% FBS (Suero Fetal Bovino). Este paso fue seguido de tres lavados en PBS 1x Tween 0.1% (Ref. 8.22184.0500) de 20 minutos cada uno. Tras ello se incubaron las secciones con una solución 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (Ref. 1.24653.0100) a una dilución de 1.1000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se repitieron dos lavados en PBS 1x Tween 0.1% de 20 minutos cada uno de la misma manera, seguidos por un lavado en PBS 1X. A continuación, se procedió a montar con Fluoromount-G (Ref. 0100-01 SouthernBiotech).

### Adquisición de imágenes

A las criosecciones de páncreas se le tomaron imágenes a alta resolución con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP8 equipado con un láser de 405 nm, un láser de 442 nm y un láser blanco que permite la excitación a cualquier longitud de onda desde 470 nm hasta 670 nm. Se utilizó un objetivo de 40x para escaneo confocal. Se adquirieron campos individuales a resolución de 2048x2048 píxeles.

### Análisis de imágenes

Las imágenes adquiridas mediante microscopía confocal multiespectral que muestran los mosaicos tisulares iFlpMosaics v2.0 en tejido pancreático fueron analizadas por diversas herramientas informáticas específicas tales como Fiji/ImageJ para identificar, clasificar y cuantificar las combinaciones de marcadores fluorescentes nucleares y de membrana. Para ello se procedió a visualizar la imagen con todos los marcadores y cada uno de ellos por separado en distintas ventanas. Tras el ajuste de brillo y de sincronización de las distintas ventanas se procedió a la identificación de las células mediante la herramienta Cell Counter y Multipoint Tool. Las células para clasificar según las combinaciones de marcadores en 11 tipos fueron (Cherry+/Tom+; GFP+/Tom+; Cer+/Tom+; DAPI+/Tom+; Cherry+/YFP+; GFP+/YFP+;

CER+/YFP+; DAPI+/YFP+; Cherry+; GFP+; Cer+). Una vez realizado el proceso en cada especie celular se procedió a exportar los resultados cuantificados en formato Csv.

Para el proceso de segmentación de las regiones nucleares de todas las células mediante canal DAPI se empleó el programa QuPath y algoritmo Stardist [23;24], siendo necesario modificar algunos parámetros, tales como: threshold (0.35) y pixelSize (0.5) para poder cuantificar la mayor cantidad de núcleos DAPI existentes.

### Análisis estadístico

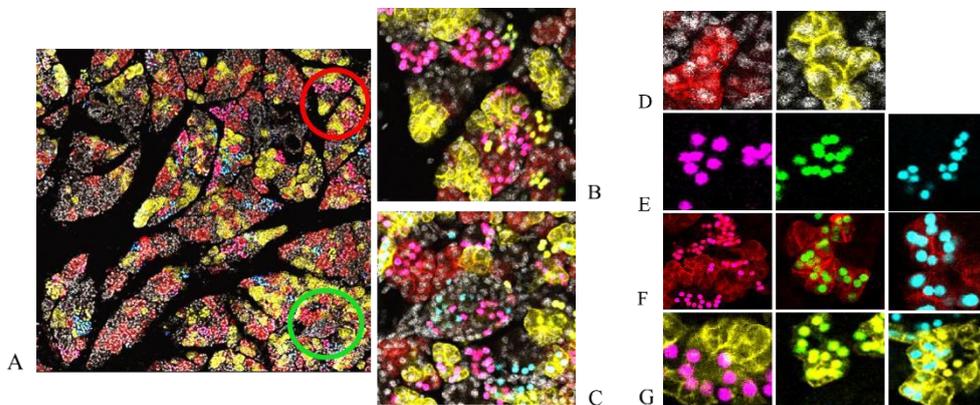
Los datos fueron analizados para verificar una distribución normal, aplicando como test paramétricos (t de Student). El valor de significación se fijó en  $P \leq 0,05$ . Todos los cálculos se realizaron mediante Microsoft Office Excel y los datos fueron representados con GraphPad Prism 8. Los valores se expresan con la media  $\pm$  SEM.

## Resultados

### El sistema iFlpMosaics v2.0 permite recombinar tejido pancreático murino postnatal.

Los ratones iFlpMosaics v2.0 cuentan con diferentes alelos dibujados para permitir realizar estudios ratiométricos y de clonalidad. Como se ha detallado en la introducción, tras la administración del compuesto 4-OH tamoxifeno la recombinasa FlpO-ERT2 codificada por el alelo inductor (alelo A, figura 2) se desplaza en el núcleo donde puede recombinar de manera aleatoria los sitios Frt del alelo efector *iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>* (alelo B, figura 2), los sitios Frt del alelo reportero de clonalidad *iFlp Nuclei* (alelo C, figura 2), o ambos alelos.

Para comprobar el correcto funcionamiento de la herramienta iFlpMosaics v2.0 en tejido pancreático, se adquirieron imágenes de microscopía confocal multiespectral de los ratones control *Tg(Ins-CAG-FlpOERT2);iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup> ;iFlp Nuclei*. Así se observó que los marcadores de fluorescencia pueden ser detectados adquiriendo la señal endógena (Figura 3A) tanto en regiones del páncreas exocrino como endocrino (Figura 3B-C). En el tejido analizado se observó la presencia de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Nuclei<sup>-</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>-</sup> (Figura 3D), es decir células que han recombinado solo el alelo efector. Además, se detectaron grupos de células iFlp-Mosaics<sup>-</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> (Figura 3E), es decir células que han recombinado solo el alelo reportero de clonalidad. Por último, se detectaron grupos de células en las cuales tanto los marcadores de membrana como los reporteros nucleares han sido activados, o células duales iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> (Figura 3F-G).

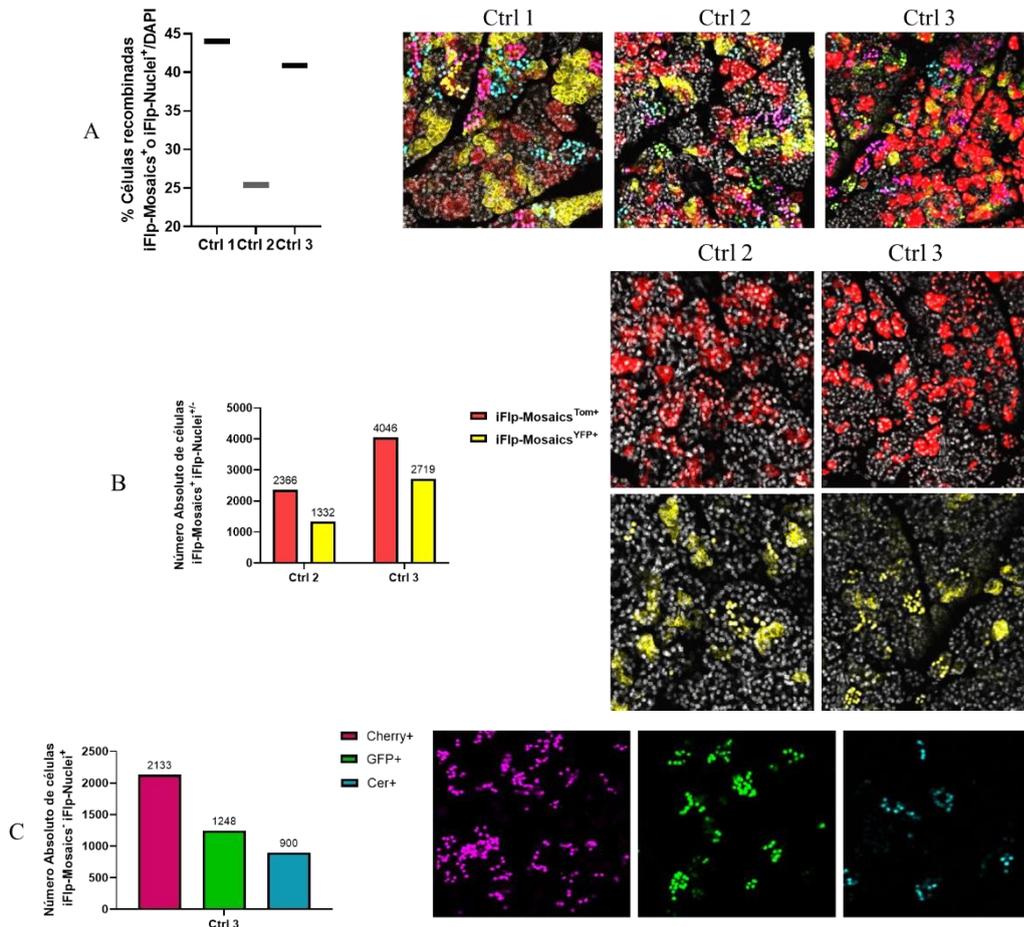


**Figura 3.** A. Imagen de microscopía confocal multiespectral que evidencia recombinación en tejido pancreático del Control I. B: Recombinación en regiones del páncreas endocrino C: Recombinación en regiones del páncreas exocrino. D: iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Mosaics<sup>YFP-</sup>. E: iFlp-Nuclei<sup>+</sup>. F: iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup>. G: iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup>.

Seguidamente nos propusimos medir la eficiencia de recombinación alcanzada por la herramienta iFlpMosaics v2.0 en el ensayo. Como se puede observar en la (Figura 4A) el porcentaje de células recombinadas en el páncreas de los ratones control puede variar entre un 25% y 45%, basado en el total de células iFlp-Mosaics<sup>+</sup> o iFlp Nuclei<sup>+</sup> sobre el total de núcleos detectados.

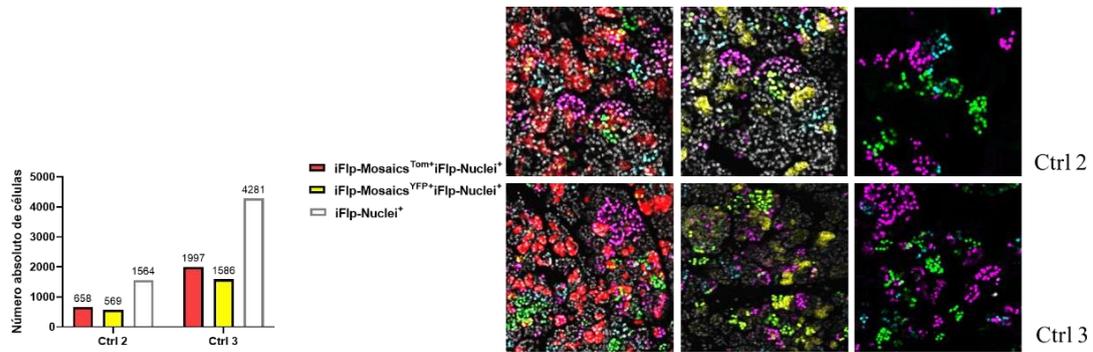
A continuación, nos centramos en profundizar en el tipo de recombinación obtenida. Para ello hay que tener en cuenta que, aunque la recombinación de los sitios Frt sea aleatoria, estos se encuentran a unas distancias diferentes. Si tomamos como ejemplo el alelo *iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>* (Figura 2B), se puede observar que los sitios de recombinación que activan el primer caset están más cerca entre ellos comparado con el segundo caset en el que los sitios de recombinación están más distantes. Debido a estas diferencias la recombinasa FlpO-ERT2 favorecerá la recombinación de los sitios más cercanos en cierta medida. Como era esperado,

se observó que hay un mayor número de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> con respecto a las células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> en muestras de páncreas control. Como se puede observar en la figura 4B, el número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> es mayor que el número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> tanto en la muestra control 2 como en la muestra control 3, en una proporción de alrededor de 1.5 : 1 de reporteros. Para seguir esta perspectiva se comprobó si el alelo *iFlp Nuclei* también sigue las mismas dinámicas en la recombinación de los sitios Frt que flanquean los 3 casetes de los reporteros de clonalidad nuclear (Cherry, GFP, Cerulean). Para ello estudiamos células recombinantes iFlp-Nuclei<sup>+</sup> iFlp-Mosaics<sup>-</sup>. En la muestra obtenida del animal Control 3, se observó que hay un mayor número de células Cherry<sup>+</sup>, seguido de células GFP<sup>+</sup> y células Cerulean<sup>+</sup>, pudiéndose identificar 2133 células Cherry<sup>+</sup>, 1248 células GFP<sup>+</sup> y 900 células Cerulean<sup>+</sup> (Figura 4C). Estos datos nos indican que tras la inducción los marcadores de clonalidad nuclear se sitúan en una proporción de alrededor de 2.5 : 1.5 : 1 de reporteros Cherry : GFP : Cerulean.



**Figura 4.** Caracterización del modelo iFlp Mosaics V2.0 en tejido pancreático en los ratones control. **A:** Porcentaje de células recombinadas de ratones control. **B:** Número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>+</sup> iFlp-Nuclei<sup>-/-</sup> de ratones control 2 y 3. **C:** Número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>-</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> por separadas de ratón control 3.

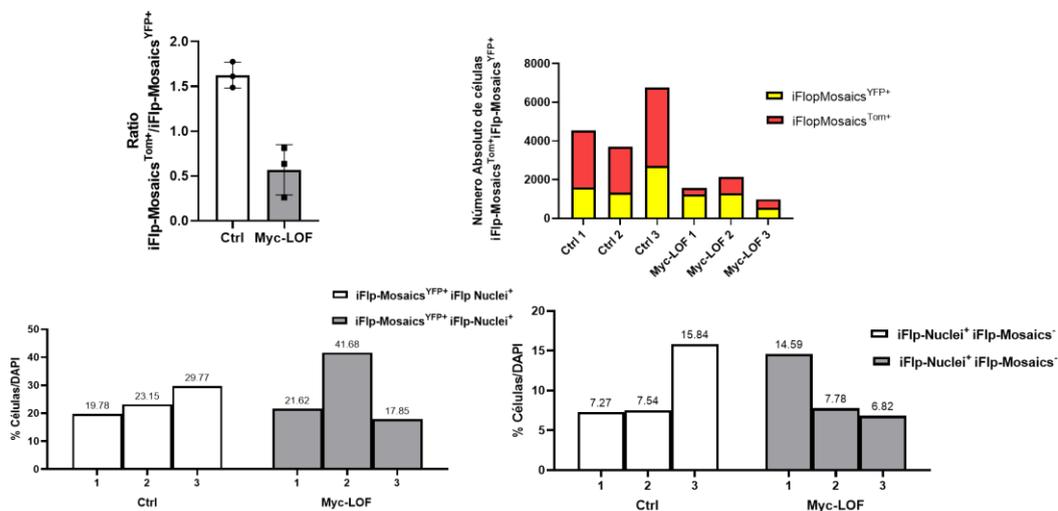
Una vez caracterizado el comportamiento de la recombinasa FlpO-ERT2 y comprobada la efectiva recombinación del alelo *iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>* y del alelo *iFlp Nuclei* por separado, se profundizó en el estudio de los marcadores de clonalidad más en detalle. En este caso el objetivo ha sido identificar los marcadores, o combinaciones de ellos, más informativos para realizar estudios de clonalidad. Debido a que la recombinación de los dos alelos es independiente (FlpO-ERT2 dependiente), una recombinación demasiado elevada del tejido podría generar una situación en la que todas las células hayan recombinado ambos alelos y por lo tanto los marcadores de clonalidad sean tan frecuentes que no pudiera permitrarnos identificar la expansión clonal de las células. Para ello se realizó una comparación entre el número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup>, no informativos en estudios de clonalidad, con respecto a las células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> (marcadores duales). Como se puede observar comparando la figura 4B y la figura 5 hay más células de las primeras. En este mismo sentido observamos que las células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> de los ratones control en comparación con las iFlp-Mosaics<sup>-</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> son menos frecuentes (Figura 5). En conclusión, estos datos demuestran que la recombinación de los alelos *iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>* y *iFlp Nuclei* a la dosis empleada ha sido efectiva y no saturante.



**Figura 5.** Número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+/YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> (marcadores duales de recombinación) y iFlp-Nuclei<sup>+</sup> de los ratones control 2 y 3.

### La delección del gen *Myc* induce un cambio en el ratio entre células mutantes sanas en favor de las sanas.

Caracterizado el modelo iFlp Mosaics v2.0 en tejido pancreático de ratones control y comprobado que los alelos funcionan de la manera esperada, en un segundo momento se estudió el papel del factor de transcripción *Myc* en el desarrollo del páncreas postnatal en ratones *Tg(Ins-CAG-FlpOERT2);iFlp<sup>MbTomato-Cre/MbYFP</sup>; iFlp Nuclei; Myc<sup>Flox/Flox</sup>* (*Myc*-LOF). Para ello decidimos calcular el ratio entre células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup>. Como se puede observar en la (Figura 6A) hay un cambio en el ratio de células entre un grupo y otro. Este cambio en el ratio se debe a que el número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> identificadas en los ratones mutantes es drásticamente inferior con respecto al número de células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup>, contrario a lo sucedido en los ratones controles cuya proporción de células fue inversa (Figura 6B). Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de las células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Nuclei<sup>+</sup> iFlp-Mosaics<sup>-</sup> entre los ratones controles y *Myc*-LOF. Estos resultados nos indican que al término de los ensayos las células mutantes contribuyen mínimamente al desarrollo postnatal del páncreas murino.



**Figura 6.** Comportamiento del factor de transcripción *Myc* en ratones (*Myc*-LOF). **A:** Ratio de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup>/ iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup>. **B:** Número absoluto de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup>. **C:** Frecuencia de células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup>. **D:** Frecuencia de células iFlp-Nuclei<sup>+</sup> iFlp-Mosaics<sup>-</sup>.

### Discusión

Para comprender la función de un gen en células mutadas deben compararse con las células normales. En la mayoría de los estudios biomédicos este análisis comparativo se realiza con células presentes en diferentes animales y por lo tanto no experimentan el mismo microambiente tisular. Con la herramienta iFlpMosaics v2.0, las células normales y mutantes pueden ser inducidas ratiométricamente y con código de barras multiespectral dentro de la misma ventana temporal y microambiente. Esto permite una mejor comprensión de cómo las mutaciones genéticas inducidas afectan la biología de células individuales con mayor precisión y confiabilidad durante el desarrollo de tejidos, la homeostasis o enfermedades [22].

Mediante la expresión de diversas combinaciones de proteínas fluorescentes se lograron imágenes de microscopia confocal multiespectral que permitió establecer una comparación entre los ratones WT y mutantes en un mismo entorno tisular. Nuestros resultados mostraron una evidencia efectiva al caracterizar la herramienta iFlpMosaics v2.0 en tejido pancreático de ratones WT, dado a que se pudo observar la capacidad de recombinación en el tejido usando como base los marcadores fluorescentes.

Lo primero que pudimos identificar es que fue posible generar todas las combinaciones teóricas de marcadores de fluorescencia; que la recombinación fue efectiva tanto en tejido de páncreas endocrino como exocrino, lo cual fue fácil de observar dada la propia morfología de las células del páncreas, sin la necesidad del empleo de marcadores específicos de tejido que de una forma u otra podrían interferir sobre la señal de fluorescencia de los marcadores nucleares y de membrana empleados, llegando a complejizar la cuantificación. En este sentido se pudo observar una capacidad de recombinación de casi el 50% en los ratones control 1 y 3 y de un 25% en el ratón control 2. A pesar de usar las mismas dosis de inducción la recombinación efectiva en los tejidos puede ser variable y generar tejidos más densamente recombinado o menos. Esto puede deberse a variaciones técnicas durante la administración del Tamoxifeno o bien variaciones biológicas de la especie.

Sin embargo, independientemente de la dosis la presencia de una mayor cantidad de células recombinadas iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> con respecto a las células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> es indicativo de que la inducción sigue el comportamiento esperado, de igual manera al comparar las células iFlp-Mosaics<sup>-</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> por separadas se pudo comprobar que existía un número mayor de células Cherry<sup>+</sup> con respecto a GFP<sup>+</sup> y Cerulean<sup>+</sup>. En este sentido un aspecto importante para tener en cuenta era determinar las posibles células a utilizar para estudios futuros de clonalidad, lo cual se hizo evidente al notarse una mayor cantidad de células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> con respecto a las células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup>; de igual manera se comportaron con respecto a las células iFlp-Nuclei<sup>+</sup> siendo las células de marcadores duales las óptimas para realizar el estudio. Independientemente de que las células iFlp-Nuclei<sup>+</sup> pueden ser más frecuentes que las duales, no se descarta la posibilidad de seguir empleando las células Cerulean<sup>+</sup> al seguir siendo las menos frecuentes y lo cual ahorraría tiempo al cuantificar.

En un segundo momento calculado el ratio entre las células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> y iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> se pudo notar diferencias entre las células del grupo control con respecto a las mutantes, a expensas de una disminución de las células iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> en relación con las células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup>, los mecanismos que conllevan a esta disminución celular no son conocidos, aunque podemos llegar a plantear que puede deberse a que las células han amplificado menos, dato que se puede saber al realizar estudios de expansión clonal. Por otro lado, no se observaron cambios en la frecuencia de las células iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Nuclei<sup>+</sup> iFlp-Mosaics<sup>-</sup> entre los ratones controles y Myc-LOF, lo que sugiere que al parecer no existe una acción compensatoria de las células WT; sin embargo, no podemos saber la recombinación basal alcanzada en los ratones Myc-LOF y concluir firmemente si las células WT se han amplificado o no, siendo necesario realizar estudios de clonalidad.

Otra posible hipótesis que puede justificar nuestros resultados viene dada porque la disminución de las células mutantes con respecto a las células WT se deba a apoptosis celular mediada por el fenómeno de competencia celular y que se ejecuta a través de la eliminación apoptótica de la población menos apta por mecanismos celulares no autónomos [25]. La supercompetencia es una variante de la competencia celular en la que las células que sobreexpresan moderadamente *Myc* superan a las células de tipo salvaje WT [26]. Un estudio de Claveria y colaboradores sobre la competencia celular endógena impulsada por *Myc* en el embrión temprano de mamífero muestra que la competencia celular es promovida por un desequilibrio en la dosis de *Myc* entre las células vecinas en el epiblasto de ratón y las células madre embrionarias, fundamentalmente plantean que, no son los niveles absolutos de *Myc*, sino más bien los niveles relativos entre las células vecinas los que determinan la viabilidad celular, y por lo tanto la competencia celular natural detectada en el epiblasto de ratón conduce a la eliminación de células con menor expresión de *Myc*. Sus hallazgos indican que la competencia celular es una característica general de los metazoos, lo que sugiere que representa una propiedad fundamental de la interacción celular dentro de los tejidos [19]. De esta manera y como se ha venido mencionando, el cambio en la proporción entre células mutantes iFlp-Mosaics<sup>Tom+</sup> y células WT iFlp-Mosaics<sup>YFP+</sup> iFlp-Nuclei<sup>+</sup> y iFlp-Nuclei<sup>+</sup> iFlp-Mosaics<sup>-</sup>, ya sea por apoptosis de las células mutantes o por falta de expansión de las células WT, nos muestra el papel crucial del factor de transcripción *Myc* en el desarrollo del páncreas postnatal.

## Conclusiones y perspectivas futuras

Una vez realizado el estudio, pudimos demostrar que el sistema genético de mosaico funcional iFlp Mosaics v2.0 es inducible en tejido pancreático; además hemos comprobado el papel crucial del factor de transcripción *Myc* en el desarrollo del páncreas postnatal.

A futuro sería interesante realizar un análisis de clonalidad con la finalidad de estudiar la distribución espacial de los clones y si hay acción compensatoria de las células WT. De igual manera sugerimos realizar estudios que permitan determinar el volumen y peso del páncreas para observar si existe hipoplasia acinar en correspondencia con lo identificado por otros autores; así como estudios de apoptosis en ensayos a corto plazo. Otro aspecto importante por considerar sería el evaluar los cambios en la expresión y localización de alguno de los componentes de adhesión celular (E-cadherina y  $\beta$ -catenina), visto que la eliminación de alguno de estos componentes ha revelado efectos posteriores en el desarrollo y mantenimiento del páncreas, así como la implicación de *Myc* en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina que a su vez se activa durante el desarrollo pancreático.

## Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a la Fundación Carolina por la concesión de la Beca y la oportunidad de poder continuar mis estudios de posgrado en este país. A los profesores y compañeros de clase del Máster Universitario en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular de la Universidad de Alcalá, por sus aportes y enseñanzas. A todo el maravilloso equipo del Grupo de Genética Molecular de la Angiogénesis del CNIC que me acompañaron durante todo este proceso y fueron claves para la realización de este TFM. Además, un agradecimiento especial al Ingeniero Biomédico Alejandro Rivera Sánchez por el aporte de la imagen esquemática de la figura 2.

## Referencias bibliográficas

1. Case, R. M. (2006). Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas? *Pancreatology*, 6(3), 180-190. <https://doi.org/10.1159/000091849>
2. Rahier, J., Goebbels, R. M., & Henquin, J. C. (1983). Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*, 24(5). <https://doi.org/10.1007/BF00251826>
3. Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
4. Islam, Md. S. (Ed.). (2010). *The Islets of Langerhans* (Vol. 654). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3>
5. Van Eyll, J. M., Passante, L., Pierreux, C. E., Lemaigre, F. P., Vanderhaeghen, P., & Rousseau, G. G. (2006). Eph receptors and their ephrin ligands are expressed in developing mouse pancreas. *Gene Expression Patterns*, 6(4), 353-359. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.09.010>
6. Anzi, S., Stolovich-Rain, M., Klochendler, A., Fridlich, O., Helman, A., Paz-Sonnenfeld, A., Avni-Magen, N., Kaufman, E., Ginzberg, M. B., Snider, D., Ray, S., Brecht, M., Holmes, M. M., Meir, K., Avivi, A., Shams, I., Berkowitz, A., Shapiro, A. M. J., Glaser, B., ... Dor, Y. (2018). Postnatal Exocrine Pancreas Growth by Cellular Hypertrophy Correlates with a Shorter Lifespan in Mammals. *Developmental Cell*, 45(6), 726-737.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.024>
7. Bonal, C., Thorel, F., Ait-Lounis, A., Reith, W., Trumpp, A., & Herrera, P. L. (2009). Pancreatic Inactivation of c-Myc Decreases Acinar Mass and Transdifferentiates Acinar Cells Into Adipocytes in Mice. *Gastroenterology*, 136(1), 309-319.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.015>
8. Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1438-1449. <https://doi.org/10.1172/JCI38019>
9. Andrew, D. J., & Ewald, A. J. (2010). Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Developmental Biology*, 341(1), 34-55. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.09.024>
10. Guillot, C., & Lecuit, T. (2013). Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis. *Science*, 340(6137), 1185-1189. <https://doi.org/10.1126/science.1235249>
11. Macara, I. G., Guyer, R., Richardson, G., Huo, Y., & Ahmed, S. M. (2014). Epithelial Homeostasis. *Current Biology*, 24(17), R815-R825. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.068>
12. Wang, C., Jamal, L., & Janes, K. A. (2012). Normal morphogenesis of epithelial tissues and progression of epithelial tumors. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 4(1), 51-78. <https://doi.org/10.1002/wsbm.159>

13. Villasenor, A., Chong, D. C., Henkemeyer, M., & Cleaver, O. (2010). Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development*, 137(24), 4295-4305. <https://doi.org/10.1242/dev.052993>
14. Serrill, J. D., Sander, M., & Shih, H. P. (2018). Pancreatic Exocrine Tissue Architecture and Integrity are Maintained by E-cadherin During Postnatal Development. *Scientific Reports*, 8(1), 13451. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31603-2>
15. Nakhai, H., Siveke, J. T., Mendoza-Torres, L., & Schmid, R. M. (2008). Conditional inactivation of *Myc* impairs development of the exocrine pancreas. *Development*, 135(19), 3191-3196. <https://doi.org/10.1242/dev.017137>
16. Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., & Croce, C. M. (1982). Human *c-myc* onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7824-7827. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7824>
17. Brooks, M. W., Littlewood, D., & Evan, I. (s. f.). *Nit Activity of the c-Myc Protein*.
18. Dang, C. V. (1999). C-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 1-11. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.1>
19. Clavería, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., & Torres, M. (2013). *Myc*-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature*, 500(7460), 39-44. <https://doi.org/10.1038/nature12389>
20. Laybutt, D. R., Weir, G. C., Kaneto, H., Lebet, J., Palmiter, R. D., Sharma, A., & Bonner-Weir, S. (2002). *Overexpression of c-Myc in  $\beta$ -Cells of Transgenic Mice Causes Proliferation and Apoptosis, Downregulation of Insulin Gene Expression, and Diabetes*. 51.
21. Strom, A., Bonal, C., Ashery-Padan, R., Hashimoto, N., Campos, M. L., Trumpp, A., Noda, T., Kido, Y., Real, F. X., Thorel, F., & Herrera, P. L. (2007). Unique mechanisms of growth regulation and tumor suppression upon *Apc* inactivation in the pancreas. *Development*, 134(15), 2719-2725. <https://doi.org/10.1242/dev.02875>
22. Garcia-Gonzalez, I., Gambera, S., Regano, A., Rocha, S. F., Garcia-Ortega, L., Lytvyn, M., Sanchez-Muñoz, M. S., Garcia-Cabero, A., Zagorac, I., Luo, W., Fernández-Chacón, M., Casquero-García, V., Lunella, F. F., & Benedito, R. (2023). *iFlpMosaics: A method for the ratiometric induction and high-throughput comparative analysis of mutant and wildtype cells* [Preprint]. *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.05.09.540000>
23. Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., & Myers, G. (2018). Cell Detection with Star-Convex Polygons. En A. F. Frangi, J. A. Schnabel, C. Davatzikos, C. Alberola-López, & G. Fichtinger (Eds.), *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018* (Vol. 11071, pp. 265-273). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00934-2_30)
24. Weigert, M., Schmidt, U., Haase, R., Sugawara, K., & Myers, G. (2020). Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy. 2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), 3655-3662. <https://doi.org/10.1109/WACV45572.2020.9093435>
25. Moreno, E., Basler, K., & Morata, G. (2002). Cells compete for Decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature*, 416(6882), 755-759. <https://doi.org/10.1038/416755a>
26. Moreno, E., & Basler, K. (2004). *DMyc* Transforms Cells into Super-Competitors. *Cell*, 117(1), 117-129. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00262-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00262-4)