

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DE XENOINJERTOS
HUMANOS DE TUMORES PERIAMPULARES



TESIS DOCTORAL

DANIEL FRANCISCO APARICIO SÁNCHEZ

SEVILLA, 2017

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

“ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE XENOINJERTOS HUMANOS DE TUMORES PERIAMPULARES”

DOCTORANDO: DANIEL FRANCISCO APARICIO SÁNCHEZ

TUTOR: PROF. DR. D. FRANCISCO JAVIER PADILLO RUIZ

DIRECTORES: PROF. DR. D. FRANCISCO JAVIER PADILLO RUIZ

PROF. DR. D. LUIS MIGUEL MARÍN GÓMEZ

PROF. DR. D. JORDI MUNTANÉ RELAT

*A mis padres y mi hermana
que lo han dado todo por mí
y siempre han estado ahí.*

*A mi abuelo Pepe por haber sido
un ejemplo de vida y superación diaria.*

*A mi tío Curro (DEP) porque la vida
le negó llegar adonde yo he llegado
y siempre estará en mi corazón*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. D. Francisco Javier Padillo Ruiz, D. Luis Miguel Marín Gómez y D. Jordi Muntané Relat, quienes además de transmitirme su vocación de cirujanos-investigadores, me han ayudado, animado, orientado y estimulado de forma constante e incansable durante todos los años de estudio y duro trabajo que ha conllevado esta tesis doctoral. Agradecerles la confianza que han depositado en mí y que nunca he recibido un “no” por respuesta cuando he necesitado su ayuda.

A mi querida amiga y compañera D.^a Mercedes Rubio Manzanares-Dorado, por haberme acompañado en este duro camino de trabajo que supone la tesis doctoral y haber trabajado en equipo de forma excepcional.

A mis compañeros y maestros de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante Hepático del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, por su colaboración totalmente desinteresada a la hora de aportar pacientes al estudio y en la extracción de muestras en el quirófano.

A todos los pacientes que, estando en las peores horas de su vida y sabiendo que no obtendrían ningún beneficio, han aceptado de forma voluntaria ser incluidos en este estudio.

- *“Está bien, lo intentaré”*
- *“No, no lo intentes, hazlo o no lo hagas, pero no lo intentes”*

Yoda (Star Wars: El imperio contraataca)

REFERENCIA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADCP:	Adenocarcinoma de Páncreas.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
AKT:	Serine/threonine kinase
APC:	Células presentadoras de antígeno
ARF:	Igual que CDKN2A (p16)
ATDC:	Proteína asociada al grupo D de Ataxia-Teleangiectasia.
ATM:	Ataxia-Teleangiectasia Mutated Gene
ATR:	Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related
B72.3 (TAG-72):	Tumor Associated Glycoprotein 72
BOP:	N-nitrosobis-(2-oxoprolol)-amina.
BRCA:	Breast Cancer
CA125:	Cancer Antigen 125
CA15.3:	Cancer Antigen 15.3
CA19.9:	Cancer Antigen 19.9
CA27.29:	Cancer Antigen 27.29
CDKN2A (p16):	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CEA:	Antígeno carcinoembrionario.
CEEA:	Comité de Ética y Experimentación animal.
CGA:	Campo de gran aumento.
CXCL12:	Cis-X-Cis motif chemokine 12
CXCR4:	Cis-X-Cis chemokine receptor type 4.
DCC:	Deleted in Colorectal Cancer
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
EEUU:	Estados Unidos
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR (Her1):	Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico
EMA:	Antígeno de Membrana Epitelial
FAK:	Kinasa de Adhesión Focal
FAMMM:	Familial atypical multiple mole melanoma
FGF:	Factor de Crecimiento Fibroblasto
GEM:	Ratón genéticamente modificado
H&E:	Hematoxilina-Eosina
HGF:	Factor de crecimiento hepatocitario.
IBIS:	Instituto de Biomedicina de Sevilla
INK4:	Igual que CDKN2A (p16)
K-RAS:	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog.
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEM:	Minimun Essential Medium
MET:	Receptor y oncogén del HGF.
MKK:	Mitogen Kinase Kinase
MMP:	Proteínas de la matriz de la Metaloproteinasas.
MUC:	Mucin protein, gene or glycoprotein
MYB:	MYeloBlastosis trascription factor
NF-KB:	(Mediador inflamatorio pan crónica)
P16 (CDKN2A):	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
P53:	Proteína supresora de tumores (“guardián del genoma”)
PanNI:	Neoplasia Intraductal de Páncreas

PDGF:	Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas.
PRSS-1:	Proteasa de la serina 1.
QT:	Quimioterapia
RT:	Radioterapia
RER+:	Fenotipo de error de replicación (Ca. Colorrectal)
S100A4:	S100 Calcium Binding Protein A4
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida
SLe:	Antígeno sializado de Lewis o CA19.9
SMA:	Actina del Músculo Liso
SMAD4 o DPC4:	Gen supresor de tumores en el Cr.18 (18q21.1)
SPARC (BM-40):	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SRC:	Tirosina kinasa que inhibe la proliferación celular.
STK11/LKB1:	Serine/Threonine kinase 11/Liver Kinase B1
SV40 (tsTAg):	Simian Virus 40
TBSA-BSAT:	0.12 g Tris-hidroximetil-aminometano, 0,9 g NaCl, 1 ml de azida sódica al 2%, 2 g albúmina bovina, 0,1 ml de Triton X-100.
TCF-4:	Factor de transcripción 4.
TGF α y β :	Factor de crecimiento transformante alfa y beta
TGM2:	Transglutaminasa II
TOP2A:	Topoisomerasa 2 Alfa.
TP53:	p53
UE:	Unión Europea
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular.
Y col.	y colaboradores

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los tumores periampulares y especialmente el adenocarcinoma de páncreas presentan en la actualidad una supervivencia a los 5 años del 5%. La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección, pero no ha conseguido mejorar los datos de supervivencia en los últimos 20 años. Los tratamientos sistémicos con fármacos quimioterápicos presentan unos resultados limitados y la investigación en ese campo es escasa. El objetivo del estudio es desarrollar un modelo experimental de tumor periampular mediante xenoinjerto subcutáneo en ratón y comprobar los posibles cambios histológicos de dicho tumor en los sucesivos pases en ratones, para que sea la base de nuevos proyectos de investigación sobre tumores periampulares. Existen modelos experimentales previos en ratones realizados con xenoinjertos de metástasis hepáticas y otros en el que se han utilizado tóxicos que no han tenido los resultados esperados con índices de desarrollo tumoral cercanos al 40%.

MATERIAL Y MÉTODO: A partir de pacientes diagnosticados de tumores periampulares y sometidos a intervención quirúrgica para su tratamiento, se obtiene una porción tumoral bajo consentimiento del paciente que se procesa para estudio histológico y con la que se realiza un implante subcutáneo en el ratón (P0). Si P0 desarrolla tumor se sacrifica y se obtiene muestra para estudio histológico y nuevo implante subcutáneo (P1). Se vuelve a realizar el mismo procedimiento obteniéndose un último pase de ratones (P2). De toda las muestras obtenidas se realiza un estudio histopatológico (Hematoxilina-eosina y Masson) e inmunohistoquímico (marcadores Ki67, Alfa-SMA, CD31 y

TUNEL). Se utilizan métodos estadísticos para comprobar si existen diferencias histológicas entre la muestra humana inicial y los diferentes pases.

RESULTADOS: El índice de desarrollo tumoral global de la muestra es del 66.6%. Las variables fenotípicas que han demostrado influir en el crecimiento tumoral son el número de mitosis por CGA y la estirpe tumoral. En el análisis histopatológico del implante subcutáneo de xenoinjerto de carcinoma periampular hay una tendencia a la desdiferenciación tumoral a lo largo de los pases. El análisis inmunohistoquímico del implante subcutáneo de xenoinjerto de carcinoma periampular presenta un aumento en la expresión del marcador alfa-SMA (fibrosis) a lo largo de los pases. No se encontraron diferencias en la expresión de los marcadores Ki67, TUNEL y CD31.

CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el modelo experimental mediante xenoinjerto humano de tumor periampular en ratón no sufre variaciones histológicas significativas y puede ser útil para el desarrollo de ensayos clínicos futuros donde utilizar nuevos fármacos para mejorar la supervivencia de dichas lesiones neoplásicas.

ÍNDICE

	Pág.
CAP. I. INTRODUCCIÓN	1
1. Epidemiología, Factores de Riesgo y mortalidad de tumores periampulares	2
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 Factores de Riesgo	5
1.2.1 Tabaquismo	5
1.2.2 Dieta.....	6
1.2.3 Lesiones premalignas y pancreatitis crónica.....	6
1.2.4 Síndromes hereditarios	6
1.2.5 Aminas aromáticas	7
1.2.6 Diabetes.....	8
1.2.7 Lugar de nacimiento.....	8
1.2.8 Genética	8
1.3 Mortalidad	10
2. Histología, patrones de diseminación y marcadores celulares.....	13
2.1 Histología de los tumores periampulares	13
2.2 Patrones de diseminación.....	18
2.3 Marcadores celulares	20

3. Biología molecular: genes, oncogenes, factores de crecimiento y sus receptores	24
3.1 Oncogenes	25
3.2 Genes supresores	26
3.3 Genes mantenedores del genoma	28
3.4 Otros genes favorecedores de la tumorogénesis.	28
3.5 Factores de crecimiento y sus receptores	29
3.6 Cáncer de páncreas familiar	31
4. Importancia de los modelos experimentales	33
5. Modelos animales	37
5.1 Tumores inducidos con sustancias carcinógenas.	37
5.2 Ratones genéticamente modificados: GEM	39
5.3 Injertos tumorales	41
5.3.1 Aloinjertos	41
5.3.2 Xenoinjertos	41
5.3.3 Según lugar implante	42
5.3.3.1 Heterotópicos	42
5.3.3.2 Ortotópicos	43
5.3.4 Según origen de células implantadas	45
5.3.4.1 Tumores in vitro	45
5.3.4.2 Tumor Graft	45
CAP. II. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL	48
CAP. III. HIPÓTESIS	51
CAP. IV. OBJETIVOS	53
CAP. V. MATERIAL Y MÉTODO	55

1. Diseño del estudio.....	56
2. Pacientes y animal de experimentación.....	58
2.1 Pacientes	58
2.1.1 Criterios de inclusión	58
2.1.2 Criterios de exclusión.....	59
2.1.3 Características de la muestra	59
2.2 Animal de experimentación.....	65
2.2.1 Taxonomía	66
2.2.2 Otras características	67
3. Metodología	
3.1 Instalaciones y mantenimiento de los animales de experimentación	68
3.2 Implante de xenoinjerto.....	69
3.2.1 Obtención de muestra para implante.....	69
3.2.2 Preparación de la muestra para implante.....	69
3.2.3 Procedimiento de implante	70
3.2.4 Anestesia	71
3.2.5 Secuencia de pases.....	72
3.3 Seguimiento y toma de muestras	75
3.4 Estudio histopatológico e inmunohistoquímico	77
3.4.1 Procesamiento y preservación del tejido tumoral	77
3.4.2 Preparación del tejido para el estudio histológico	78
3.4.2.1 Desparafinado	78
3.4.2.2 Hidratación.....	78
3.4.3 Histopatología: Hematoxilina-Eosina y Masson.....	79
3.4.4 Inmunohistoquímica	81

3.5	Variables del estudio	88
3.6	Análisis estadístico de los datos	90
3.7	Soporte bibliográfico e informático.....	91
3.8	Ética y legislación	92
CAP. VI.	RESULTADOS	93
1.	Características de las muestras humanas implantadas.	94
2.	Árbol de implantes.....	97
3.	Eficacia y seguridad de la técnica quirúrgica en el animal de experimentación	98
3.1	Eficacia (Supervivencia/Mortalidad).....	98
3.2	Seguridad (Morbilidad)	100
3.3	Evolución del peso	101
4.	Evolución de los parámetros histopatológicos	103
4.1	Hematoxilina-eosina.....	103
4.2	Masson	103
5.	Evolución de los parámetros inmunohistoquímicos ..	104
5.1	Ki-67	105
5.2	Alfa-SMA.....	106
5.3	TUNEL.....	107
5.4	CD31	108
6.	Comparación de desarrollo tumoral según características fenotípicas	109
CAP. VII	DISCUSIÓN.....	111

1. Discusión de la metodología	113
2.1. Animal utilizado en el modelo.....	113
2.2. El modelo de xenoinjerto subcutáneo	115
2.3. Parámetros anatomopatológicos e inmunohistoquímicos analizados.....	118
2. Análisis de los resultados obtenidos	119
CAP. VIII CONCLUSIONES	124
CAP IX. BIBLIOGRAFÍA	126
ANEXOS.....	137
I. Informe del comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Sevilla (Proyecto CEEA-US2014-013/5).....	138
II. Modelo de consentimiento informado entregado a los pacientes	140
III. Clasificación TNM del Adenocarcinoma de Páncreas según la AJCC	141

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA, FACTORES DE RIESGO Y MORTALIDAD DE LOS TUMORES PERIAMPULARES

Los tumores periampulares son un conjunto de lesiones neoplásicas de diferente estirpe celular que afectan a la Ampolla o Papila de Vater y a un radio de 2 cm alrededor ella. Esta estructura está formada por el conducto biliar intraduodenal, el conducto pancreático duodenal y la mucosa duodenal. Los tumores de la región ampular ordenados mayor a menor frecuencia son: Adenocarcinoma de páncreas (ADCP), Ampuloma, Colangiocarcinoma distal y adenocarcinoma de la 2ª porción duodenal.

Dentro de este grupo de tumores cabe destacar el ADCP por tener el peor pronóstico de todos ellos y el menor índice de resecabilidad (Tabla 1) y menor supervivencia a largo plazo (Figura 1). [1]

Tabla 1. Frecuencia y tasa de resecabilidad de los distintos tumores periampulares obtenido de Ferraro y Ferraina [1]

Tipo de tumor	n	Nº de tumores resecados	Tasa de resecabilidad
Ca de cabeza de páncreas	1819	332	18.3%
Ca ampular	459	351	76.5%
Ca de vía biliar distal	309	161	52.1%
Ca duodenal	50	31	62%

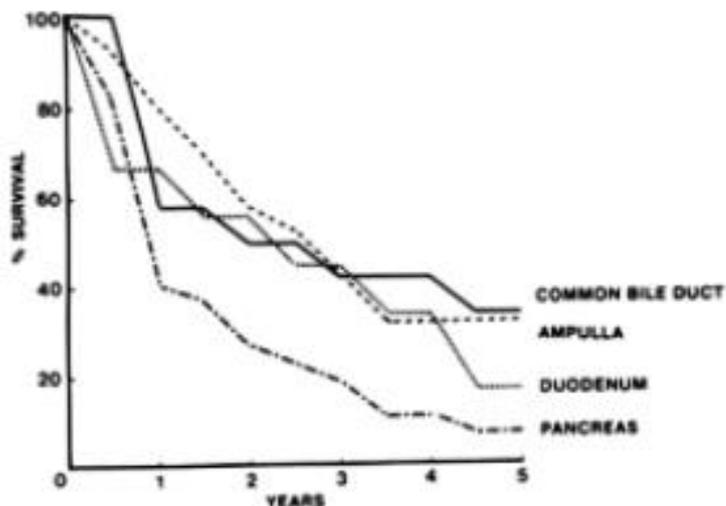


Figura 1. Curva de supervivencia de los tumores periampulares [1]

La etiología del cáncer de páncreas sigue siendo desconocida a pesar los avances realizados en los últimos años. Esto supone un desafío para el investigador y deja abierto el camino para el desarrollo de nuevas líneas de trabajo que permitan guiarnos hacia un tratamiento más eficaz que el existente actualmente. El pronóstico de supervivencia de este tumor a los 5 años es menor del 5%, lo que hace que su incidencia sea muy próxima a su mortalidad. Esto convierte la investigación del cáncer de páncreas en una prioridad para la comunidad científica [3].

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Los tumores periampulares suponen el 5% de los tumores malignos del tracto gastrointestinal. En estudios de autopsia la prevalencia total de los tumores periampulares se ha reportado entre 0.063 y 0.21%. De forma independiente, el ampuloma se ha observado en un 0.2% de las autopsias de rutina (1% de todas las neoplasias malignas

gastrointestinales); y el adenocarcinoma duodenal en menos de 0.05% de las autopsias (0.5% de las malignidades gastrointestinales) [2].

En el siglo XXI, el ADCP continúa siendo un grave problema de salud sin resolver. Debido a su diagnóstico tardío, la agresividad de la enfermedad y la ausencia de un tratamiento efectivo, se estima que la supervivencia del ADCP a los 5 años es menor del 5 % [3,4]. Esto convierte al cáncer de páncreas en una de las formas de cáncer gastrointestinal más agresivas, con una supervivencia media de un año tras el diagnóstico. Su pronóstico infausto es debido a que la mayoría se presentan en estadios avanzados [5]. Por estos motivos será el tipo de tumor periampular en el que más profundizaremos a lo largo de este estudio.

El ADCP es la neoplasia maligna más frecuente del páncreas [6]. En España constituye la tercera neoplasia más frecuente del tubo digestivo tras el cáncer de colon y estómago. Su incidencia en los países occidentales es del 10 por 100.000, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer tras el cáncer de colon, próstata y mama. El 80% de los casos se producen entre los 60 y los 80 años de edad, siendo la edad media al diagnóstico de unos 65 años [6].

La resección quirúrgica continúa siendo el único tratamiento potencialmente curativo. Sin embargo la mayor parte de los pacientes manifiestan la enfermedad diseminada al diagnóstico, lo que supone que hasta el 80% no serán candidatos a una cirugía con intención curativa. La resecabilidad del tumor viene determinada por la ausencia de afectación de las estructuras vasculares vecinas y/o metástasis a distancia. La extensión de la enfermedad está categorizada en resecable, localmente avanzado sin metástasis y metastásica [6]. El 40% de los cánceres son localmente avanzados al diagnóstico, pudiendo en ocasiones beneficiarse de esquemas de tratamiento neoadyuvante que los

convierten en resecables. El agente quimioterápico más activo en el cáncer de páncreas diseminado es la gemcitabina, siendo el primero que ha demostrado una mejoría de los síntomas relacionados con el cáncer de páncreas (reducción del dolor y de la necesidad de analgesia) y de la supervivencia [7].

1.2. FACTORES DE RIESGO

Se han relacionado múltiples factores de riesgo en la patogénesis del ADCP, si bien ésta resulta ser una incógnita para los investigadores. Entre los factores de riesgo más contrastados se encuentran la edad avanzada (>60 años) y el tabaquismo.

1.2.1. Tabaquismo

Aunque algunos estudios relacionan la mayor incidencia de cáncer de páncreas en el varón, en los no fumadores no hay predominio sexual [9]. El tabaquismo parece ser uno de los pocos factores de riesgo conocidos en el cáncer de páncreas y es probablemente el principal responsable de la caída de la incidencia de cáncer de páncreas en el varón en el Reino Unido desde finales de los años 70 hasta la década de los 90 [10]. El efecto nocivo del tabaco se debe principalmente a las aminas aromáticas presentes en el humo. De la misma forma es más frecuente entre los trabajadores de la industria petroquímica, en relación con una mayor exposición a estas sustancias [11]. El tabaquismo explica al menos la tercera parte del cáncer pancreático y supone un 40% de las causas conocidas [12]. De cualquier manera, llama la atención que a pesar de la caída del consumo del tabaco en los hombres en la última década no existe un descenso claro en la mortalidad

en países occidentales. Probablemente se deba al aumento de la obesidad en los EEUU y la Unión Europea [3].

1.2.2. Dieta

Otros factores relacionados con la aparición de cáncer de páncreas son la obesidad y una dieta rica en grasas, pescado, carnes fritas y pobre en frutas y vegetales. Gold et al, en su estudio sobre micronutrientes y el cáncer de páncreas concluyó un aumento del riesgo de cáncer de páncreas asociado a una dieta rica en hidratos de carbono y colesterol junto con un descenso del consumo de fibra y de vitamina C [14].

1.2.3. Lesiones premalignas y pancreatitis crónica

Existen lesiones premalignas como el cistoadenoma mucinoso o reconstrucciones quirúrgicas como la gastrectomía parcial que parecen condicionar una predisposición al cáncer de páncreas. La pancreatitis crónica aumenta el riesgo de padecer cáncer de páncreas con un riesgo acumulado de 4% a los 20 años [15].

1.2.4. Síndrome Hereditarios

El cáncer de páncreas es raro en personas menores de 45 años, excepto en aquellos cánceres de tipo hereditario (5-10% de todos los cánceres de páncreas). La mutación

germinal responsable de esta predisposición no ha sido encontrada en la mayoría de los síndromes con asociación familiar.

La predisposición para padecer un ADCP familiar se ha relacionado con los siguientes síndromes:

1. Tumores de ovario y de mama hereditario, asociados a mutaciones BRCA1 y BRCA 2. Estos pacientes presentan un riesgo entre tres y cuatro veces mayor de desarrollar ADCP [8].
2. Pancreatitis hereditarias con mutaciones en el gen del tripsinógeno catiónico. Presentan un riesgo 54 veces mayor de desarrollar ADCP [8].
3. Síndrome de Peutz- Jeguers. Asociado a un riesgo 100 veces mayor de desarrollar ADCP [8].
4. El síndrome “familiar atypical multiple mole melanoma” también conocido como FAMMM, que se debe a una mutación en el gen CDKN2A (p16) y que se ha relacionado con un riesgo 13-52 veces mayor de desarrollar cáncer de páncreas [8].

1.2.5. Aminas Aromáticas

La larga exposición a los solventes y componentes del petróleo parecen ser un factor de riesgo. Un riesgo aumentado de cáncer de páncreas fue evidenciado en un estudio prospectivo en trabajadores expuestos a Bencidina y beta-naftilamina [11]. Además se ha demostrado que las Nitrosaminas son unos potentes inductores del cáncer de páncreas en el hámster. Una exposición continua a estos productos químicos durante 10 años o más incrementa el riesgo de cáncer de páncreas [13].

1.2.6. Diabetes

Múltiples estudios epidemiológicos han mostrado que cerca del 15% de los pacientes presenta historia de Diabetes Mellitus. El inicio clínico de la diabetes tan solo precede en tres meses al diagnóstico de cáncer en la mitad de los pacientes con diabetes y cáncer de páncreas. Esto puede indicar que el cáncer de páncreas produzca una insuficiencia pancreática endocrina en sus estadios iniciales. La diabetes Mellitus puede establecer una correlación etiológica del cáncer de páncreas avanzado [15].

1.2.7. Lugar de Nacimiento

El lugar de nacimiento también ha sido analizado en el cáncer de páncreas en numerosos estudios. La incidencia muestra similares fluctuaciones a lo largo de distintos países Europeos. Se estima que en Francia existe una incidencia de 6 nuevos casos por 100.000 habitantes y año. En Italia es de 10/100.000 casos y en España de 7/100.000 habitantes [16]. Sin embargo, en Canadá se aprecia variaciones de 11/100.000 habitantes en Ontario hasta 3,7/100.00 habitantes en las regiones del Noroeste. La incidencia del cáncer de páncreas también varía entre las diferentes comunidades y grupos étnicos: la incidencia es de 11,7/100.000 habitantes entre la población latina de Los Ángeles (EEUU) versus 2,0/100.000 habitantes entre la población asiática de la misma ciudad [16].

1.2.8. Genética

La existencia de una mayor incidencia en ciertos grupos étnicos hace pensar en la existencia de un componente genético [17]. Se estima que un 3-5 % de los cánceres de

páncreas son hereditarios y se relacionan con enfermedades como la pancreatitis crónica hereditaria, el Síndrome de Lynch tipo II, la ataxia telangiectasia y el melanoma familiar atípico. A pesar de los avances conseguidos en la actualidad continuamos lejos de conocer la patogénesis del cáncer de páncreas. Se sabe que en la mayoría de los adenocarcinomas de páncreas existen alteraciones genéticas y/o cromosómicas (En el 70% de los casos se hallan mutaciones del oncogén K-ras [71]). Otras alteraciones genéticas que se han descrito son deleciones o mutaciones de los genes supresor p53, APC o DCC, así como las alteraciones cromosómicas entre las que destacan las deleciones del 9p, 17p y 18q [18].

1.3. MORTALIDAD

Los tumores periampulares son un grupo heterogéneo por lo que no existen datos globales de mortalidad. Por este motivo definiremos a continuación la mortalidad de cada una de las neoplasias.

La mortalidad del colangiocarcinoma distal es variable y depende del tamaño, la resecabilidad y los ganglios afectados. La supervivencia en aquellos tumores pequeños con márgenes libres de más de 1 cm y sin ganglios afectados es del 79% a los 5 años [2].

El ampuloma suele ser un tumor de pequeño tamaño con altos índices de resecabilidad y por tanto es posible realizar cirugía radical en más casos y las tasas de supervivencia llegan hasta el 89% a los cinco años. Además son tumores benignos (adenomas) en su mayoría y en caso de ser neoplasias malignas tienen una lenta evolución siendo poco frecuentes las metástasis ganglionares o a distancia. [2]

Los tumores de la 2ª porción duodenal provienen de estirpes celulares variadas. Independientemente del origen celular suelen tener un mal pronóstico siendo la supervivencia a los cinco años del 25% la cual se reduce en casos de adenocarcinomas. [1]

Tanto en EEUU como en la UE, si atendemos los últimos datos ofrecidos por la *World Health Organization Database* y *Eurostat*, el ADCP es la única neoplasia que no muestra una tendencia hacia la mejoría en las tasas de mortalidad en ambos sexos.

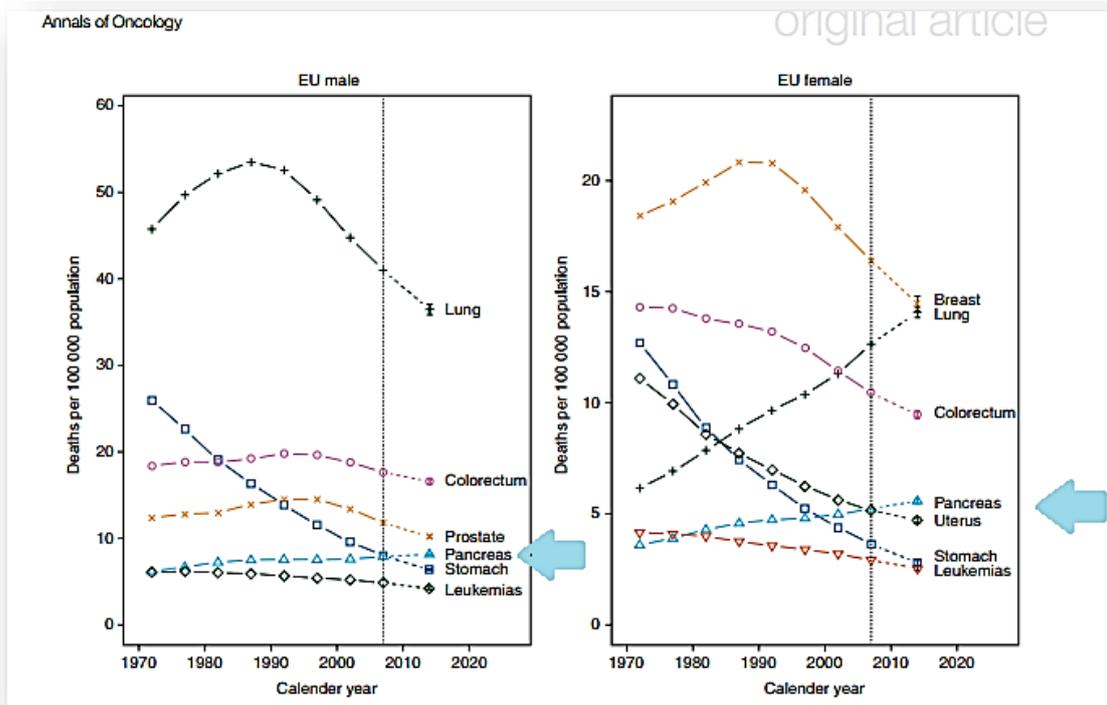


Figura 2. Tendencia de la mortalidad para el cáncer en hombres y mujeres de la UE en quinquenios desde 1970-1975 hasta 2005-2009. Las flechas señalan la tendencia ascendente del cáncer de páncreas (Curva azul con triángulos) [3]

En el 2014 la tasa de mortalidad fue de 8,13/100.000 habitantes para los varones y 5,56/100.000 habitantes en las mujeres. Según la *American Cancer Society* se estima que para el 2017 se diagnosticarán 48960 casos nuevos de ADCP en EEUU y aproximadamente unas 40.560 personas fallecerán como consecuencia del mismo [17].

A pesar de que en los grupos de edad más jóvenes (25-45 años) parece existir una mejor supervivencia en los varones, en el género femenino no ocurre esto [3]. El cáncer de páncreas en las mujeres y a cualquier edad presenta una mayor tendencia hacia el ascenso de la mortalidad desde los años 70, mientras que en los hombres, parece que se ha alcanzado una fase de “plateau” desde finales de la década de los 80. Estos datos reflejan probablemente la tendencia del hábito tabáquico de las últimas generaciones de mujeres y hombres europeos [3]. Por otro lado, a pesar de las mejoras en las pruebas de imagen que permiten diagnosticar la presencia del cáncer de páncreas a lo largo de los

distintos países, la ausencia de síntomas de la enfermedad y de un test de cribado que permita el diagnóstico precoz hace que el tratamiento continúe siendo tardío. Esta situación dificulta la tendencia hacia la mejoría en la curva de supervivencia de estos pacientes.

Incluso en el escenario más favorable la supervivencia media no supera los 6-10 meses [18]. En caso del cáncer de páncreas metastásico la supervivencia es aún menor estimándose en 3-6 meses desde el diagnóstico, aunque el uso de la quimioterapia ha demostrado un beneficio en la supervivencia y en la calidad de vida de estos pacientes en comparación con el tratamiento paliativo [19, 20].

2. HISTOLOGÍA, PATRONES DE DISEMINACIÓN Y MARCADORES TUMORALES

2.1. HISTOLOGÍA DE LOS TUMORES PERIAMPULARES

Los tumores periampulares se pueden dividir en: **tumores benignos** que son poco frecuentes como lipomas, leiomiofibromas, hemangiomas, tumores neurogénicos y adenomas; **tumores neuroendocrinos**, siendo el carcinoide el más frecuente aunque también se observan de células grandes y pequeñas; y por último el **carcinoma ampular** que representa el 10-36% de las neoplasias periampulares resecables.

El colangiocarcinoma distal es un adenocarcinoma de la vía biliar de etiología desconocida [1].

Los tumores de la 2ª porción duodenal también son en su mayoría adenocarcinomas. Existen tres tipos morfológicos: el polipoide, fungoide y anular constrictivo [2].

Las lesiones tumorales pancreáticas se pueden dividir tomando como referencia múltiples características [21, 22, 23, 24, 25]. Los **Tumores quísticos** son raros (3% de los tumores pancreáticos y 10% de los malignos). Los adquiridos que pueden ser benignos como los cistoadenomas (seroso y mucinoso), de malignidad intermedia (Cistoadenoma mucinoso papilar intraductal) y malignos como el cistoadenocarcinoma que es muy infrecuente. Los **tumores sólidos benignos** del páncreas son muy infrecuentes y en este grupo se clasifican el tumorseudopapilar sólido y el adenoma acinar. En el conjunto de los **tumores sólidos malignos** de páncreas debemos destacar dos: el **carcinoma acinar** representa del 1 a 2% de los tumores pancreáticos exocrinos y el **adenocarcinoma ductal**.

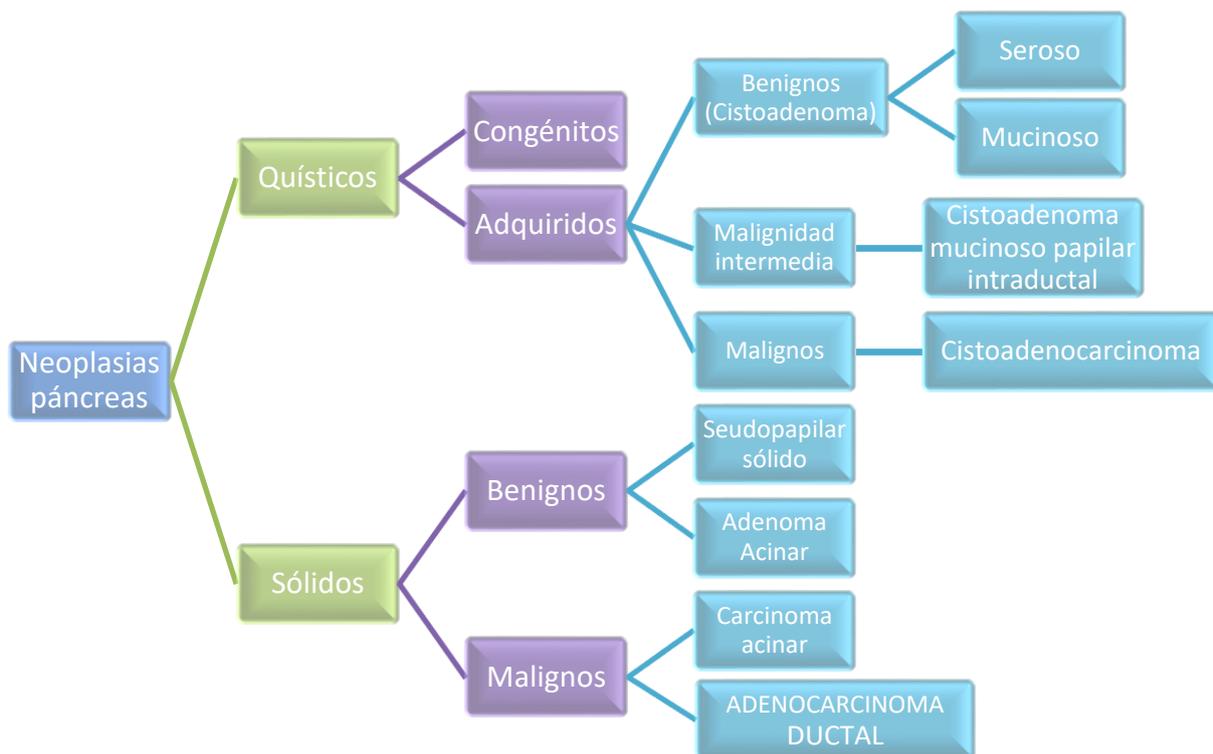


Figura 3. Clasificación histopatológica de las neoplasias de páncreas.

El **Adenocarcinoma ductal** fue descrito en 1760 por Morgagni en sus estudios histológicos. Los criterios diagnósticos que estableció han sido utilizados durante más de 200 años [26]. Es el tumor sólido maligno de páncreas más

frecuente. Este tipo de tumor y sus variantes suponen el 80-90% de las neoplasias pancreáticas y una proporción mayor de las neoplasias malignas. El 70% se desarrolla en la cabeza de páncreas.

A nivel macroscópico suelen ser grandes (tamaño medio de 3 cm), duros, irregulares, arenosos de color gris amarillo y mal delimitados. Una elevada proporción de casos se diagnostican cuando tienen metástasis a distancia (ganglionares y/o hematológicas). Los que aparecen en cuerpo y cola alcanzan diámetros mayores porque son asintomáticos durante más tiempo que los localizados en la cabeza pancreática.

En la microscopía óptica existen dos características fundamentales: la intensa reacción desmoplásica (compuesta de fibras de colágeno, fibroblastos y células inflamatorias) y células neoplásicas muy bien diferenciadas que no se corresponden con la alta letalidad de este tumor.

En el estudio inmunohistoquímica expresan citoqueratinas (7, 8, 18, 19 y de forma variable 20), mucina (MUC1, MUC4 y MUC5A), marcadores oncológicos (CEA, B72.3, CA 125 y CA 19.9) y marcadores específicos de cáncer de páncreas (mesotelina, S100A4, etc.). En cuanto a la secuenciación genética de los tumores, se incluye el oncogén KRAS y tres genes supresores de tumores (TP53, p16/CDKN2A y SMAD4) [41].

Existen variantes tumorales que suelen originarse por la degeneración de las estirpes tumorales comentadas previamente:

- Carcinoma coloidal: Degeneración de neoplasias quísticas mucinosas.

- Carcinoma adenoescamoso: Subtipo de peor pronóstico que el adenocarcinoma ductal.
- Carcinoma de células en anillo de sello: Derivado de los ampulomas.
- Carcinoma anaplásico: Subtipo del adenocarcinoma ductal con presencia de gran cantidad de células indiferenciadas, más infrecuente y de peor pronóstico.
- Carcinoma de células gigantes: La existencia de células con marcadores epiteliales, mesenquimales o mixtos (expresión de Vimentina y EMA), hacen pensar que es un tumor de origen epitelial con diferenciación mesenquimal.
- Carcinoma sarcomatoideo: Carcinoma anaplásico que simula un sarcoma a nivel histológico.

La historia natural de los ADCP comienza con un epitelio ductal sano que sufre una displasia para transformarse en una Neoplasia Intraductal de Páncreas (PanNI). A su vez, ésta se desarrolla en tres etapas: displasia leve (PanNI-1), moderada (PanNI-2) y severa (PanNI-3). Histológicamente son pequeñas (<0.5cm),

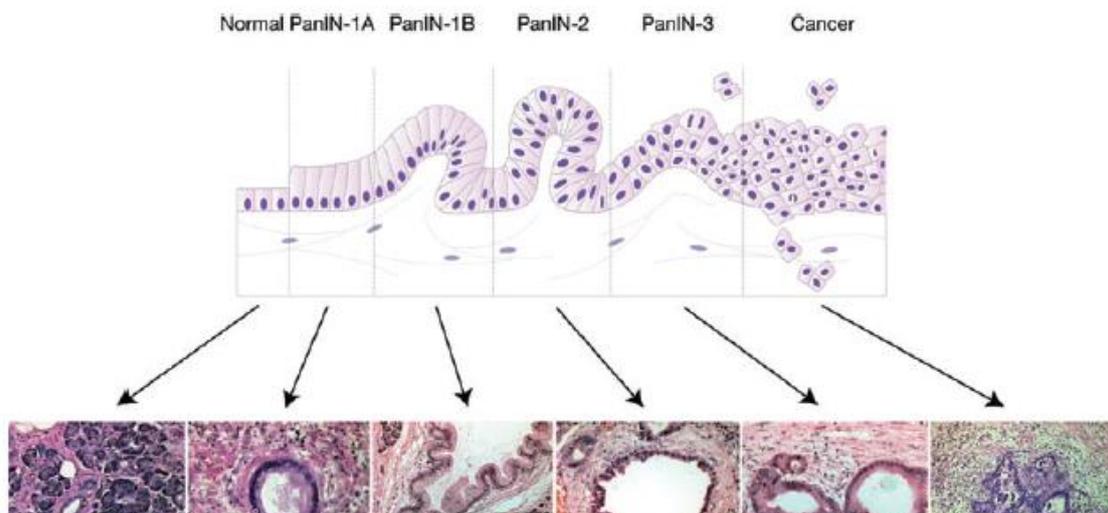


Figura 4. Desarrollo evolutivo histopatológico del adenocarcinoma de páncreas [74]

papilares y que crecen dentro de los ductos pancreáticos. En cada una de estas etapas se activan una serie de oncogenes y factores de crecimiento que desarrollaremos con más detalle en el punto 3 de esta introducción. Solo un 1% de los PanNI desarrollarán un cáncer invasivo [27].

En el proceso patogénico se desarrolla una fibrosis y reacción desmoplásica intensa del estroma. La "desmoplasia tumoral" se forma por un incremento en el tejido conectivo que infiltra y envuelve el tumor. Las células estrelladas pancreáticas que participan en la desmoplasia tumoral se caracterizan por expresar alfa-SMA (actina de músculo liso) y por la síntesis de procolágeno alfa-1T que son los principales componentes de la matriz extracelular que constituyen la reacción desmoplásica.

Las células estromales de estos tumores evidencian un aspecto morfológico dendrítico, expresan citofilamentos y una capacidad de síntesis de sustancias de matriz extracelular idénticos a los hallados en casos de pancreatitis crónica inducida por alcohol, lo cual sugiere unos mecanismos similares subyacentes al desarrollo de la fibrosis en la pancreatitis crónica y de la desmoplasia en el adenocarcinoma pancreático. Existe además evidencia creciente de la relación que existe entre las células estrelladas pancreáticas y las células tumorales; por mecanismos conocidos parcialmente las células estrelladas pueden estimular el crecimiento tumoral, además pueden promover la invasión tumoral y posiblemente la angiogénesis. [27] Esta zona de pancreatitis crónica que rodea el tumor se debe teóricamente a la obstrucción de esos conductos adyacentes por las células tumorales [21, 22, 23, 24, 25].

2.2. PATRONES DE DISEMINACIÓN

Los tumores periampulares presentan patrones de diseminación similares a los adenocarcinomas de otras localizaciones aunque existen algunas características propias como la invasión perineural del ADCP o la malignidad localizada de los ampulomas que tardan mucho tiempo en afectar a estructuras distantes y rara vez dan metástasis.

- **Invasión local:** Es la primera fase de la diseminación del tumor. Depende de la localización del mismo, ya que se van a ver afectadas las estructuras anatómicas adyacentes. Los que afectan a la cabeza del páncreas pueden infiltrar el antro gástrico y el duodeno produciendo obstrucciones altas del tránsito o hematemesis. Los de cuerpo y cola de páncreas afectan al cuerpo gástrico, bazo, primer asa yeyunal, hígado y peritoneo principalmente.
- **Diseminación linfática:** Es la que realiza el tumor a través de los conductos y ganglios linfáticos locorreionales que drenan la zona periampular donde se localiza. Esta diseminación afecta al pronóstico. Si las lesiones son cercanas al páncreas (primera estación, adenopatías del hilio hepático e incluso del tronco celíaco) el tumor se considerará resecable, pero con una afectación negativa en la supervivencia del paciente. Si las adenopatías afectas se encuentran lejos del tumor, como los ganglios inter-aorto-cavos se considerará igual que si tuviese metástasis hepáticas. Sin embargo, la afectación linfática no contraindica “per se” la resección del tumor.

- **Diseminación perineural:** Este tipo de diseminación es característica del adenocarcinoma de páncreas. Los estudios muestran una incidencia del 51-100% y se encuentra presente en los estadios incipientes y es posible que se disemine a través de la longitud del nervio. En algunos casos es causa de dolor intratable y de recidiva tumoral por lo que se considera un factor pronóstico independiente. El mecanismo molecular se desconoce y no se han creado dianas terapéuticas para este tipo de diseminación [28]. Los mecanismos moleculares no están bien definidos aunque el factor derivado del estroma $1\alpha/CXCL12/CXCR4$ está relacionado con un mayor neurotrofismo de las células tumorales en los nervios periféricos [29].
- **Diseminación hemática:** Consiste en la liberación de células tumorales al torrente sanguíneo y su crecimiento a distancia del tumor primario. La glicosilación alterada es una de las características del adenocarcinoma ductal de páncreas. La expresión del antígeno sializado de Lewis (SLe) se encuentra incrementada en la superficie de glicoproteínas o glico-esfingolípidos de las células del ADCP y la expresión de estos ligandos presenta una correlación negativa con la supervivencia del paciente. Estos antígenos glucídicos, ligandos de interacción específicos para la molécula de adhesión E-Selectina, se encuentran involucrados en la extravasación de las células tumorales [30]. Los órganos que más frecuentemente se afectan por este tipo de lesiones son:
 - **Hígado:** Sobre todo en tumores de cuerpo y cola.

- **Plexo celiaco:** Son un conjunto de nervios que se encuentran a nivel del tronco celiaco. Son causa de dolor de espalda severo en estos pacientes.
- **Vena porta y vasos mesentéricos superiores:** La arteria y la vena mesentérica superior cruzan en contacto con el páncreas a nivel del proceso uncinado. Una vez que la vena mesentérica superior y la vena esplénica confluyen para formar el tronco común portal, éste discurre dorsal a la cabeza pancreática. Una obstrucción de estas estructuras vasculares produciría defectos de perfusión o retorno venoso intestinal y/o hepático.
- **Ligamento de Treitz:** Es el ligamento que fija la primera asa de yeyuno. La afectación de este ligamento puede producir una obstrucción intestinal.

2.3. MARCADORES CELULARES

No hay marcadores celulares específicos para valorar la evolución de los tumores periampulares. Los marcadores como el CA 19-9 sérico tienen una especificidad baja porque también lo producen otros tumores como el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de vesícula biliar. Niveles altos de CA 19-9 también pueden ser causados por otras afecciones no cancerosas como cálculos biliares, pancreatitis, fibrosis quística y enfermedades hepáticas. Durante la radioterapia, los niveles de CA 19-9 se pueden elevar debido a que las células cancerosas al ser destruidas lo liberan al torrente sanguíneo.

La mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas tienen un CA 19-9 elevado en el momento del diagnóstico. Después del tratamiento definitivo o durante este, el aumento de las concentraciones de CA 19-9 puede identificar a los pacientes con crecimiento tumoral evolutivo. Sin embargo, la presencia de CA 19-9 normal no descarta la recidiva y no se puede considerar un índice de respuesta al tratamiento neoadyuvante [31].

La *Secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC) también llamada osteonectina o BM-40 es una proteína de la matriz celular de grandes invertebrados y vertebrados que participa en procesos biológicos como remodelación ósea, fibrinogénesis, cicatrización, migración, proliferación, angiogénesis, etc. La delección del gen que codifica SPARC supone un aumento en el crecimiento tumoral en ratones. [32] En condiciones normales, cuando el gen que codifica SPARC funciona adecuadamente, la proteína que codifica tiene las siguientes funciones:

- **Induce apoptosis:** Activando la vía extrínseca.
- **Inhibe la invasión celular:** Disminuye MMP-2, MMP-9 y aumenta las integrinas.
- **Inhibe la proliferación:** Inhibe FAK, Src, Akt y MAPK.
- **Inhibe la angiogénesis:** Se une y bloquea el PDGF, VEGF, y Factor fibroblástico básico.

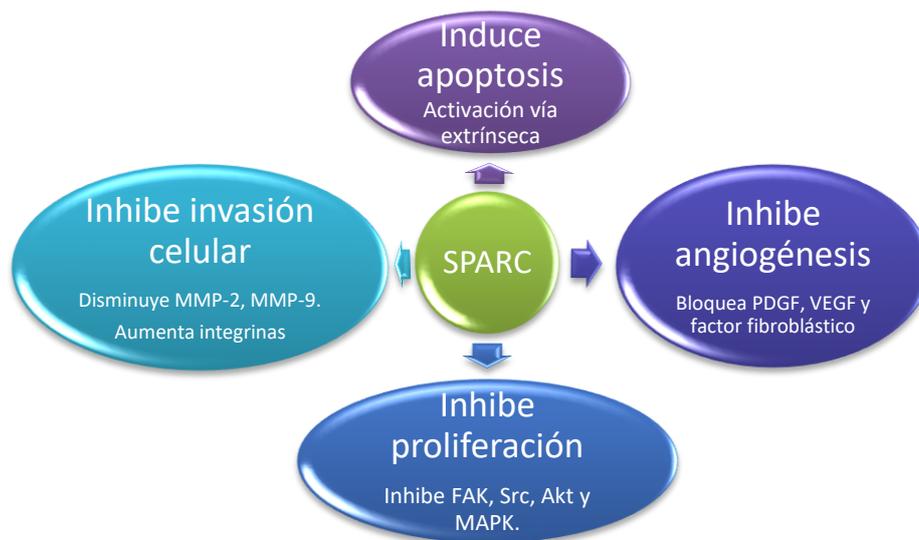


Figura 5. Dianas potenciales de la actividad de la SPARC [71]

Los tumores pancreáticos en ratones SPARC (-/-) desarrollan un crecimiento más rápido y metástasis precoces. Algunas investigaciones sugieren que SPARC actúa como agente quimiosensibilizador induciendo la regresión tumoral en ratones. El efecto oncogénico de SPARC depende del tipo celular y el ambiente extracelular de las células tumorales. [33]

Existen otros marcadores tumorales menos frecuentes pero que se pueden encontrar elevados como: CA15.3, CA27.29, CA125 y el Antígeno carcinoembrionario (CEA).

Hay marcadores tumorales que se encuentran en la pieza tumoral, como el **“Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico” (EGFR)**. Se trata de una proteína conocida también como *HER1*, que ejerce como receptor localizado en la célula y favorece su crecimiento. Las pruebas realizadas en una muestra de tejido tumoral pueden cuantificar la cantidad de este receptor. En el caso de estar aumentada, indica que el cáncer sea probablemente de rápido crecimiento y

propagación y por tanto, más difícil de tratar. Los pacientes con un nivel elevado de EGFR puede que tengan resultados menos favorables y requieran de un tratamiento más agresivo, especialmente con medicamentos que bloqueen (o inhiban) los receptores de EGFR. [34]

3. **BIOLOGÍA MOLECULAR: GENES, ONCOGENES, FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES**

Una gran proporción de los tumores del tracto digestivo se originan por la acumulación de mutaciones en la célula que pueden ser adquiridas o heredadas. Los mecanismos oncogénicos se dividen en tres grupos:

- Activación de oncogenes.
- Inhibición de genes supresores (Su función es restringir la proliferación celular descontrolada)
- Interacción con genes.

Tabla 2 Frecuencias de los genes mutados en el ADCP.

Genes	Localización	Frecuencia %
K-ras	Cr. 12p	95
P16/CDKN2A	Cr. 9p	90
P53/TP53	Cr. 17p	50-75
DPC4/SMAD4	Cr. 18q	55
AKT2	Cr. 19p	10-20
MYB	Cr. 6q	10
BRCA2	Cr. 13q	7-10
MKK4	Cr. 17p	4

Esta serie de cambios son acompañados de un proceso conocido como inestabilidad cromosómica global, el cual persiste a lo largo de la vida del tumor. El descubrimiento de todos estos mecanismos ha aumentado el conocimiento de la naturaleza fundamental del cáncer de páncreas, con implicaciones en la precoz detección y tratamiento, pero su extrapolación a la clínica todavía no es un hecho [35, 36].

La revolución tecnológica en la investigación sobre el genoma humano nos ha permitido comprender el adenocarcinoma pancreático a través de tres importantes vías [35]:

- Identificación de más de 100 genes expresados en el carcinoma pancreático pero no en el tejido normal, lo cual ha permitido el desarrollo de pruebas diagnósticas específicas y nuevas terapias.
- Identificación de genes relacionados con los acontecimientos clínico-patológicos los cual nos permite comprender la biología del ADCP.
- La expresión genética ha desenmascarado procesos relacionados con la invasión tisular.

3.1. ONCOGENES

- **K-ras:** (95%-100%) Afecta a la GTP-asa resultando una proteína activa en la señal de transducción. Son los primeros cambios genéticos detectados en las series de progresión tumoral [28]. La mayoría de las mutaciones tienen lugar en el codón 12 sustituyendo la glicina por aspartato o valina. El K-ras *wild type* se encuentra en la variante medular del carcinoma ductal [28]. Tanto la mutación del k-ras como la sobreexpresión del HER2/Neu son marcadores tempranos de progresión del carcinoma ductal relacionados con la señal autocrina, siendo éstos ligandos del factor de crecimiento de epidérmico (EGF) y del factor de transformación del crecimiento (TGF- α). Es esta señal autocrina en bucle la que promueve el desarrollo tumoral [37, 38].

- **α -Catenina:** La mutación en genes de células presentadoras de antígenos (APC) produce la degradación de la α -catenina que a su vez inhibe del TCF-4 (regulador de la transcripción). La ausencia en la inhibición de dicho factor se expresa como tumores pseudopailares de páncreas.
- **AKT2 y MYB:** 10-20% de los cánceres de páncreas presenta la activación de estos oncogenes.

3.2. GENES SUPRESORES

- **p53:** Se localiza en el Cr. 17 p. La mutación que produce su inactivación ocurre en fases avanzadas del proceso de tumorigénesis. Tiene la misión fundamental de regular el ciclo celular y la apoptosis. La pérdida del p53 lleva a una inestabilidad genética que caracteriza al cáncer de páncreas invasivo [37-38]. Donehower y cols. [39] encontraron en estudios experimentales que la inactivación aislada del gen p53 no producía cáncer de páncreas en el ratón, sin embargo cuando se asociaba a la activación del gen k-ras se producía tumor y mayor incidencia de metástasis.
- **p16/CDKN2A:** Localizado en el Cr. 9p es inactivado en un 80-95% de los cánceres de páncreas pudiendo ser detectada en las fases iniciales. Aumenta en 13 veces el riesgo de cáncer de páncreas. Histológicamente su disfunción se asocia a una atipia más severa tanto citológicamente como estructuralmente. Este gen codifica dos genes supresores INK4 y ARF que intervienen de forma crucial en la correcta transcripción del ADN (controla el daño al ADN en situaciones de estrés ambiental y proliferaciones

anómalas) siendo por tanto un gen supresor tumoral. La ausencia de éste o su mutación conducen a una proliferación incontrolada, y además se ha relacionado con la quimiorresistencia [36, 37, 38]

- **SMAD4/DPC4 y TGF- β** : Su inactivación se produce en un 55% de los cánceres de páncreas en fases tardías de la tumorigénesis [36, 37]. Es un gen supresor que puede tener utilidad diagnóstica. La proteína DPC4 es un factor de transcripción importante implicado en la patogenia de la señal del TGF- β (factor de transformación del crecimiento - β). La detección inmunohistoquímica de la proteína DPC 4 es un marcador muy sensible y específico de alteraciones genéticas en dicha proteína. No se expresa en lesiones pancreáticas benignas lo cual podría auxiliar al diagnóstico de lesiones precursoras de alto grado o en el cáncer invasivo. Se ha observado que la pérdida de expresión de la proteína DPC 4 conlleva una supervivencia más corta [36, 37, 40].
- **MKK4**: En el Cr. 17p. Se ha demostrado su implicación en el cáncer de mama y en el de páncreas (4%).
- **STK 11/LKB1**: Su mutación es el origen del Sd. de Peutz-Jeghers que cursa con pólipos gastrointestinales y máculas melanocíticas. Estos pacientes presentan un alto riesgo de desarrollar ADCP [36, 37].

3.3. GENES MANTENEDORES DEL GENOMA

- **ATM, ATR, BCRA1:** Cuando se produce una alteración de éstos genes no se reparan los fallos en la replicación del ADN. Este ADN dañado y mutante puede llevar al desarrollo de un cáncer de páncreas (tumores con error de replicación positivos – RER +), lo cual conduce a un fenotipo molecular denominado inestabilidad de microsatélites (3% de los cáncer de páncreas) exhibiendo un fenotipo histológico tipo medular y pobremente diferenciado [35].
- **BCRA2:** Es inactivado en un 17% de los cánceres de páncreas (mutación hereditaria) lo cual es un acontecimiento tardío, siendo necesarias mutaciones previas como k-ras y p53 que son las que provocan el fallo en la respuesta al daño del ADN. Por tanto, La mutación del BRCA2 promueve la progresión del cáncer desde las lesiones iniciales hasta el tumor desarrollado [36, 37].

3.4. OTROS GENES FAVORECEDORES DE TUMOROGÉNESIS

Todos los genes que codifican proteínas involucradas en la adhesión intercelular y entre las células y la matriz extracelular tienen una importante función reguladora en la producción del cáncer de páncreas. La expresión de estos genes podría indicar puntos clave en la supervivencia del cáncer, por lo que utilizarlos como dianas terapéuticas podría llevar a la muerte de células cancerígenas [26, 28].

Algunos genes traducen proteínas que contribuyen a la quimiorresistencia en cáncer de páncreas. Algunos ejemplos son:

- Proteína asociada al grupo D de ataxia-teleangiectasia (ATDC): Supresora de la radiosensibilidad en fibroblastos en la ataxia –teleangiectasia.
- Topoisomerasa II alpha (TOP2A): Se relaciona con quimiorresistencia
- Transglutaminasa II (TGM2).

Poder actuar sobre estos genes permitiría el desarrollo de nuevas terapias que aumentarían el efecto de la radiación y la quimioterapia [35].

3.5. FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES

El crecimiento de células tumorales en el páncreas está mediado por una sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento y sus ligandos. Estos ejercen su acción a través de mecanismos autocrinos y paracrinos anómalos. Esta producción en exceso no es suficiente para el desarrollo del tumor y precisa que existan anomalías genéticas que inicien el proceso.

- **Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR):** Presenta actividad tirosín-quinasa tipo 1 y se expresa normalmente en la superficie de las células ductales. Uno de sus ligandos, el Factor de Crecimiento Epidérmico o EGF, se expresa en cantidades muy pequeñas en el páncreas normal. Sin embargo en las células tumorales se expresan grandes cantidades de este receptor y del EGF en el estroma tumoral por lo que se

produce una retroalimentación positiva a favor del crecimiento tumoral [34, 41].

- **Factor de crecimiento hepatocitario (HGF):** Es un ligando cuyo receptor MET está codificado por el oncogen MET y localizado en la superficie de las células epiteliales [35]. En el cáncer de páncreas, aumenta su concentración unas 10 veces, procedente de las células estromales o de los islotes, pero no de las células malignas. La sobreexpresión de receptor MET y HGF en las células ductales hiperplásicas, displásicas y malignas, sugiere que se trata de un mecanismo molecular precoz en el desarrollo tumoral [43].
- **Factor transformador del crecimiento- β (TGF- β):** Inhibidor del crecimiento en casi todas las células epiteliales. En el cáncer de páncreas se encuentran incrementadas las tres isoformas de este factor, especialmente el TGF- β_1 . La isoforma TGF- β_2 se relaciona con un estadio tumoral avanzado. Las células cancerosas presentan una falta de respuesta a las acciones inhibitorias de las isoformas del TGF- β [37,38,46].
- **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF):** Es el mediador de la angiogénesis mejor conocido y se asocia con mal pronóstico en el cáncer de páncreas. Se expresa tanto en células endoteliales como en células tumorales [42].
- **Metaloproteinasa 2 (MMP-2):** Factor que favorece la invasión neoplásica y esta aumentado en el estroma tumoral. El nivel de expresión se correlaciona con un aumento de la reacción desmoplásica en el seno tumoral y su invasividad. Esta se puede ver incrementada por la

inflamación como ocurre en la pancreatitis crónica donde se produce una elevación del NF- κ B, el cual aumenta la MMP-2, por lo que la inflamación puede promover la tumorigénesis [44].

- **Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF):** Las isoformas FGF₁ y FGF₂ están estrechamente relacionadas y se expresan en el páncreas tumoral [45].

3.6. CÁNCER DE PÁNCREAS FAMILIAR

Se han descrito casos de agregación familiar de cáncer de páncreas. En algunos casos se asocia a síndromes clínicos conocidos y otros no están asociados a estos síndromes pero existe alguna mutación genética hereditaria que los justifica. En familias donde el cáncer de páncreas tiene una alta penetración se han detectado algunas mutaciones especiales: por ejemplo existe un síndrome de cáncer pancreático familiar que ha sido asociado a mutaciones del cromosoma 4q y se asocia a diabetes, insuficiencia pancreática exocrina y adenocarcinoma pancreático, con una penetración del 100% [42].

Existen 7 síndromes clínicos hereditarios que han sido asociados con el incremento del riesgo del carcinoma ductal pancreático:

- **Pancreatitis hereditaria:** Se asocia con mutaciones en el PRSS 1. Incidencia incrementada 53 veces para adenocarcinoma pancreático. La inflamación promueve la tumorigénesis, en parte por aumento de los

factores de crecimiento, citoquinas y productos del estrés oxidativo [42].

- Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.
- Cáncer mama familiar.
- Síndrome de melanoma múltiple familiar atípico.
- Síndrome de Peutz-Jeghers.
- Fibrosis quística.

Aunque la mayoría de los cánceres de páncreas ocurren de forma esporádica, una minoría han demostrado agregación familiar. En familias afectas por cáncer de páncreas no asociado a síndromes clínicos se ha calculado un incremento del riesgo relativo del 16% si hay dos familiares afectos de primer grado, y un 33% si son 3 familiares [36].

La profundización en el análisis de la biología del cáncer, así como del desarrollo de modelos de experimentación animal son recomendados si se quiere tener éxito en el tratamiento del cáncer de páncreas [42].

4. IMPORTANCIA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

Dado el mal pronóstico de la mayoría de los tumores incluidos en el grupo de neoplasias periampulares y sobre todo del ADCP, resulta fundamental la búsqueda de biomarcadores para su detección precoz y que permitan el desarrollo urgente de nuevas estrategias terapéuticas. Para ello, los modelos animales han demostrado ser muy útiles en la evolución de dichos avances, por ejemplo contribuyendo al estudio de nuevos quimioterápicos o combinaciones de los mismos que posteriormente han sido trasladados a ensayos clínicos con humanos que han demostrado un aumento en la supervivencia [19].

Los modelos animales nos permiten estudiar la evolución de estos tumores, los cambios genéticos y las alteraciones de los marcadores tumorales que se producen durante el desarrollo tumoral. La búsqueda de dianas terapéuticas en la biología molecular del tumor también se apoya en el uso de modelos animales.

La definición y el uso de modelos animales en investigación es una temática de difícil abordaje, tanto en lo semántico como en lo ético. Podemos convenir que el término *modelo experimental animal* conlleva la detección de una especie o grupo animal que permita abordar la resolución de un problema científico biomédico particular.

Esta postura implica la búsqueda de un ejemplar que admita estudiar de la manera más aproximada, si no total, la condición, proceso o evento que interesa investigar y las modificaciones que se producen por el suceso en estudio.

La búsqueda de una definición abarcadora de *Modelo experimental animal* tiene sus limitaciones y es un sendero abierto, sobre todo teniendo en cuenta una definición de un experto en el tema: “El mejor modelo de un gato es un gato, y preferiblemente el mismo gato” [47]. Hay que tener en cuenta que los modelos experimentales animales,

aunque intentan parecerse lo más posible al sujeto final del estudio son diferentes, y por tanto, al extrapolar los datos debemos ser cautos y realizar ensayos clínicos en humanos que confirmen estos hallazgos.

Dado que cada especie animal tiene su dotación genética (que es precisamente la que hace que un individuo pertenezca a una especie determinada y no a otra), podría parecer contradictorio intentar reproducir en un animal de experimentación una enfermedad provocada por las alteraciones de los genes de un ser humano. Sin embargo, aunque nuestros cromosomas sean distintos a los de los animales, tenemos infinidad de genes idénticos, muchos de los cuales realizan funciones bioquímicas similares a las que realizan en la especie humana. Pueden estar situados y repartidos por el conjunto de cromosomas de una manera completamente diferente. Y, por supuesto, la función conjunta que desarrollan es diferente en cada especie: por eso el gato es gato y no es perro, y la mosca es mosca y no es un ratón. Es muy frecuente, en la investigación con animales, intentar trabajar con especies de reproducción rápida, cuyos individuos sean bien manejables, y cuyas variables genéticas y ambientales puedan ser estrictamente controlables. En este sentido el ratón es un animal ideal.

Recordemos que, para la medicina experimental, el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como la mosca *Drosophila*, el nematode *Caenorhabditis elegans* e inclusive la rata. Estas ventajas son:

- Al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre, aunque no hay que perder de vista que no se trata de un humano en miniatura.
- Tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los animalarios (biotérios), lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.

- Comparte con el hombre el privilegio de ser una de las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético.
- Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénitas, además de cientos de mutaciones y un gran número de variantes cromosómicas disponibles.
- Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales (células ES), lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones KO constitutivos y condicionales).
- Finalmente, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en una inmensa cantidad de documentación sobre los fenotipos mutantes, las características de las líneas, los mapas genéticos y la secuencia completa del genoma.

El desarrollo de los quimioterápicos y otras moléculas antitumorales se encuentra íntimamente relacionado con los modelos experimentales. Multitud de quimioterápicos han sido probados utilizando estos modelos. Sin embargo fármacos que funcionan bien en el ratón no son necesariamente efectivos en el ser humano. Durante los últimos 30 años, los xenoinjertos subcutáneos derivados de líneas celulares han sido ampliamente utilizados [48].

Desde los años 70, se han utilizado muestras de cánceres humanos tomados mediante biopsia o mediante cirugía que posteriormente han sido implantados

directamente en ratones. Estos xenoinjertos, también conocidos como “*tumorgraft*” mantienen la morfología tumoral inicial así como las mutaciones genéticas que le acompañan. Sin embargo, estos modelos fueron inicialmente desechados debido a su alto índice de rechazos. Recientemente, se ha retomado esta línea de investigación gracias al desarrollo de nuevas cepas de ratones inmunodeprimidos modificadas genéticamente que han minimizado las tasas rechazo.

De esta manera, ha sido posible que este modelo sea competitivo a la hora de analizar la eficacia de las distintas drogas para el estudio del ADCP.

Debemos destacar, que es fundamental el adecuado manejo de estos animales en el laboratorio por lo que actualmente existe un importante control por parte de la legislación en materia de experimentación animal que exige que un comité de ética de experimentación animal otorgue el visto bueno para poder realizar el estudio teniendo en cuenta el mínimo sufrimiento para el animal utilizado y que las condiciones de vida y sacrificio sean óptimas y llevadas a cabo por personal acreditado.

5. MODELOS ANIMALES

Los modelos experimentales animales existentes en la actualidad son:

- Tumores inducidos con sustancias carcinógenas.
- Tumores inducidos mediante ingeniería genética.
- Injerto tumoral.
 - *Aloinjertos*
 - Dependiendo del lugar de implante: Ortotópico/Heterotópicos
 - Dependiendo del origen de la células implantadas:
 - Inyección de células cancerígenas murinas.
 - Implante de tumores murinos
 - *Xenoinjertos*
 - Dependiendo del lugar de implante: Ortotópico/Heterotópicos
 - Dependiendo del origen de la células implantadas:
 - Inyección de células cultivadas “in vitro”
 - Implante de tumores humanos o “*tumorgrafi*”

5.1. **TUMORES INDUCIDOS CON SUSTANCIAS CARCINÓGENAS**

Múltiples sustancias cancerígenas han sido estudiadas, comprobándose que inducían desde lesiones focales proliferativas y cambios degenerativos hasta carcinomas en el páncreas de distintas especies animales. La mayoría de estas sustancias son también mutagénicas. Suelen alcanzar el páncreas a través del torrente sanguíneo tras absorción digestiva. Estos agentes químicos pueden iniciar la aparición

de lesiones preneoplásicas como la metaplasia ductal o acinar. Sin embargo, es necesaria una mutación genética para la progresión celular desde un estado preneoplásico hasta el desarrollo de un fenotipo tumoral maligno. Parece que ciertas especies de animales presentan más tendencia a desarrollar estas lesiones malignas en comparación con otras. Por ejemplo, el desarrollo de carcinoma de células acinares es más probable en ratas tras el empleo de sustancias químicas carcinogénicas. Por el contrario, los hámster tienden a desarrollar tumores ductales tras la administración de las mismas sustancias y el desarrollo de carcinomas acinares es extremadamente raro en estas especies.

Pocas sustancias carcinogénicas han sido estudiadas en el ratón, pero se ha comprobado que con las mismas utilizadas en las ratas y hamster se producía el desarrollo tanto de carcinomas acinares como ductales [49, 50].

El modelo más extendido y estudiado es el Hamster Sirio Dorado con inyección intraperitoneal con N-nitrosobis-(2-oxoprolol)-amina (BOP). [51, 52, 53].

Desde el año 2010 este modelo ha sido utilizado por el grupo de Padillo-Ruiz et al [54, 55, 56] para estudiar de forma experimental la utilización de posibles sustancias adyuvantes en el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas (inducido por BOP) con algunas sustancias como Capecitabina, Celecoxib y Melatonina, encontrándose en esta última una mejoría en la supervivencia de los hámster tratados.

Estudios más recientes emplean la azaserina en ratas [57, 58] y el 7,12-dimetilbenzaraceno en ratones [59]. Algunos de estos modelos parecen asemejarse a la histología del ADCP humano.

Sin embargo el perfil genético del ADCP inducido por estas sustancias en el ratón no se encuentra bien definido, limitando la aplicación de estos modelos en estudios

que abarquen la genética molecular y el estudio de las vías de señalización tumoral. Además, los carcinógenos producen a menudo efectos colaterales en otros tejidos, lo que reduce su valor como modelo animal en los estudios preclínicos. Por esta razón nuestro grupo de investigación (Padillo et al.) se ha inclinado en los últimos tiempos hacia el empleo de xenoinjertos procedentes del humano.

En cualquier caso, la tumorigénesis inducida químicamente puede simular el proceso de la carcinogénesis espontánea en humanos iniciando el daño celular y culminando con la producción de mutaciones genéticas que permitan el desarrollo tumoral. De esta forma este modelo experimental puede ser una herramienta valiosa para evaluar el impacto de los factores de riesgo ambientales incluyendo la dieta y sustancias químicas en la tumorigénesis del ADCP [60]

5.2. RATONES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS: GEM

Recientemente, varios modelos de ratones genéticamente modificados (GEM) han sido validados para el estudio de la tumorigénesis del ADCP en humanos [19, 61, 62].

Los tumores pancreáticos invasores de estos modelos experimentales con ratones pueden ser una buena fuente para la generación de modelos experimentales de ADCP ortotópico en un ratón inmunocompetente. Ofrecen varias ventajas sobre la línea celular establecida a base de modelos de xenoinjertos [63].

Los modelos GEM son establecidos por la introducción de sustituciones de aminoácidos en oncogenes, lo que se traduce en la producción de tumores sólidos específicos. Las mutaciones en KRAS, P53, p16, o SMAD4 producen un espectro

desde lesiones premalignas pancreáticas hasta adenocarcinomas totalmente invasivos [64, 65, 66, 72].

En el estudio de Yamaguchi et al, se empleó una oncoproteína viral conocida como SV40 (tsTAg) para determinar si dicha oncoproteína promovía la carcinogénesis del conducto pancreático iniciado por KRAS. De esta forma generaron ratones que expresaban tsTAg en las células epiteliales pancreáticas. Los ratones con expresión tsTAg-páncreas específica desarrollaron displasia acinar en 22 semanas sin neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN). Mientras que los ratones que presentaban ambas mutaciones tsTAg y KRAS desarrollaban adenocarcinomas ductales infiltrantes y morían en un periodo de 3 semanas [66]

Estos modelos son útiles para el estudio de la progresión de la enfermedad, así como la relación del desarrollo de tumores de páncreas dentro de su microambiente. Sin embargo, una desventaja importante de los modelos GEM, es que los tumores producidos en estos modelos son de origen murino; y es difícil determinar cómo se asemejan estos tumores a los de origen humano. Tampoco se conoce si estos modelos reflejan la heterogeneidad celular de los tumores primarios de páncreas, así como la heterogeneidad del estroma asociado al tumor pancreático visto en humanos. Además, los tumores GEM resultan de una mutación específica introducida en el genoma del ratón, a diferencia de los tumores humanos que son el resultado de múltiples alteraciones genéticas [66].

5.3. INJERTOS TUMORALES

5.3.1. Aloinjertos

Dependiendo del origen animal de las células implantadas se obtendrán xenotrasplantes o alotrasplantes. El primer caso se define como el trasplante de órganos, tejidos o células de una especie a otra. A diferencia de los primeros, encontramos los modelos alotrasplantados en los que se le introducen células tumorales de origen murino. Uno de los principales problemas de los xenoinjertos es la activación de la respuesta inmune contra los tejidos implantados, desencadenando una reacción inflamatoria conocida como rechazo. Por ello hasta la llegada en los años 80-90 de los animales genéticamente modificados o mutados, que por lo general son organismos inmunodeprimidos para evitar el rechazo del tumor, el alotrasplante ha sido fundamental en el estudio del cáncer.

Aunque los resultados obtenidos no son extrapolables directamente al humano permite la posibilidad de llevar a cabo todo tipo de estudios básicos y ensayos terapéuticos in vivo, ya que al tratarse de un mamífero y salvando las diferencias lógicas, gran parte de los procesos bioquímicos y fisiológicos son muy similares.

5.3.2. Xenoinjertos

Se entiende como xenoinjerto al implante de líneas celulares o muestras humanas implantadas en un ratón para el estudio del cáncer. Dependiendo de la localización del tumor o de las células tumorales los xenoinjertos en modelos experimentales

animales son mayoritariamente clasificados en dos tipos: heterotópicos u ortotópicos. Ambos modelos son comúnmente usados en el campo de la investigación.

5.3.3. Según lugar del implante

5.3.3.1. Xenoinjertos Heterotópicos

Hablamos de xenoinjerto heterotópico, cuando se inoculan o trasplantan células, un tejido o un órgano en un organismo receptor en una posición anatómica que no le corresponde.

En el caso de los xenoinjertos de los modelos experimentales, uno de los lugares heterotópicos más empleados es el implante subcutáneo

Los modelos experimentales con xenoinjerto subcutáneo son rápidos, con un coste bajo, técnicamente sencillos, fácilmente reproducibles y de fácil manejo. Es una de las mejoras formas para expandir especímenes de tumores humanos, lo que permite convertir especímenes de tumores humanos en líneas celulares o facilitar estudios sobre angiogénesis. [48]



Figura 6. Xenoinjerto subcutáneo de ADCP en ratón inmunodeprimido.

Existe muy poca bibliografía que describa el uso de modelos animales para el estudio de tumores periampulares. Los modelos tumorales subcutáneos utilizados para estudiar distintos regímenes terapéuticos han dado buenos resultados inicialmente pero han fracasado a la hora de extrapolar la información al humano. El uso de un modelo animal en el que se trasplante tumor humano todavía no ha sido descrito. Los estudios preclínicos con drogas se inclinan hacia el empleo de la ingeniería genética o el uso de modelos experimentales con injerto ortotópico. [48, 67]

5.3.3.2. Xenoinjertos Ortotópicos

En los modelos con xenoinjertos ortotópicos, los tumores o las células tumorales son implantados o inyectados en el órgano a partir del cual se origina el cáncer. Los xenoinjertos ortotópicos presentan el mismo microambiente que los tumores originales. Por ello, son considerados más próximos al proceso de tumorigénesis en humanos. Además, parecen ser más adecuados para el estudio de las metástasis ya

que los modelos de xenoinjerto subcutáneo rara vez las desarrollan [48, 67]. Sin embargo a pesar de las ventajas, la generación de modelos experimentales supone una labor intensa y técnicamente exigente. Además, el implante de células tumorales o de masas en el páncreas mediante cirugía puede generar un trauma importante al animal receptor que requiera un periodo de convalecencia largo.

Otra modalidad es la inyección directa de células tumorales en el páncreas tras la exposición quirúrgica del mismo. Ésta se ha asociado a un aumento local de la presión en la zona del páncreas donde se realizó la inyección. Debido a que el parénquima pancreático es muy fino, se puede extravasar con facilidad resultando en una reducción de la formación tumoral y en una mayor diseminación intrabdominal. Por esta razón algunos autores han utilizado Matrigel. Se trata de una matriz biológica que a bajas temperaturas permanece líquida. Cuando supera los 22°C se transforma en un gel semisólido. Actúa como una matriz en tres dimensiones que contiene células cancerígenas pancreáticas para la inyección directa previniendo fugas de células neoplásicas y mejorando la tasa de formación tumoral. Sin embargo, esto también puede ser una desventaja ya que la matriz que se forma alrededor del tumor puede evitar la diseminación metastásica de las células así como la correcta llegada de los antineoplásicos estudiados [68, 69]. Por otro lado, no es una técnica exenta de mortalidad. Con el objetivo de reducir la morbimortalidad que la cirugía puede provocar, algunos autores han desarrollado otros métodos menos invasivos como la inyección en el páncreas de células tumorales guiadas por ultrasonidos [69].

Los ratones inmunodeprimidos con xenoinjertos ortotópicos no replican exactamente igual el proceso natural de la tumorigénesis humana debido a la falta de un microambiente tumoral parecido. Se piensa que las células inmunes en el

microambiente del tumor juegan un papel fundamental en la progresión y en las metástasis del cáncer de páncreas.

5.3.4. Según el origen de las células implantadas

5.3.4.1. Tumores in vitro

La mayoría de los trabajos focalizados en mejorar el conocimiento sobre el cáncer de páncreas se basan en líneas celulares y xenoinjertos derivados de líneas celulares cultivadas “in vitro”. Estos sistemas de modelos tienen múltiples deficiencias, en gran medida resultado de haber sido cultivadas in vitro durante muchas generaciones. Prácticamente todas estas líneas celulares establecidas acumulan cambios genotípicos o fenotípicos que les confieren una ventaja de supervivencia in vitro, presentan expansión clonal, y sufren alteraciones en las características que dependen de la interacción de las células tumorales con el tejido del estroma adyacente en vivo. En consecuencia, el grado en el que estas líneas celulares y los xenoinjertos derivados de los mismos reflejan características de los tumores primarios de los que se derivaron es controvertido [48].

5.3.4.2. Tumor Graft

Como alternativa algunos grupos plantean el implante de muestras heterogéneas de tumores primarios humanos de ADCP con una limitación de pasajes en ratones inmunodeprimidos que pueden retener el genotipo y fenotipo de los tumores de origen. Estos modelos podrían utilizarse para caracterizar tumores individuales del

ADCP, identificar las características comunes a los tumores de páncreas, y evaluar nuevos agentes terapéuticos. Aunque este tipo de xenoinjerto derivado del paciente se encuentra descrito en la literatura ya en las décadas de los 60 y 70 [48, 22], las ventajas de estos modelos y su uso en medicamentos han sido recientemente reconocido e implementados [48, 70].

En el establecimiento de modelos experimentales de xenoinjertos derivados de tumores de un humano, las muestras de tumores primarios se implantan en los ratones por vía subcutánea u ortotópica, sin paso intermedio de propagación in vitro.

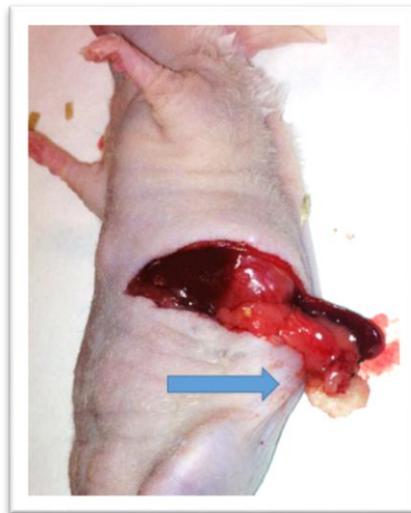


Figura 7. Tumorgraft: Injerto de cáncer de páncreas humano extraído tras resección pancreática implantado en la cola del páncreas de un ratón inmudeprimido.

Hablamos de “tumorgraft” cuando en los ratones inmunocomprometidos se implantan especímenes heterogéneos de tumores primarios humanos por vía subcutánea u ortotópica, inmediatamente después de la cirugía de resección de los tumores humanos [48]. Múltiples laboratorios han establecido modelos “tumorgraft” de mama, cáncer de páncreas, renal, cabeza y cuello, y los tumores hepatocelulares.

El grado en el que los tumorgraft de ADCP refleja las características morfológicas e histológicas de sus tumores de origen ha sido escasamente estudiado y existen pocas

publicaciones al respecto. Por esta razón, nuestro grupo que cuenta con una amplia experiencia en el campo de los modelos murinos inducidos por medio de sustancias químicas como el BOP, ha tomado el relevo en el estudio de los tumorgraft, con el fin de poder alcanzar modelos más similares al ser humano con el que poder experimentar con nuevos fármacos quimioterápicos.

Algunos de estos modelos han predicho la respuesta clínica de un tipo específico de tumor a distintos agentes quimioterapéuticos [69, 70, 73, 74, 75]. Sin embargo, el grado en que los tumorgraft de ADCP reflejan la histología o el comportamiento del tumor han sido escasamente estudiados. Algunos autores como García et al. [79] describen que este tipo de modelos experimentales mantienen las características histopatológicas y los rasgos genéticos de los tumores primarios de los que derivan con un máximo de dos pases en dos generaciones de ratones. El hecho de que sean capaces de mantener las características histopatológicas del tumor humano puede ser usado para predecir el crecimiento tumoral en el ratón.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Los carcinomas periampulares, y especialmente el ADCP, se caracterizan por presentar una diseminación vascular, linfática y perineural precoz de forma que algunos autores consideran que se trata de una enfermedad sistémica desde el inicio. Ello implica altos índices de irresecabilidad y argumenta el pronóstico ominoso de la enfermedad. En el momento del diagnóstico, hasta un 85% de los pacientes presenta enfermedad macroscópica más allá de los límites del órgano. Las grandes series epidemiológicas aproximan la incidencia de los tumores periampulares a su mortalidad anual.

Como consecuencia del infausto pronóstico de esta enfermedad, es fundamental el desarrollo de nuevos fármacos quimioterápicos de acción sistémica que complementen el tratamiento quirúrgico a nivel local. Una quimioterapia neoadyuvante eficaz capaz de rescatar para cirugía a pacientes con enfermedad localmente avanzada o incluso metastásica, podría aumentar la supervivencia de estos enfermos.

Uno de los principales problemas que encuentran los investigadores para desarrollar nuevas moléculas es la falta de modelos experimentales que reproduzcan fielmente las características del carcinoma periampular del humano. Tanto los modelos desarrollados en ratones modificados genéticamente (GEMM) como aquellos inducidos por sustancias cancerígenas han facilitado el entendimiento a nivel molecular y la aparición de nuevos fármacos antitumorales con actividad *in vitro*. Desgraciadamente, a menudo estas líneas de tratamiento son poco eficaces en el humano, *in vivo*.

La aparición de los ratones atímicos (desnudos o “knock-out”) ha permitido retomar los modelos experimentales animales con xenoinjertos humanos, cuya principal limitación era la alta tasa de rechazos. De esta manera, podemos desarrollar modelos experimentales de tumores periampulares humanos que conservan características genotípicas y fenotípicas originales.

Las características morfológicas e histológicas derivadas de los xenoinjertos de cáncer periampular en los modelos experimentales han sido escasamente estudiadas. Para poder alcanzar modelos experimentales animales más parecidos al cáncer humano hemos desarrollado este estudio que se encuentra incluido dentro de una línea de investigación más ambiciosa que tiene como objetivo identificar nuevas moléculas o combinaciones de éstas a través de estos modelos animales con el fin último de poder realizar una neoadyuvancia que rescate a un mayor número de pacientes para la cirugía.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

H0: El modelo experimental de xenoinjerto de carcinoma periampular subcutáneo NO confiere variaciones significativas a nivel histopatológico e inmunohistoquímico en relación al tumor humano original.

H1: El modelo experimental de xenoinjerto de carcinoma periampular subcutáneo confiere variaciones significativas a nivel histopatológico e inmunohistoquímico en relación al tumor humano original.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

Generales

- Evaluar si se producen diferencias en las características tumorales entre el carcinoma periampular humano y el xenoinjerto subcutáneo de dicho tumor en los sucesivos pases de nuestro modelo experimental.

Específicos

- Valorar el implante subcutáneo de xenoinjerto de carcinoma periampular en términos de eficacia y seguridad.
- Caracterizar los rasgos fenotípicos del tumor humano original y evaluar su influencia sobre el desarrollo tumoral.
- Evaluar las diferencias entre las características histopatológicas de los tumores humanos originales y los generados con el modelo experimental en los sucesivos pases.
- Evaluar las diferencias entre las características inmunohistoquímicas de los tumores humanos originales y los generados con el modelo experimental en los sucesivos pases.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODO

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Antes de iniciar el capítulo de material y metodología propiamente dicho creemos importante hacer un comentario sobre el diseño del estudio y las fases en las que se ha desarrollado. Se puede observar de una forma esquemática y sencilla cuales han sido los pasos que hemos seguido para validar el modelo experimental que presentamos. Las etapas en las que se ha desarrollado el estudio son:

- **FASE DE DISEÑO Y PRE-EXPERIMENTAL:** Establecemos la necesidad de desarrollar un modelo experimental animal de tumores periampulares como base para futuras investigaciones en las que podamos experimentar con nuevos fármacos y mejorar el tratamiento de estos tumores. Definimos nuestro objetivo principal, diseñamos el modelo experimental, las variables a medir, su distribución en una base de datos y el cronograma de trabajo. Posteriormente, presentamos al comité de ética de experimentación animal el proyecto para que nos concedan la autorización pertinente para el desarrollo del mismo.
- **FASE CLÍNICA:** En este momento comienza la selección de pacientes entre la población de pacientes con carcinoma periampular que cumplen criterios de inclusión. Se les ofrece entonces la participación en el estudio y tras dar su consentimiento informado (verbal y escrito) son incluidos en la lista de espera quirúrgica. Esta fase coincide en el tiempo con la siguiente fase debido a la fragilidad de las muestras y que estas deban ser implantadas en un corto espacio de tiempo tras su extracción.

- **FASE DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL:** Período más prolongado en el tiempo, en el que ponemos en marcha el trabajo diseñado en el apartado anterior en el quirófano experimental y en el Laboratorio 209, ambos localizados en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Se realiza el implante de los xenoinjertos, la medida de variables en el animal de experimentación y el sacrificio de los mismos. Se obtienen las muestras que una vez teñidas para el estudio histopatológico e inmunohistoquímica serán analizadas.

- **FASE DE RECOGIDA E INTERPRETACIÓN DE DATOS:** De manera simultánea a la experimentación animal, realizamos la recogida de datos en la base de datos diseñada a tal efecto para su posterior interpretación con la ayuda de la Unidad de Metodología de la Investigación del H.U. Virgen del Rocío (Sevilla)

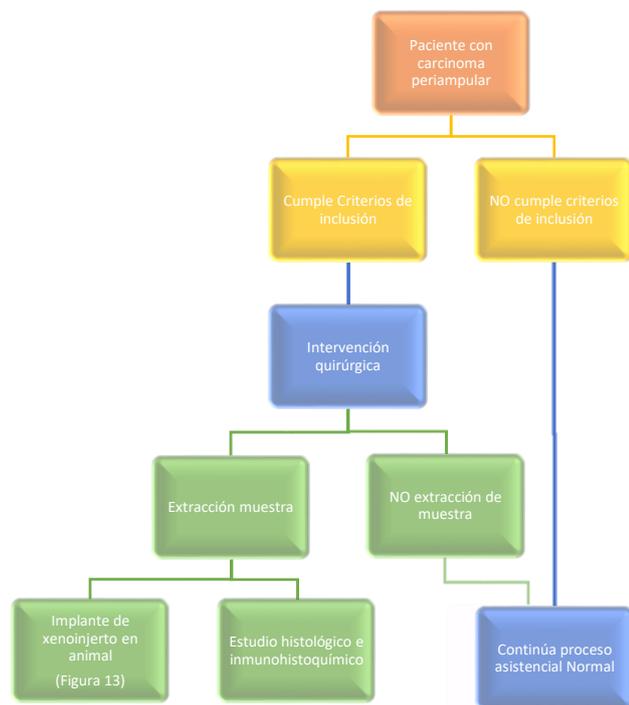


Figura 8. Esquema del diseño del estudio.

2. PACIENTES Y ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

2.1. PACIENTES

Este estudio incluye muestras de tejido tumoral obtenidas de pacientes con tumores periampulares previa firma de consentimiento informado específico. La utilización de las muestras fue aprobada por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Sevilla de acuerdo con los principios éticos de esta Institución. (Anexo I. Proyecto CEEA-US2014-013/5)

2.1.1 Criterios de inclusión

- Mayores de 18 años.
- Diagnóstico de tumor periampular.
- Laparotomía exploradora desde 17 de Mayo de 2012 hasta 13 de Febrero de 2014 en el Hospital Universitario “Virgen del Rocío” (Sevilla) intervenidos por la Unidad de Cirugía Hepatobiliar y de Trasplante Hepático.
- Consentimiento informado escrito (Anexo II) para la obtención de muestras de tejido tumoral y su utilización en el marco del presente proyecto de investigación. En este documento se explica de forma razonada con el paciente los procedimientos de obtención de la muestra y los posibles riesgos y beneficios de participar en dicho estudio.

2.1.2 Criterios de exclusión

- Menores de 18 años.
- Neoplasias no identificadas como tumores periampulares.
- Negativa por parte del paciente a dar consentimiento escrito para la utilización de la muestra.

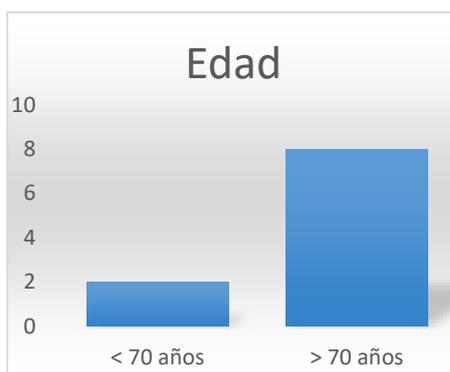
2.1.3 Características de la muestra

Se obtuvieron 10 muestras tumorales en fresco de la pieza quirúrgica. La extracción de dicha muestra fue realizada por nuestra anatomopatóloga inmediatamente después de la cirugía. En 9 de los 10 casos, el tejido tumoral se obtuvo mediante duodenopancreatectomía cefálica. En el caso restante, al tratarse de una enfermedad irresecable, nos limitamos a tomar una muestra de tejido pancreático para diagnosticar la estirpe tumoral en el contexto de una laparotomía exploradora. El diagnóstico anatomopatológico más frecuente fue ADCP (n=8). También se registraron dos ampulomas (adenocarcinomas ampulares). Para clasificar el estadio tumoral hemos empleado la clasificación TNM del Comité Americano para el Cáncer del 2010 (Anexo III)

Para cada paciente que se incluye en el estudio y del que se obtienen las muestras para el xenoinjerto se realiza un estudio anatomopatológico y epidemiológico.

El 50% de los pacientes eran hombres. La edad media es de 70,3 años (Rango 50-81 años) y el 80% de los pacientes son mayores de 70 años.

Tabla 3. Distribución de la muestra por grupos de edad (mayores y menores de 70 años)



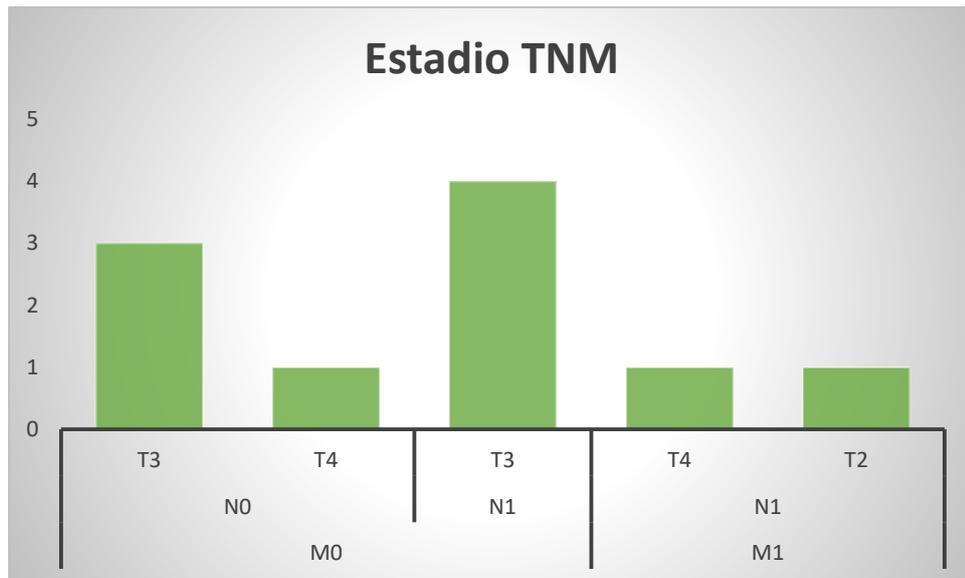
En cuanto al estadio tumoral el 70% de los casos eran estadio II (30% estadio IIA y 40% estadio IIB) y con menor frecuencia hay un estadio III y 2 casos en estadio IVB lo que supone un 10% y 20% respectivamente. El estadio TNM desglosado es el siguiente:

- T: T2 (10%), T3 (70%) y T4 (20%).
- N: N0 (40%) y N1 (60%).
- M: M0 (80%) y M1 (20%).

Tabla 4. Distribución de la muestra según estadio TNM de la lesión tumoral.



Tabla 5. Distribución de la muestra según el estadio individual de la T, la N y la M.



El tejido fue obtenido en condiciones estériles, evitando tejido necrótico tumoral y áreas de tejido pancreático sano. Las muestras fueron cortadas en un fragmento de 2 x 2 x 2 cm e introducidas en solución de preservación (Nutrient mixture F-10 HAM con NaHCO₃ y L-Glutamine) y conservadas a temperatura ambiente hasta el implante. El periodo de latencia para el implante oscilaba entre 15 minutos y 2 horas.

Tabla 6. Análisis descriptivo de los tumores periampulares de la muestra.

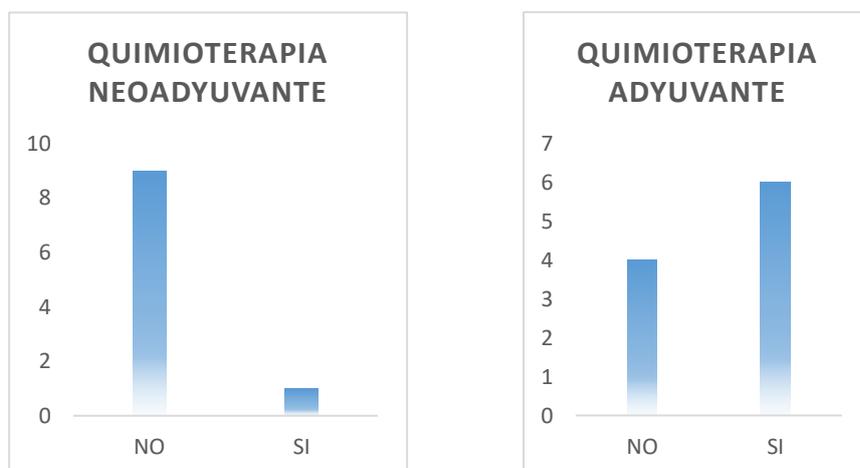
N	Edad	Sexo	Estirpe Tumoral	TNM	Estadio AJCC	Grado histológico	Invasión perineural	Tratamiento QT Neoadyuvante	Tratamiento QT Adyuvante
1	75	MUJER	ADCP	T4NxM1	IVB	Moderadamente diferenciado	NO	NO	NO
2	77	MUJER	AMPULOMA	T4N0M0	III	Moderadamente diferenciado	SI	NO	SI
3	57	HOMBRE	ADCP	T3N0M0	IIA	Moderadamente diferenciado	NO	NO	NO
4	71	MUJER	ADCP	TxN1M1	IVB	Moderadamente diferenciado	NO	SI	SI
5	71	HOMBRE	ADCP	T3N1M0	IIB	Moderadamente diferenciado	NO	NO	SI
6	73	MUJER	ADCP	T3N1M0	IIB	Moderadamente diferenciado	SI	NO	SI
7	50	HOMBRE	ADCP	T3N0M0	IIA	Bien diferenciado	SI	NO	NO
8	70	HOMBRE	AMPULOMA	T3N1M0	IIB	Poco diferenciado	NO	NO	SI
9	81	HOMBRE	ADCP	T3N0M0	IIA	Moderadamente diferenciado	NO	NO	NO
10	78	MUJER	ADCP	T3N1M0	IIB	Bien diferenciado	NO	NO	SI

El tratamiento neoadyuvante solo se administró en el 10% de los pacientes (n=1) utilizando radioterapia y quimioterapia con el fármaco nab-paclitaxel (paclitaxel vehiculizado en nanopartículas de albúmina). Por otro lado, el 60% (n=6) recibieron tratamiento adyuvante siguiendo los criterios oncológicos habituales. El fármaco más utilizado fue la Gemcitabina en monoterapia (n=4) y a continuación la asociación Gemcitabina+Paclitaxel (n=1), el Oxaliplatino (n=1) y la Capecitabina (n=1). La supervivencia media de los pacientes fue de 19,30 meses (Rango 5-40 meses).

Tabla 7. Esquemas de quimioterapia adyuvante que se administraron a los pacientes de la muestra.



Tabla 8. Distribución de pacientes según el tipo de quimioterapia neoadyuvante y adyuvante.



En cuanto a la supervivencia, el 100% de los pacientes ha sido éxitos con un tiempo de seguimiento de 4 años. Se ha realizado una curva de Kaplan-Meyer para la supervivencia de los humanos que es la siguiente:

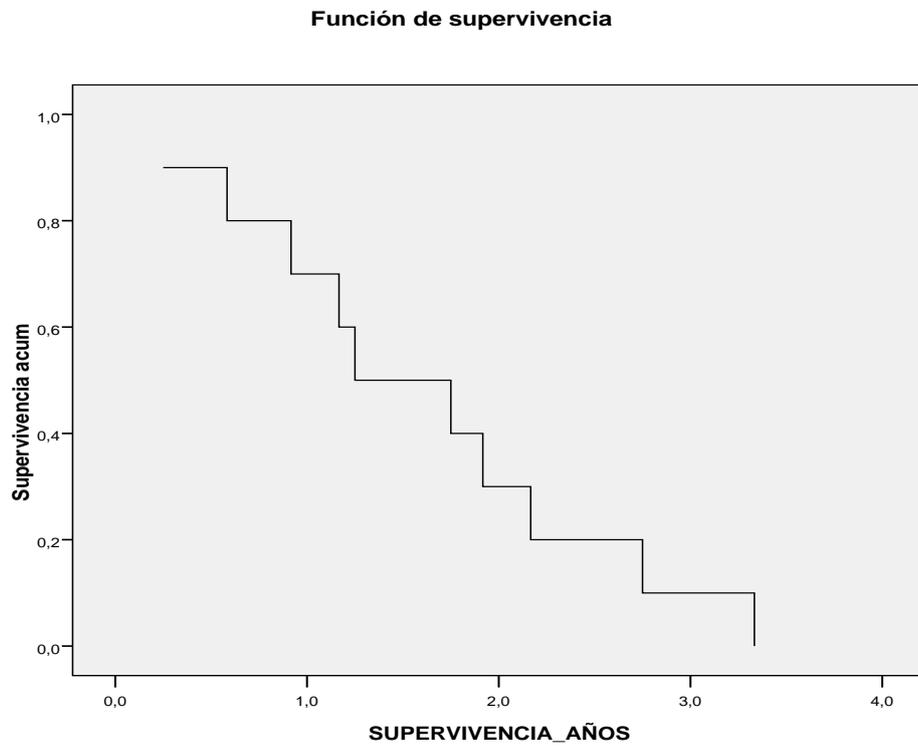


Figura 9. Curva de Kaplan-Meyer de supervivencia de los pacientes de los que se obtienen las muestras para implantes

Se observa en esta curva como el 70% están vivos al año, el 30% a los 2 años y solo el 10% a los 3 años. La mediana de supervivencia es de 1.25 +/- 0.46 años.

2.2 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizan animales de experimentación de la especie *Mus musculus* y la cepa Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}. El peso medio inicial es de 20-25g.

Todos los animales eran macho, en fase adulta de la vida (6 semanas de edad) procedentes de la Unión Europea y comercializados por *Harlan Laboratory Inc.* (Indianapolis, IN, EEUU)



Figura 10. Espécimen de *Mus musculus* (ratón) de tipo inmunodeprimido o atímico.

2.2.1 Taxonomía

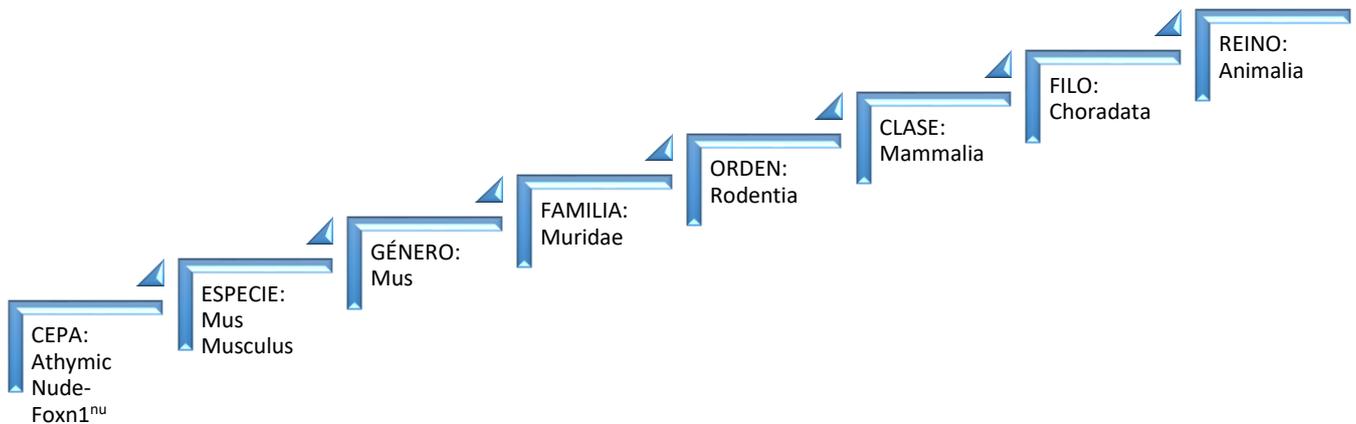


Figura 11. Taxonomía del animal de experimentación utilizado como modelo animal.

- **Nombre común:** Ratón desnudo, atímico o Knoutout (Nude mice o Athimic mice)
- **Fenotipo:** Albino. Fenotípicamente sin pelo. Es posible el crecimiento intermitente y escaso del cabello.
- **Camada media:** 7 ratones
- El alelo nu en el cromosoma 11 es una mutación autosómica recesiva
- Presenta un timo rudimentario disfuncional
- Deficiencia de los linfocitos T
- Los linfocitos B presenta una función normal.
- No pueden generar células efectoras citotóxicas
- Sin respuesta de injerto contra huésped
- Foxn1^{nu} / Foxn1 + heterocigoto; no muestran expresión parcial del fenotipo nu

2.2.2 *Otras características*

- **Peso:** Macho: 24,2-28,9 g; Hembra: 21-28,1g
- **Esperanza de vida:** Normalmente es de 6 meses a un año. En ambientes libres de gérmenes y controlados con los tratamientos con antibióticos que se encuentran en muchos laboratorios pueden vivir casi tanto tiempo como los ratones normales (18 meses a dos años).
- Número de cromosomas: 40 (22500 a 30000 genes)
- Consumo de agua : 15 ml/día
- Consumo de alimento: 5-10 g/día (adulto)
- Temperatura corporal: 36.2-37.5 C (rectal)
- Frecuencia cardíaca : 280-412/min
- Frecuencia respiratoria:74 (33-127)

3. METODOLOGÍA

3.1. INSTALACIONES Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El quirófano experimental del IBiS está registrado según los estándares del Decreto 138/2002, BOJA de 10 de Mayo. La descripción de sus instalaciones quedan recogidas en la Resolución 151/2008, BOJA de 30 de Julio, que permiten estabular en jaulas individuales aisladas con microambiente controlado, entre otros animales de experimentación, ratones desnudos (Figura 12) bajo las condiciones ambientales que determina el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca: temperatura y humedad (21 ± 5 °C. 70% de humedad), ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, acceso a una dieta estándar y a reservorios de agua a los que pudieron acceder libremente y que fueron renovados diariamente. Los animales fueron evaluados semanalmente controlándose tanto el peso como la situación de salud de los mismos.



Figura 12. Estabularios de los animales de experimentación en el IBiS.

3.2 IMPLANTE DE XENOINJERTO

3.2.1 Obtención de muestra para implante.

Las muestras se obtienen de pacientes humanos con tumores periampulares que cumplen criterios de inclusión en el estudio y previo consentimiento informado. La intervención quirúrgica más frecuente fue la Duodenopancreatectomía Cefálica aunque también hay casos de laparotomías exploradoras para valoración de resecabilidad.

El equipo quirúrgico encargado de la intervención pertenecen a la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario Virgen del Rocío. En el procedimiento quirúrgico aislaban de la masa tumoral un fragmento de aproximadamente de 2 x 2 x 2 cm (Hx). Este fragmento tumoral se mantenía en líquido de conservación de tejidos (Nutrient mixture F-10 HAM con NaHCO₃ y L-Glutamine) y era transportado al quirófano experimental del IBiS.

3.2.2 Preparación de la muestra para implante

Antes de realizar el implante y bajo la campana de flujo laminar se dividía el fragmento principal en 5 porciones de 3x3 mm que se destinaron para:

- Implante subcutáneo (1) para el presente estudio
- Implante vía intraabdominal (1) y vía pancreática (1) para otros proyectos.
- Fijación con paraformaldehído (1) y congelación (1) para el estudio histopatológico.

3.2.3 Procedimiento de implante

La intervención se realizará en la campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad quirúrgica.

LISTA DE MATERIALES

- Campo estéril rectangular.
- Guantes estériles.
- Jeringa de 5 cc
- Aguja intradérmica
- Anestesia: ketamina (80 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y droperidol (100 mg/kg).
- Sutura de seda del 3/0 con aguja curva cilíndrica.
- Portagujas.
- Tijeras.
- Pinza
- Bisturí (Hoja nº 15 y mango)
- Campana de flujo laminar.

TÉCNICA

- El operador, en condiciones de esterilidad y en la campana de flujo laminar, inicia el procedimiento administrando anestesia al ratón en la zona ventral utilizando la aguja intradérmica y administrando 1 cc de anestésico intraperitoneal por cada 10g de peso.

- Esperamos unos 10-15 min. hasta que el ratón este anestesiado (ausencia de reflejos periféricos).
- Se realiza una incisión con el bisturí en el dorso del ratón de unos 2-3 mm y se disecciona con la tijera un bolsillo subcutáneo.
- Con la pinza introducimos la porción tumoral.
- Se cierra el bolsillo utilizando el portaguja mediante puntos simples de seda 3/0.

3.2.3 Anestesia

La anestesia en el procedimiento se realiza con ketamina, xilacina y droperidol (neuroleptico) por vía intraperitoneal. Las dosis de los fármacos que mantendrán la analgesia y sedación durante la intervención quirúrgica serán: ketamina (80 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y droperidol, 100 mg/kg. La acción sedante e hipnótica del droperidol es débil, pero como neuroleptico suprime los movimientos anormales manteniendo los reflejos medulares. El efecto anestésico suele durar 1 h aproximadamente durante el cual se realiza el implante. Debido a las características mínimamente intervencionistas de la operación quirúrgica no se requiere analgesia postoperatoria.

En caso de que el animal requiera analgesia postoperatoria se procederá a la administración de 0,1 ml de ofeno (Ketofens al 1%, Merial, Francia) cada 12 horas hasta reducción de los signos de sufrimiento.

3.2.4 Secuencia de pases

Una vez que se ha implantado la muestra tumoral procedente del humano (Hx), este ratón forma parte de la serie P0 (n=10).

Posteriormente, cuando el ratón P0 desarrolle tumor subcutáneo de más de 1 cm se procederá a su sacrificio. Se obtienen tres porciones de 3x3 mm, una destinada a implantarlo a nivel subcutáneo en un nuevo ratón de la serie P1 (n=4) y las otras dos porciones obtenidas se fijan con paraformaldehído y se congelan para determinar los valores histológicos.

Cuando el ratón P1 desarrolle tumor subcutáneo de más de 1 cm se procederá a su sacrificio. Se obtienen tres porciones de 3x3 mm, una destinada a implantarlo a nivel subcutáneo en un nuevo ratón de la serie P2 (n=4) y las otras dos porciones obtenidas se fijan con paraformaldehído y se congelan para determinar los valores histológicos.

Cuando el ratón de la serie P2 desarrolla tumor de más de 1 cm se realiza el mismo procedimiento obteniendo en este caso dos porciones de 3x3 mm que se fijan con paraformaldehído y se congelan para determinar los valores histológicos. Este es el último pase y no se realizan más implantes.



Figura 13. Esquema que representa el procedimiento de los implantes para generar el modelo animal.

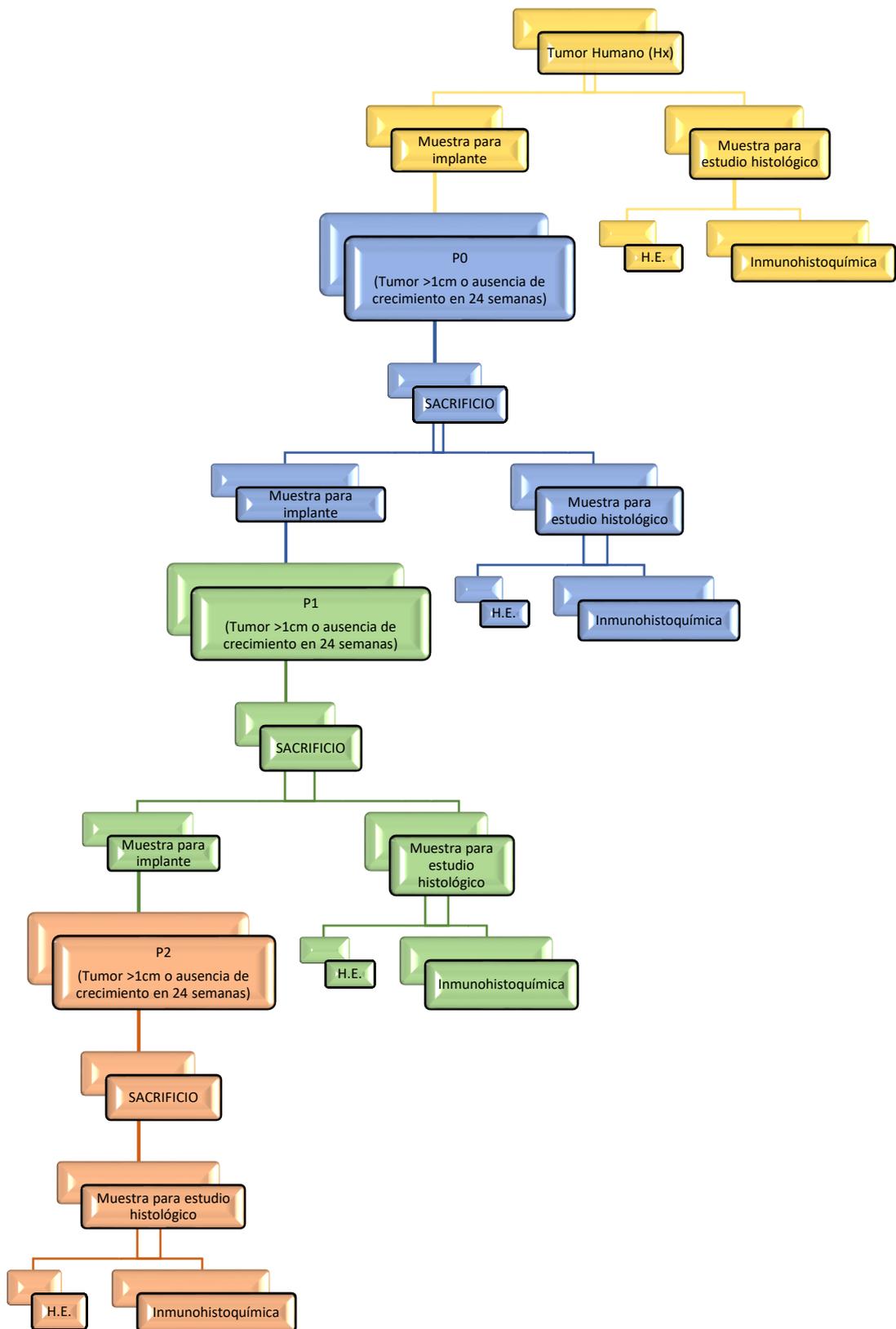


Figura 14. Esquema con el destino de las distintas muestras obtenidas durante el estudio.

3.3 SEGUIMIENTO Y TOMA DE MUESTRAS

Los animales de experimentación serán mantenidos en condiciones estandarizadas de estabulación con un ciclo estable de luz (día: noche), acceso libre a los alimentos y agua, y unas condiciones fitosanitarias adecuadas. En este sentido, el proyecto cumplirá la legislación actual en esta materia, en particular, el Real Decreto 53/2013 (1 de febrero 2013), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Entre los aspectos relevantes para el proyecto se seguirá el procedimiento sobre el cuidado de los animales de experimentación en términos de explotación, procedimientos de transporte, mantenimiento, alimentación, condiciones fitosanitarias, experimentación, administración de fármacos e implantes de células o tejidos, anestesia, administración de fármacos y sacrificio de los animales destinados a la experimentación y otros objetivos científicos.

Estos procedimientos han sido revisados, y corregidos en su caso, por el Comité de Investigación Biomédica del Centro. Estabulación de los animales de experimentación en jaula individual con pienso pellet y agua en instalaciones del IBIS (ES410910008015; SE15/CS/U)

En cuanto a la seguridad del procedimiento (morbilidad) se han evaluado tres variables que se definen a continuación:

- **Infección del sitio quirúrgico:** Presencia de signos inflamatorios visibles como eritema, calor y rubor asociados a la secreción purulenta de la herida.

- Hemorragia: Presencia de sangrado después del procedimiento o de hematoma en la zona de la incisión.
- Dehiscencia sutura cutánea: Apertura parcial o total de la incisión cutánea.

Para obtener las muestras de los ratones con xenoimplante se procede al sacrificio del animal. La técnica utilizada para dicho procedimiento es la sobredosis de anestésico o mediante luxación cervical en los siguientes supuestos:

- Complicación postoperatoria en caso de no poder ser resuelta con garantías de ausencia de sufrimiento para el animal de experimentación.
- Cuando crece cualquier tumor de más de 1 cm.
- No hay crecimiento tumoral después de 6 meses tras el implante.

3.4 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

3.4.1 Procesamiento y preservación del tejido tumoral

El tejido recogido a partir del tumor primario (Hx) o posteriores generaciones de especímenes tumorales (Pase 0 -P0-, Pase 0 ó P0, Pase 1 ó -P1- yó pase 2 o -P2-) que no eran necesarias para la implantación se conservan en el Biobanco para su uso futuro en otros proyectos de investigación y para los análisis incluidos en el presente proyecto de investigación. Las muestras se preservaron por los siguientes procedimientos:

- 1) ***Snap freezing***: El tejido tumoral era diseccionado, colocado en crioviales e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 ° C.
- 2) **Criopreservación**: Se fraccionó cada tumor colocando 5 fragmentos/vial con 1 ml de medio MEM conteniendo DMSO (10%) y suero bovino fetal (10%) en un contenedor en contacto indirecto con una solución de isopropanol puro que es mantenido a -80°C durante 24 horas. Posteriormente se transfieren los criotubos a un contenedor de nitrógeno líquido para su almacenamiento.
- 3) **Fijación en una solución de paraformaldehido**: El tejido tumoral se fija con una solución de formalina al 10%, para su posterior inclusión en parafina, obtención de los cortes de 5 μ , útiles para los estudios de histología (hematoxilina-eosina), y medición de las variables por procedimiento de inmunohistoquímica.

3.4.2 Preparación del tejido para el estudio histológico.

Los cortes realizados en los bloques de parafina se colocaron de forma seriada en portas con base de poli-lisina apta para los estudios histológicos. Posteriormente, y para su estudio histológico, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas siguiendo el siguiente procedimiento.

3.4.2.1 Desparafinado

Las muestras fueron colocadas en cestillos de vidrio y calentadas durante 1 hora a 60°C. Esta es la temperatura a la que la parafina se vuelve líquida.



Figura 15. Cestillo con muestras parafinadas lista para calentar

3.4.2.2 Hidratación

- Bañamos las muestras tres veces en Xileno durante 5 minutos.
- El xileno ($C_6H_4(CH_3)_2$) es un benceno que disuelve los restos de parafina.



Figura 16. Cubetas para el baño con xileno

- Hidratamos las muestras en orden decreciente de concentración de alcohol. Desde alcohol absoluto (100%) hasta agua destilada. Se meten las muestras 2 minutos en cada uno.



Figura 17. Cubetas con alcohol en orden creciente de concentración.

3.4.3 *Histopatología: Hematoxilina-eosina y Masson*

Para realizar la tinción con Hematoxilina-Eosina, después del desparafinado y la rehidratación de los cortes histológicos, el tejido se lavó brevemente en agua desionizada y se tiñe con Harris hematoxilina (Fischer-Científico, Suwanee, GA). Las muestras fueron luego procesadas en alcohol ácido al 0,25%, pavonado de litio carbonato, y se contratiñeron con una solución de eosina (Acros Organics-Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, Nueva Jersey).

Finalmente, el tejido fue deshidratado en dos baños de etanol al 95% y etanol absoluto y se fijó en xileno. Esta tinción es básica para el estudio histopatológico permitiéndonos evaluar el nº de mitosis y la diferenciación del tejido.

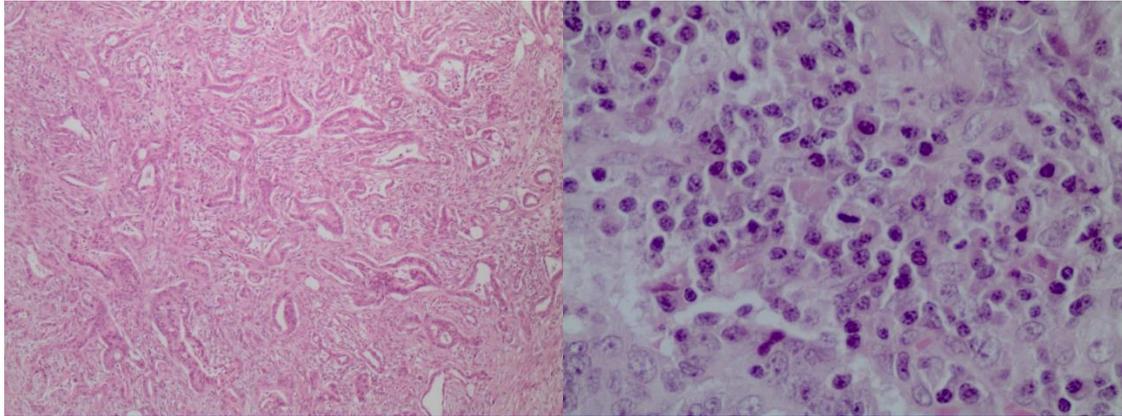


Figura 18. Muestras histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina

La tinción del tricrómico de Masson nos sirve para valorar el grado de fibrosis de un tejido. Tras desparafinar y rehidratar se procede a la tinción con hematoxilina férrica durante 10 minutos, se lava con agua destilada y se procede a la segunda tinción con escarlata-fucsina ácida durante 2-5 minutos. Volvemos a lavar con agua destilada y por último usamos la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico durante 10-15 minutos para teñir con azul de anilina durante 15 minutos más.

Las fibras de colágeno se verán de color azul, las estructuras oxidadas, los citoplasmas de color rojo y los núcleos de color marrón. Hemos utilizado una graduación de 0 a 4 donde 0 es la ausencia de fibrosis y 4 es la máxima fibrosis. Posteriormente hemos agrupado los grados 0 y 1 como “leve”, el grado 3 como “moderado” y el grado 4 como “elevado”

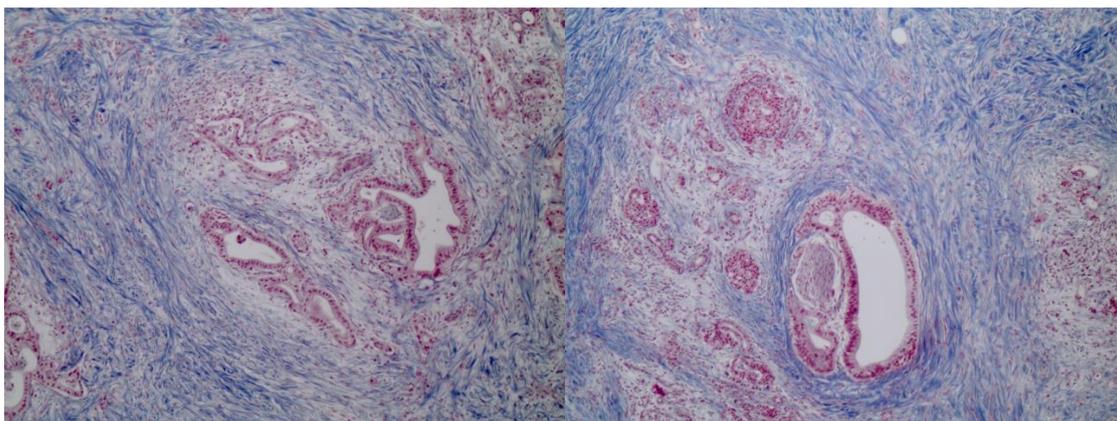


Figura 19. Muestras histológicas teñidas con tricrómico de Masson.

3.4.4 Inmuhistoquímica

La medición de la expresión de las proteínas en estudio se realizó mediante tinciones de inmunohistoquímica. Las variables incluidas en el proyecto se relacionaron con la proliferación celular (Ki-67), muerte celular (TUNEL), angiogénesis (CD31), y fibrogénesis (α -smooth muscle actin o Alfa-SMA). El procedimiento se basa en la utilización de anticuerpos primarios específicos para la detección de la proteína en estudio tales como Ki-67 (FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clon MIB-1, Ref IR626, DAKO), CD31 (polyclonal anti-CD31, ab28364, Abcam), TUNEL (TACSTM TdT Kit, TA4625, R&D), and α -SMA (polyclonal anti- α -SMA, ab5694, Abcam).

Los cortes de las muestras previamente desparafinados y rehidratados según se ha descrito previamente, se sometieron al procedimiento denominado de “*Exposición antigénica*” que persigue facilitar la exposición de los antígenos a los anticuerpos primarios. Para ello, las muestras fueron colocadas dentro del recipiente de plástico de color blanco (Figura 20) que contiene Citrato Sódico a 10 mM con pH 6. Las muestras fueron calentadas al baño maría en el microondas durante 15 minutos a máxima potencia.



Figura 20. Citrato de Sodio al baño maría durante 15 minutos.

Para reducir la unión del anticuerpo primario a las proteínas de forma inespecífica, la muestra se incubó entre 30 minutos y una hora con un volumen (80 ml) de una solución acuosa de bloqueo o tampón TBSA-BSAT (0,12 g Tris-hidroximetil-aminometano, 0,9 g NaCl, 1 ml de azida sódica al 2%, 2 g albúmina bovina, 0,1 ml de Triton X-100) (Figura 21).



Figura 21. Muestras bañadas en TBSA-BSAT

Tras el bloqueo de la muestra, se procedió a su incubación con el anticuerpo primario en una cámara húmeda que se prepara mediante la colocación de un papel secante mojado en un contenedor de plástico de dimensiones adecuadas (Figura 22).



Figura 22. Cámara húmeda.

Para evitar que la solución de anticuerpo se extienda en exceso en la muestra, ésta se delimita con un bolígrafo (Super PAP pen), facilitando que se concentre sobre la muestra.

Se deposita un volumen adecuado sobre cada muestra (25 μ l) de anticuerpo primario a la dilución óptima para los estudios de inmunohistoquímica que varían entre 1/50 (anti-CD31), 1:250 (α -SMA) y 1/500 (anti-ki67). La reacción de TUNEL se desarrolla siguiendo las condiciones del ensayo comercial. Las muestras fueron incubadas en la cámara fría a 4°C durante la noche.



Figura 23. Muestras listas para incubación con el anticuerpo.

Después de la incubación de la muestra con el anticuerpo primario, este se retiró y se procedió a realizar dos lavados con TBSA-BSAT de 5 minutos, tras lo cual se procedió a la incubación durante 90 segundos con el anticuerpos secundario marcado con un fluoróforo (Alexa 488 Anti-rabbit/goat/mouse IgG) y a la concentración de 1/500

siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Se evitó exponer el anticuerpo secundario a la luz solar o debajo de un fluorescente. Se trabajó en un sitio en penumbra para conservar la fluorescencia. Tras la incubación de la muestra con el anticuerpo secundario, este se retiró y se procedió a realizar tres lavados con TBSA-BSAT de 5 minutos.

Tras las incubaciones se realizó al montaje de las muestras para su preservación mediante la colocación de un cubre de cristal entre los que se dispone una gota de solución adhesiva con un marcador de ADN para localizar los núcleos celulares (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI) (Figura 24).



Figura 24. Pegamento para fijación de la muestra.

La expresión de las proteínas en estudio se evaluó mediante la captación de la imagen de fluorescencia emitida por la muestra mediante el microscopio de fluorescencia Olympus BX61, y su análisis se realizó mediante los programas Application Suite Advanced Fluorescence. El análisis cuantitativo se realizó mediante el programa *Cell Sens Dimensions* (Figura 25).

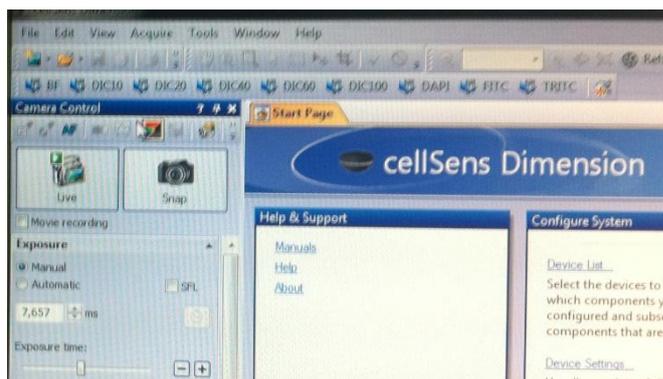


Figura 25. Cell Sens Dimensions.

Normalmente la captación de la imagen de fluorescencia se realiza en una habitación con la menor luz diurna posible para evitar pérdida de la fluorescencia. Los pasos a realizar para la captación de la imagen en el rango de la luz verde por utilización de un anticuerpo secundario (Alexa 488 Anti-rabbit/goat/mouse IgG) es común a todas las proteínas en estudio:

1. Seleccionamos el modo FICT en el ordenador que hace que el microscopio emita una luz verde que marca los núcleos en división.
2. Seleccionar el objetivo x4 que nos permite buscar la muestra. Una vez encontrada cambiamos al objetivo x20
3. Enfocamos.
4. Aumentar el tiempo de exposición a 50,9 milisegundos (Todas las fotos de FICT tienen el mismo tiempo de exposición)
5. Seleccionamos AUTOFOCUS para el enfoque automático de la imagen.
6. Se toma la foto (Figura 26)

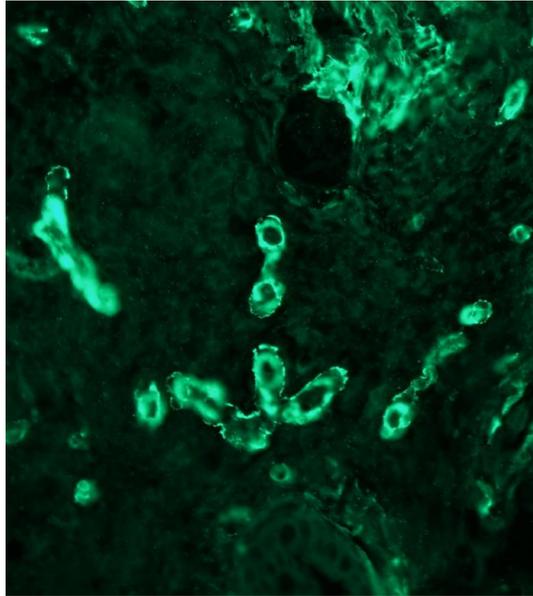


Figura 26. Modo FICT: Núcleos en división.

7. Cambiamos a modo DAPI emite una luz azul que marca todos los núcleos
8. Bajamos el tiempo de exposición.
9. Seleccionamos nuevamente AUTOFOCUS.
10. Se toma la foto (Figura 27)

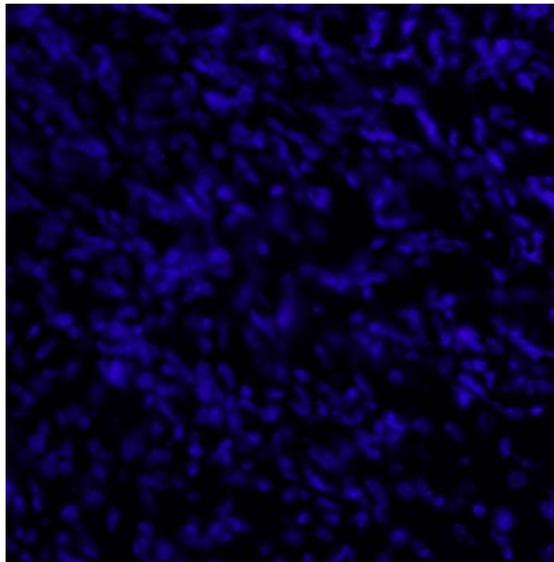


Figura 27. Núcleos de la muestra modo DAPI.

11. Por último combinamos las imágenes para ser analizadas posteriormente y poder correlacionar la distribución de la expresión en las distintas células de la muestra (Figura 28).
12. Guardamos las imágenes en versión *tif*.
13. La cuantificación de la expresión de los distintos anticuerpos se realizó mediante el software *ImageJ* versión 1.49 para Windows.

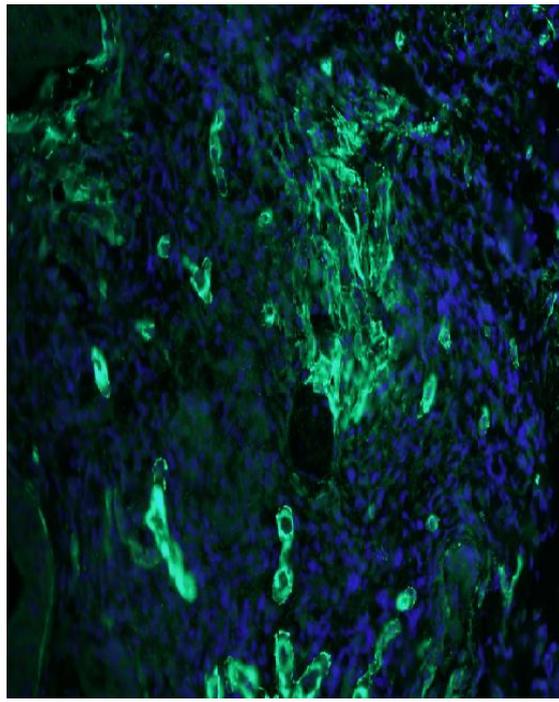


Figura 28. Combinación de ambas lecturas (proteína en estudio y núcleos)

Una vez obtenidos a los valores de expresión de cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos y para facilitar la interpretación de los datos utilizamos la **interpolación lineal de Newton** con la que podemos aproximar un valor de la función $f(x)$ en un valor desconocido de x . Para que una interpolación sea lineal se utiliza un polinomio de interpolación grado 1, que se ajusta a los valores en los puntos x_1 y x_2 .

$$f(x|x_1; x_2) = f(x_1) + \frac{f(x_2) - f(x_1)}{(x_2 - x_1)}(x - x_1)$$

Figura 29. Fórmula de la Interpolación Lineal de Newton.

Una vez aplicada la fórmula introduciendo los valores mínimos y máximos de cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos podemos obtener el valor del 50% y crear para cada uno dos niveles de expresión: Leve (0-50%) y Elevado (51-100%).

3.5 VARIABLES DEL ESTUDIO

- Variable principal
 - Desarrollo tumoral (%): Evidencia durante la vida del animal de experimentación o en la autopsia de un crecimiento tumoral mayor de 1 cm o presencia de metástasis.
- Variables secundarias
 - Determinadas en los animales de experimentación.
 - Tiempo libre de enfermedad (semanas): Tiempo desde el implante del tumor hasta el desarrollo tumoral o hasta la evidencia de ausencia de tumor en la autopsia.
 - Mortalidad (%): Ratones fallecidos de manera espontánea sin intervención de los investigadores.
 - Mortalidad postoperatoria (%): Muerte durante las primeras 24 horas tras la cirugía o en los días consecutivos como consecuencia de un fallo directo de la técnica quirúrgica.
 - Morbilidad (%): Aparición de complicaciones derivadas de la cirugía. Se han incluido infección del sitio quirúrgico, infección intraabdominal o

peritonitis, hemorragia, la sepsis, aparición de ascitis o úlceras, la sobredosis y la dehiscencia de la laparotomía media o subcostal.

- Peso (gr): Peso en gramos de los ratones implantados.
- Histología e inmunohistoquímica de las muestras
 - Grado de diferenciación (%): Determinado con las muestras de hematoxilina-Eosina mediante la observación de la morfología de las glándulas, núcleos celulares tumorales y el número de mitosis (Apartado VI.1). Se dividen en bien diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2), poco diferenciados (G3).
 - Grado de fibrosis (%): Espesor del estroma tumoral determinado mediante la tinción de Tricrómico de Masson (Apartado VI.1), correspondiendo 1 a la mínima fibrosis alrededor de las glándulas tumorales y 4, al grado máximo de fibrosis entre las glándulas tumorales.
 - Grado de proliferación celular (%): Determinado mediante el número de mitosis y la expresión de Ki67 en los ribosomas de los núcleos celulares, clasificada como baja/alta en función del punto de corte 0.184 (Apartado VI.1).
 - Fibrogénesis (%): Expresión de alfa-SMA en fibroblastos y miofibroblastos. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 5.532.(Apartado VI.1)
 - Angiogénesis (%): Expresión de CD31 en las células endoteliales del tumor. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 11.666 (Apartado VI.1)
 - Apoptosis (%): Expresión de TUNEL en las células con ADN fragmentado o degradado. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 0.247 (Apartado VI.1)
- Variables complementarias
 - Determinadas en los pacientes

- Características epidemiológicas: Edad (Años), sexo (Hombre/Mujer), estadio tumoral (Clasificación TNM), anatomía patológica, localización del tumor en el páncreas (Cabeza, cuello y cola), neoadyuvancia (Si/No), metástasis ganglionares (Si/No) e invasión perineural (Si/No).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Realizado bajo la supervisión de la Unidad de Metodología de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío y consistió en:

- Análisis descriptivo para variables cuantitativas mediante el cálculo de la *media* (m) como medida de tendencia central y la *desviación típica* o *standard* (DS) como medida de dispersión; y para las variables cualitativas mediante el cálculo de porcentajes o *proporciones* (%).
- Análisis comparativo entre las distintas variables y la variable independiente desarrollo tumoral mediante el test de Chi-cuadrado en el caso de las variables cualitativas y la Prueba de Mann-Whitney para las variables cuantitativas.
- Se utilizó la fórmula de la Interpolación lineal de Newton para obtener el valor de la función de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos que corresponden al 50% para crear dos rangos de expresión: Bajo y Alto.

En todas las pruebas estadísticas se consideran valores “significativos” aquellos cuyo nivel de confianza es del 95% ($p < 0,05$).

3.7 SOPORTE BIBLIOGRÁFICO E INFORMÁTICO

La búsqueda bibliográfica fue realizada en Junio del 2015 a través de la Base de datos como MEDLINE (National Library of Medicine, NLM), Embase, PubMed y Cochrane Central Register of Controlled Trials. Los términos de búsqueda fueron “Tumorgraft”, “pancreas cancer”, “adenocarcinoma”, “murine model” y “mouse/mice” con posteriores actualizaciones en Junio de 2016 y Marzo de 2017.

Seleccionamos aquellos artículos escritos en Español o en Inglés independientemente del tipo de estudio y de status de publicación.

Los artículos originales fueron obtenidos a través del Servicio de Biblioteca del Hospital Universitario “Virgen del Rocio” de Sevilla y a través de la biblioteca virtual de Sistema Sanitario Público de la Junta de Andalucía.

Los datos referentes al estudio se trataron en un ordenador PC compatible con microprocesador Intel® Pentium Core 2 Duo utilizando el siguiente software:

- Como sistema operativo: Windows 10
- Como procesador de textos: Microsoft® Word 2013
- Como editor de hojas de cálculo: Microsoft® Excel 2013
- Como gestor de base de datos: SPSS® versión 15.0 para Windows
- Como programas estadísticos para tratamiento y análisis posterior de los datos: SPSS® 15.0 para Windows.

3.8 ETICA Y LEGISLACIÓN

Durante el presente trabajo experimental se han tenido en cuenta los principios rectores básicos, de carácter internacional, aplicables a las investigaciones biomédicas con animales. Estas directrices están recogidas en la normativa española Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo, normativa incluida en éste decreto según la directiva 86/609 de la Comunidad Europea para la utilización de animales de experimentación.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

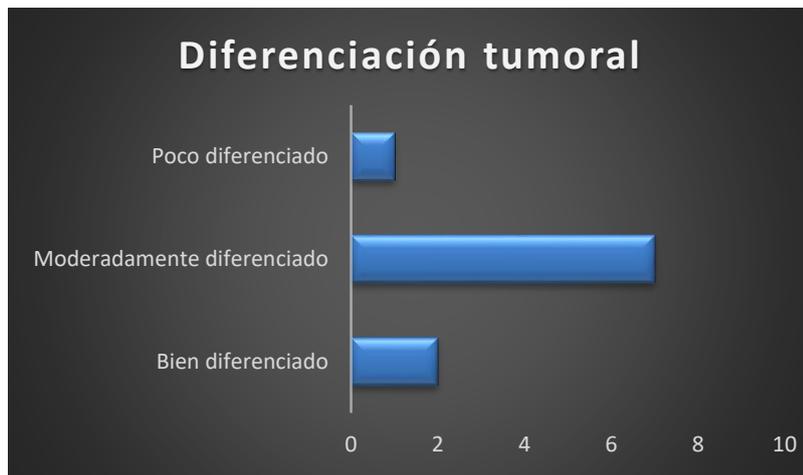
1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS HUMANAS IMPLANTADAS

El estudio de Anatomía Patológica destaca la presencia de 8 adenocarcinomas de páncreas (80%) y 2 ampulomas (20%). Existe invasión perineural en el 30% de los casos.

En la tinción de Hematoxilina-Eosina el grado de diferenciación fue:

- Bien diferenciado: 20% (n=2)
- Moderadamente diferenciado: 70% (n=7)
- Poco diferenciado: 10% (n=1).

Tabla 9. Grados de diferenciación tumoral en la muestra.



En cuanto a la tinción de Masson que identifica la fibrosis del tejido se utilizó una escala desde ausente (grado 0) a muy elevado (grado 5), siendo el grado leve el más frecuente (40%), seguido del grado Moderado (30%), grado elevado (10%) y grado Muy elevado (20%).

Tabla 10. Distribución de los grados de fibrosis definidos según el tricrómico de Masson en cada paciente.



En el estudio inmunohistoquímico la expresión de los distintos marcadores se calculó utilizando la interpolación lineal de Newton aplicada a los valores de expresión obtenidos por el programa *ImageJ*. Para cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos existe un valor mínimo (0% de expresión) y un valor máximo (100% de expresión). Al introducir esos valores en la fórmula de la interpolación podemos obtener a que porcentaje de expresión corresponde cada valor absoluto de la misma obtenido del programa *ImageJ*. En la siguiente tabla presentamos el valor mínimo, máximo y del 50% (punto de corte) para cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos.

Tabla 11. Valores absolutos obtenidos del programa *ImageJ* para cada marcador inmunohistoquímico y los intervalos de los grupos de expresión alta y baja.

	Ki67	AlfaSMA	TUNEL	CD31
Valor mínimo	0.0029	0.144	0.0060	0.1460
Valor máximo	0.3644	10.919	0.4873	23.156
Valor que corresponde al 50%	0.1837	5.532	0.2467	11.666
Bajo	0.0029-0.1837	0.144-5.532	0.0060-0.2467	0.1760-11.666
Alto	0.1838-0.3644	5.533-10.919	0.2468-0.4873	11.667-23.1560

En cuanto a la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos se ha agrupado cada uno de ellos en dos secciones (expresión baja y alta), situándose el punto de corte en el 50% de la expresión de cada uno de ellos. En la tabla 12 aparece la distribución de la muestra en los grupos descritos.

Tabla 12. Distribución en porcentaje de muestra humana de la expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos.

MUESTRA HUMANA	Ki67	ALFA-SMA	TUNEL	CD31
Baja	72.7	36.4	90.9	100
Alta	27.3	63.6	9.1	0

2. ÁRBOL DE IMPLANTES

En la figura 30 se observan todos los implantes realizados . En el pase 0, es decir, tras el implante de las muestras humanas (Hx) en el modelo experimental, desarrollaron tumor 4 ratones (40%). Los 4 injertos tumorales generados reimplantados (Pase 1) se desarrollan todos, el 100% (n=4). A su vez, se volvieron a reimplantar (Pase 2) y volvieron a desarrollaron tumor el 100% de los ratones (n=4). Existen diferencias estadísticamente significativas entre el desarrollo tumoral (%) entre el pase 0 y los pases 1 y 2 con una $p=0.023$. En el total de los implantes realizados hay un índice de desarrollo tumoral del 66.6%.

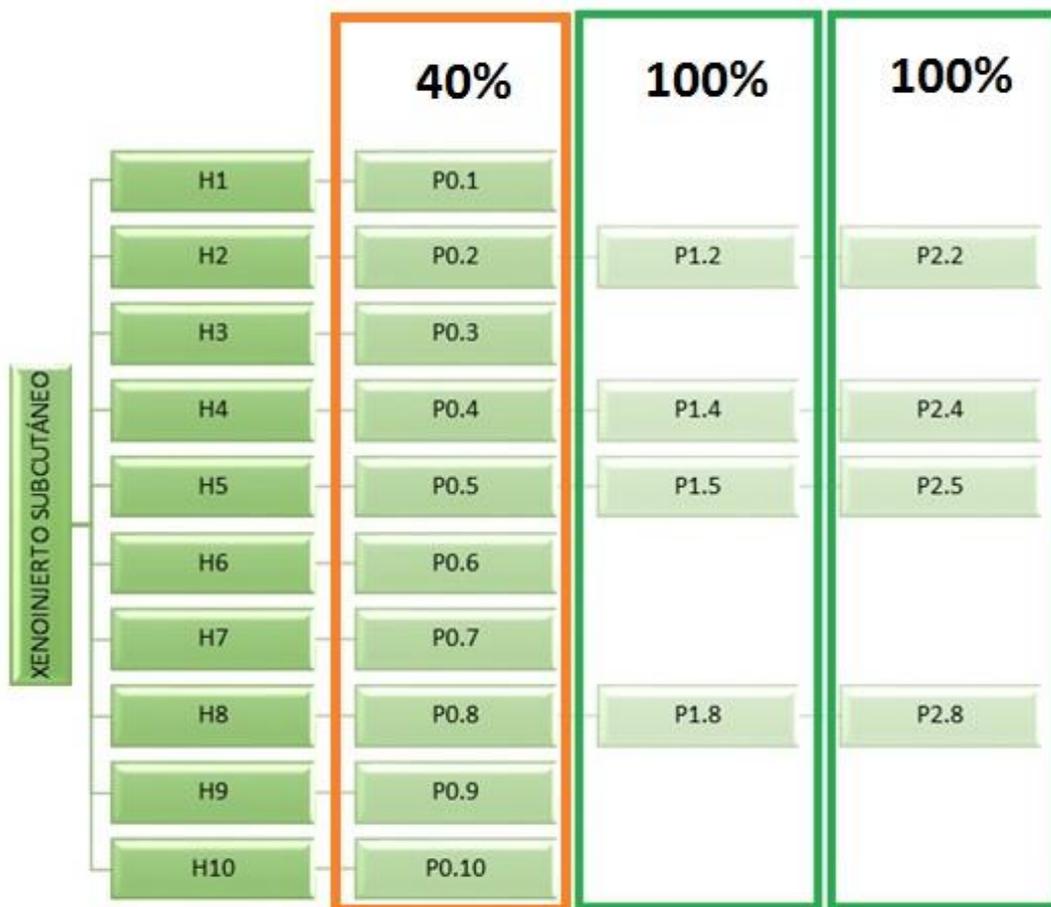


Figura 30. Esquema con el árbol de implantes subcutáneos realizados en el estudio.

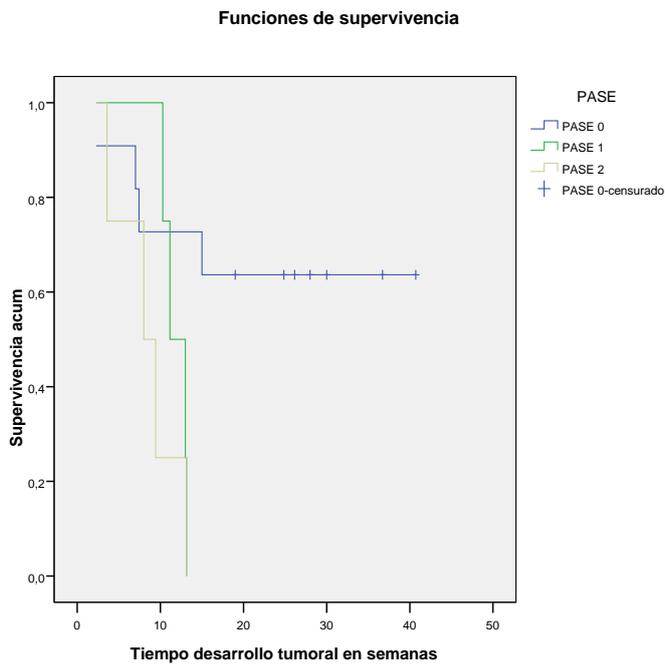
3. EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA EN EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

En este apartado estudiamos las variables de morbimortalidad y la variación del peso del animal de experimentación tras la realización del xenoinjerto lo que nos permite valorar la viabilidad del mismo.

3.1. EFICACIA (SUPERVIVENCIA/MORTALIDAD)

La mortalidad en los ratones durante el pase P0 fue del 10% (n=1), mientras que en los pases 1 (P1) y 2 (P2) fue del 0%. La causa de la muerte del caso en P0 sucedió a los 6 meses del implante por lo que se descartaron problemas de la técnica quirúrgica y no se evidenció en la necropsia ninguna causa que se asocie al procedimiento. Este espécimen tuvo una ganancia del 14.74% del peso inicial.

Se ha realizado una curva de Kaplan Meyer (Figura 31) para estimar el crecimiento tumoral (evento) durante un periodo de tiempo (desde el implante hasta el sacrificio) que es el que consideramos tiempo libre de enfermedad.



PASE		Tiempo (semanas)	Crecimiento tumoral
PASE 0	1	2,286	SI
	2	7,000	SI
	3	7,429	SI
	4	15,000	SI
	5	19,000	NO
	6	24,857	NO
	7	26,143	NO
	8	28,000	NO
	9	30,000	NO
	10	36,714	NO
	11	40,714	NO
PASE 1	1	10,286	SI
	2	11,143	SI
	3	13,000	SI
	4	13,143	SI
PASE 2	1	3,571	SI
	2	8,000	SI
	3	9,429	SI
	4	13,143	SI

Figura 11. Curva de Kaplan-Meier con el tiempo libre de enfermedad en los distintos pases ($p=0.007$)

Se observa en la gráfica como los pases 1 y 2 desarrollan tumor rápidamente (el 100% antes de las 13 semanas) y los animales de experimentación del pase 0, que desarrollan tumor en un 40% lo hacen todos antes de la semana 15 tras el implante ($p=0.007$)

3.2. SEGURIDAD (MORBILIDAD)

Como variables en este grupo hemos valorado la infección del sitio quirúrgico, hemorragia, sepsis, sobredosis de fármaco y dehiscencia de la sutura cutánea. No encontramos ninguna de estas complicaciones en ninguno de los tres pases (P0, P1 y P2). Hay dos casos en los que se produjo una degeneración quística del implante (11.76% del total de ratones implantados) y por tanto no desarrollaron tumor. En un caso se observó una reacción eritrodérmica ulcerativa (5.88%) alrededor de la zona de implante. En este caso si se desarrollo tumor.

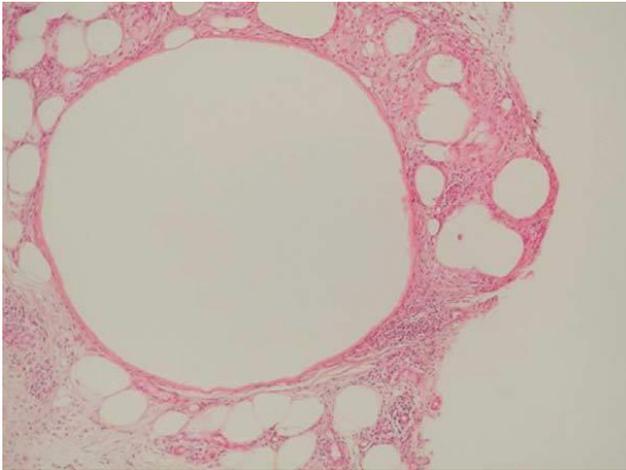


Figura 32. . Anatomía Patológica de la degeneración quística del implante.



Figura 33. Reacción eritrodérmica ulcerativa.

3.3. EVOLUCIÓN DEL PESO

La variable utilizada es el porcentaje de peso ganado o perdido con respecto al peso inicial y con ella se valora el efecto del implante tumoral en el estado general del ratón. Ninguno de los ratones tuvo pérdida de peso. En cuanto al porcentaje de peso ganado hay un rango entre 4.01%-28.16%, siendo la mediana, el P₂₅ y el P₇₅ los que aparecen en la tabla 13 existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el peso inicial y final de los ratones ($p=0.005$). Entre los ratones no se muestran diferencias estadísticamente significativas lo cual puede observarse en el gráfico de la figura 34 donde la tendencia del peso es similar en todos los ratones. ($p=0.234$)

Tabla 13. Estadísticos descriptivos del porcentaje de peso ganado en cada uno de los pases del estudio. ($p=0.005$)

		PORCENTAJE_PESO GANADO				
		Mediana	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 75
PASE	P0	11,08	4,01	27,42	10,11	14,74
	P1	17,66	15,79	28,16	16,10	23,54
	P2	17,55	8,01	19,84	8,01	19,84

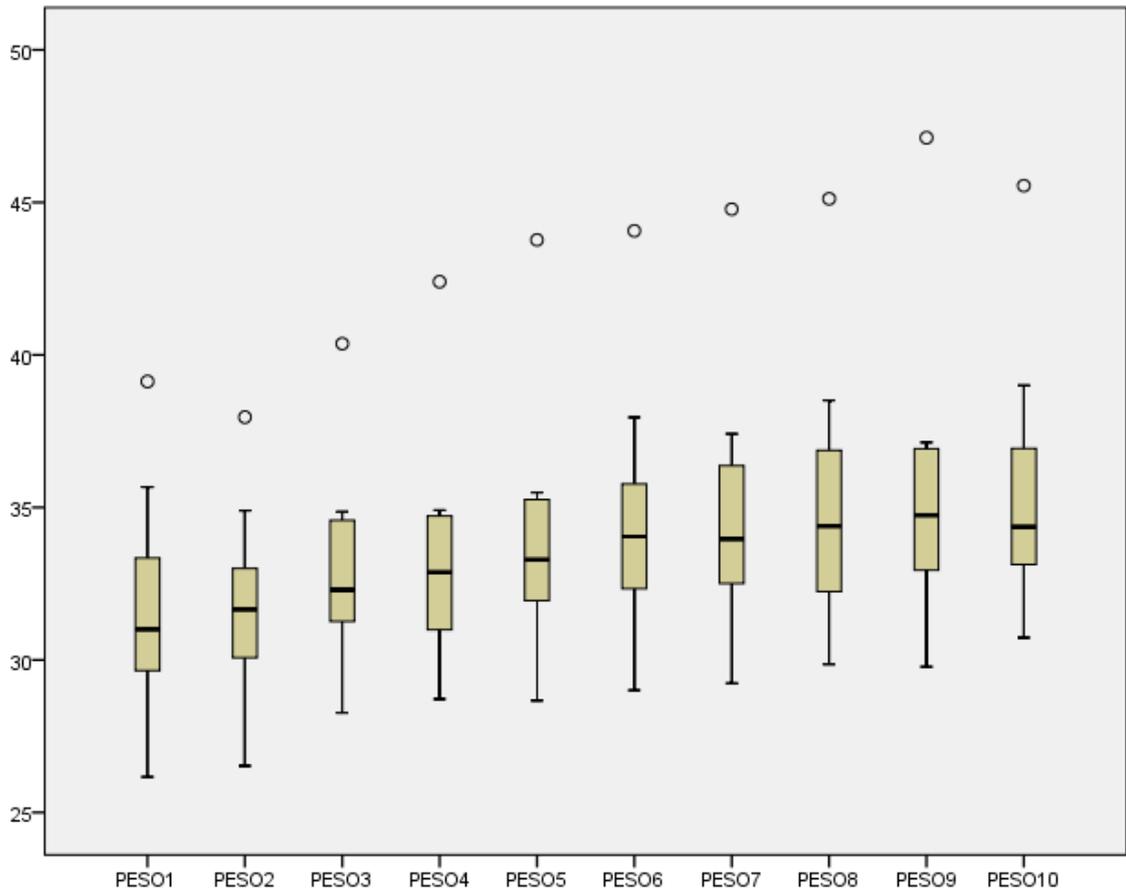


Figura 34. Evolución del peso de los animales de experimentación incluidos en el estudio ($p=0.234$)

4. EVOLUCIÓN PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICO

4.1. Hematoxilina-eosina

En cuanto a la diferenciación histológica de las muestras obtenidas de los distintos pases, hemos obtenido los siguientes resultados:

Tabla 14. Distribución en porcentajes del grado de diferenciación en los diferentes pases realizados.

Tinción H.-E.	H	P0	P1	P2
Poco diferenciado	10	50	50	100
Moderadamente y bien diferenciado	90	50	50	0

Se observa en la tabla que se produce una desdiferenciación conforme se suceden los distintos pases. Inicialmente en las muestras humanas se trata de un tumor bien diferenciado. En el implante P0 y P1 se igualan con un 50% de muestras poco diferenciadas y un 50% bien diferenciadas ($p=0.292$). Finalmente en el segundo pase (P2) el 100% de la muestra presenta poca diferenciación ($p=0.002$)

4.2. Masson

En la siguiente tabla se representa la distribución porcentual de los distintos grados de fibrosis en los diferentes pases.

Tabla 15. Distribución en porcentaje del grado de fibrosis en los diferentes pases realizados.

Masson	H	P0	P1	P2
Leve	40	50	75	50
Moderado	30	50	25	50
Elevado	30	0	0	0

En la tabla 15 observamos que la tendencia de las muestras en los sucesivos pases es a la pérdida de fibrosis siendo en el pase 2 el 100% de las muestras una fibrosis moderada o leve ($p=0.026$). En las muestra originales un 30% tenían una fibrosis elevada. La relación entre las muestras humanas y los sucesivos pases presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la fibrosis ($p=0,026$ entre H y P0/2 y $p=0.04$ entre H y P1)

5. EVOLUCIÓN PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Se ha utilizado la fórmula de la interpolación lineal en cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos en los diferentes pases. Identificamos el valor que corresponde al 50% de la expresión y se divide en dos grupos (expresión baja y alta). Cada epígrafe presenta dos gráficos, uno de ellos es una tabla en la que se presentan los porcentajes de expresión de cada marcador en cada pase y en segundo lugar un gráfico con la tendencia de esa expresión en cada pase.

5.1. Ki-67

Se puede observar en las siguientes gráficas como la expresión del Ki67 varía en los sucesivos pases. Inicialmente en las muestras humanas la expresión baja es predominante (72.7% de la muestra) lo cual se mantiene a lo largo de los pases. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el humano y los pases sucesivos ($p=0.459$)

Tabla 16. Distribución en porcentaje en los distintos pases del marcador inmunohistoquímico Ki-67.

KI-67	H	P0	P1	P2
Baja	72.7	100	75	100
Alta	27.3	0	25	0

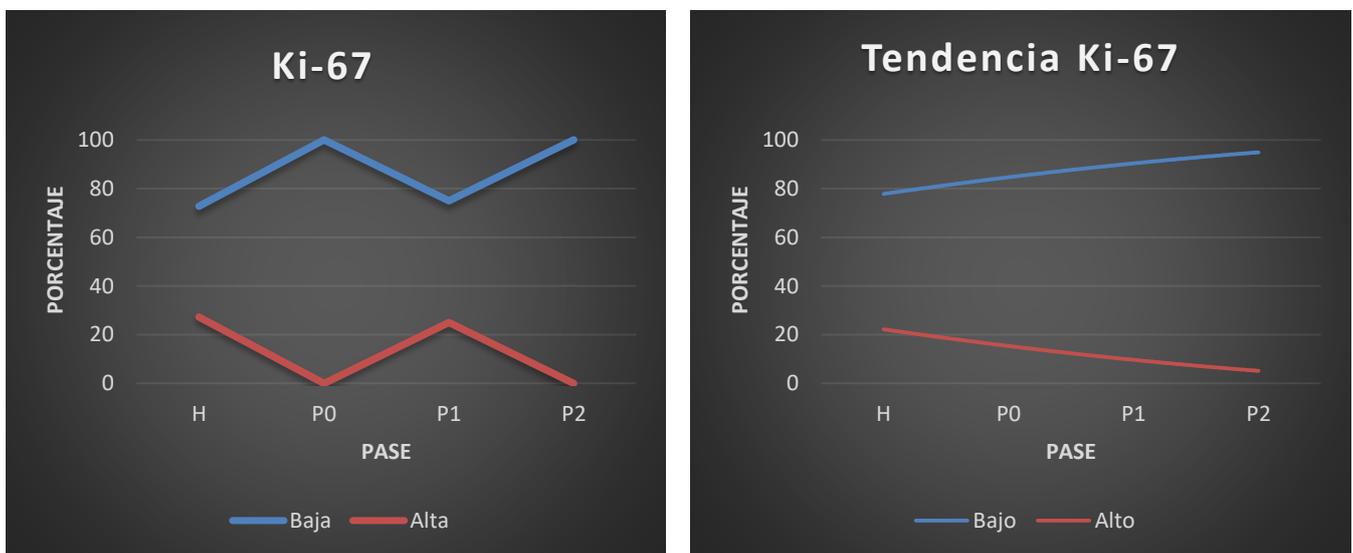


Figura 35. Gráficos donde se muestra la evolución lineal en los distintos pases de la expresión del marcador inmunohistoquímico Ki-67

5.2. Alfa-SMA

La tendencia de este marcador de fibrosis que inicialmente en la muestra humana es alta en el 63.6% de los casos es a disminuir en los sucesivos pases hasta hacerse baja en el pase 2 en el 100% de las muestras. En la comparación Humano-Pase 0 la $p=0.185$, en el Humano-Pase 1 es $p=0.029$ y en el Humano-Pase 2 la $p=0.029$, por tanto hay diferencias estadísticamente significativas entre los pases 1 y 2 con respecto al humano en cuanto a la fibrosis presente en la muestra. Estos resultados concuerdan con las tinciones específicas de fibrosis que ya se han comentado previamente.

Tabla 17. Distribución en porcentaje en los distintos pases del marcador inmunohistoquímico Alfa-SMA.

Alfa-SMA	H	P0	P1	P2
Baja	36.4	75	100	100
Alta	63.6	25	0	0

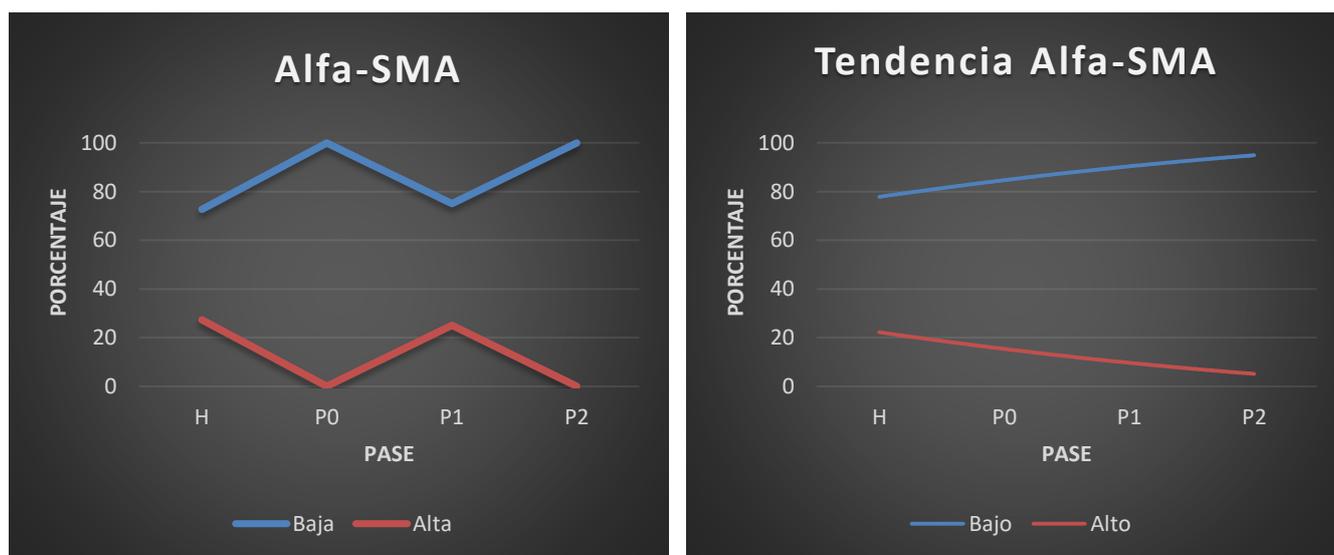


Figura 36. Gráficos donde se muestra la evolución lineal en los distintos pases de la expresión del marcador inmunohistoquímico Alfa-SMA.

5.3. TUNEL

Se puede observar como la tendencia de este marcador de apoptosis celular que inicialmente tiene una expresión baja en el humano (90.9% de la muestra), aumenta ligeramente en el pase 0 pero vuelve a ser mayoritariamente baja en los pases 1 y 2 (100% de la muestra). No existen diferencias estadísticamente significativas entre expresión de TUNEL en la muestra humana con respecto a los Pases 0, 1 y 2 ($p=0.551$)

Tabla 18. Distribución en porcentaje en los distintos pases del marcador inmunohistoquímico TUNEL.

TUNEL	H	P0	P1	P2
Baja	90.9	75	100	100
Alta	9.1	25	0	0

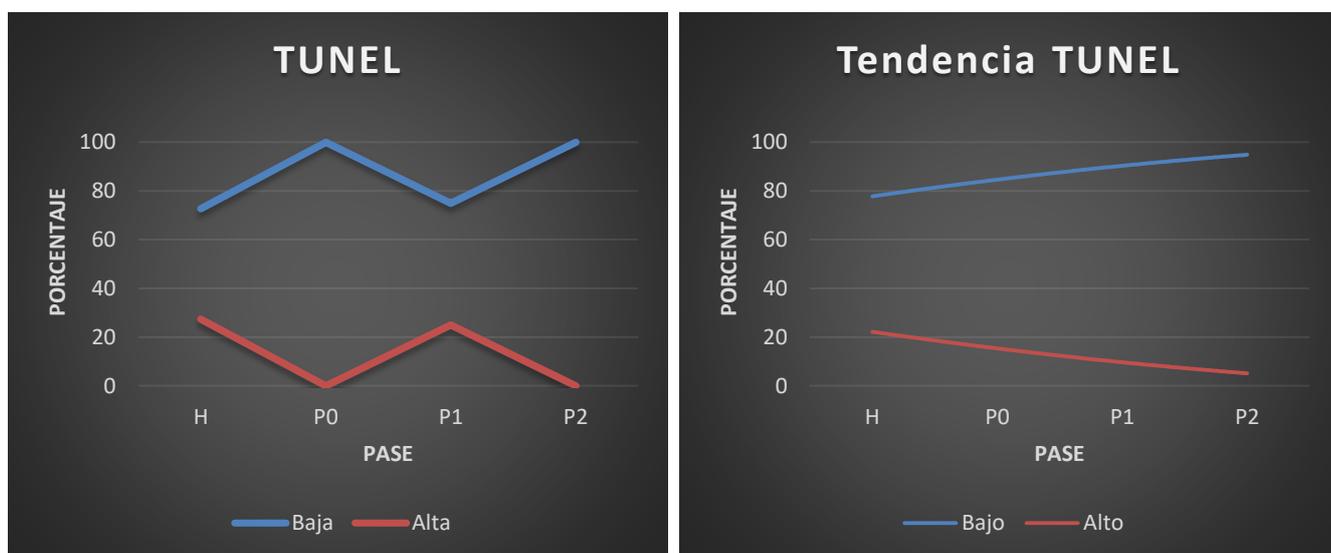


Figura 37. Gráfico donde se muestra la evolución lineal en los distintos pases de la expresión del marcador inmunohistoquímico TUNEL.

5.4. CD31

La expresión del CD31 en las muestras humanas es baja (100% de la muestra), se mantiene estable en P0 y posteriormente desciende ligeramente al 75% en los Pases 1 y 2. No son diferencias estadísticamente significativas ($p=0.25$)

Tabla 19. Distribución en porcentaje en los distintos pases del marcador inmunohistoquímico CD31.

CD31	H	P0	P1	P2
Baja	100	100	75	75
Alta	0	0	25	25

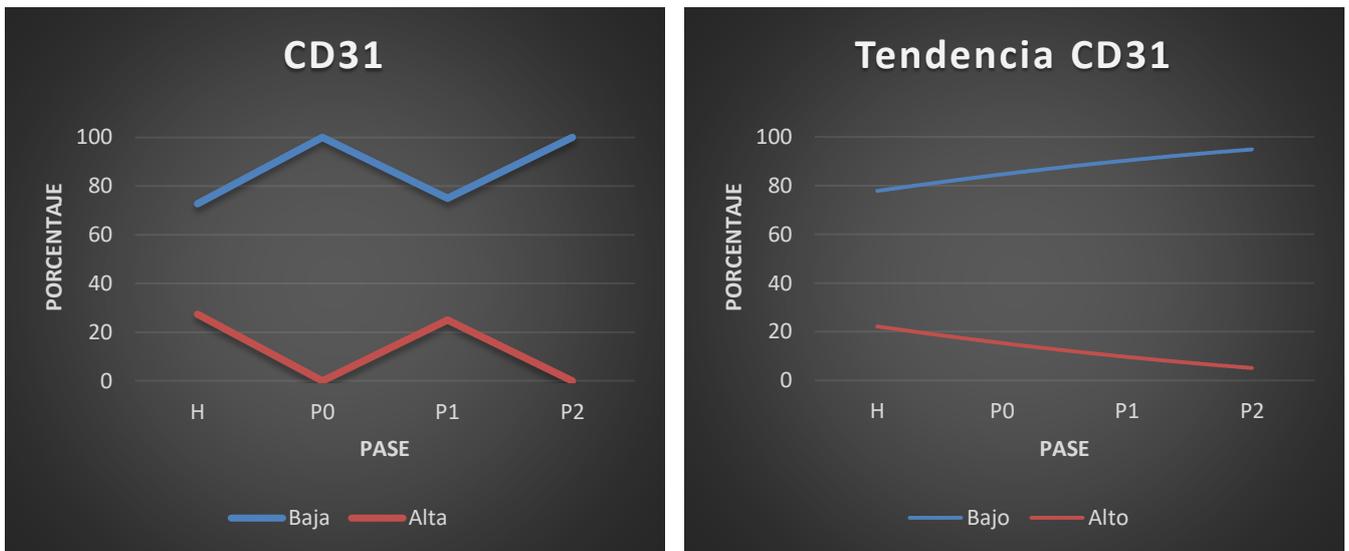


Figura 38. Gráfico donde se muestra la evolución lineal en los distintos pases de la expresión del marcador inmunohistoquímico. CD31.

6. COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS SEGÚN DESARROLLO TUMORAL

Durante el desarrollo del experimento para validar el modelo experimental de tumor periampular observamos que algunos implantes desarrollan tumor y otros no lo hacen. Nos preguntamos si algunas de las características fenotípicas estudiadas influyen en el desarrollo tumoral y por tanto hemos comparado las distintas variables con respecto al desarrollo tumoral para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 20. Contraste de hipótesis de variables cualitativas y cuantitativas con respecto al desarrollo tumoral en el animal de experimentación.

Variable Cualitativa	Prueba Chi-cuadrado (Estadístico exacto de Fisher)
Invasión perineural	p=1.000
Localización tumor	p=0.353
M1 en humano	p=1.000
QT Neoadyuvante	p=0.515
Estirpe tumoral	p=0.034

Variable Cuantitativa	Prueba de U de Mann-Whitney
Edad	p=0.609
Nº mitosis	p=0.032
Masson	p=0.294
Ki-67	p=0.533
Alfa-SMA	p=0.396
TUNEL	p=0.193
CD31	p=0.281
Porcentaje de peso	p=0.228

Las variables que presentan diferencias estadísticamente significativas son:

- **ESTIRPE TUMORAL:** Los tumores periampulares que pertenecían a la estirpe histológica de los ampulomas desarrollaron tumor en el 100% de los casos implantados por lo que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al tipo histológico adenocarcinoma que desarrolló tumor en un 40% ($p=0.034$).
- **NÚMERO DE MITOSIS:** Las muestras tumorales que presentan en el estudio histológico un mayor número de mitosis por CGA favorecen el desarrollo tumoral del implante ($p=0.032$).

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación nace por la relevancia que los tumores periampulares han adquirido en la actualidad debido a que su incidencia aumenta cada año y los resultados de los tratamientos existentes, en cuanto a supervivencia, son deficientes.

En el caso del adenocarcinoma de páncreas, el más frecuente de los tumores periampulares, la tasa de mortalidad a los 5 años es cercana al 100%, con una tasa de supervivencia a los 5 años inferior al 5%. A nivel mundial es la octava causa de muerte por cáncer, unas 250.000 muertes por año y la cuarta causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos con una incidencia aproximadamente de 30.000 muertes cada año.[5-6]

El resto de los tumores periampulares (ampuloma, colangiocarcinoma distal y tumores duodenales) son menos frecuentes, presentan índices de resecabilidad y tasas de supervivencia mayores (entre el 20-40% de supervivencia a los 5 años según las series) [1-2].

Como es coincidente en toda la literatura, la cirugía es la única opción curativa en los tumores periampulares, que presentan una tasa de resecabilidad variable según el tipo histológico siendo la más baja la del ADCP (en torno al 20%). Los tratamientos realizados con quimioterapia adyuvante y neoadyuvante no han conseguido mejorar significativamente los resultados de supervivencia. [1]

Por todo lo comentado, es imprescindible continuar la investigación con el objetivo de desarrollar tratamientos personalizados para cada paciente y que mejoren los resultados globales. Nuestro estudio está dirigido a validar un modelo de experimentación animal que reproduzca lo más fielmente posible un tumor periampular procedente de un sujeto humano. Esta tesis forma parte de una línea de investigación más ambiciosa que pretende usar este modelo para la investigación de nuevos fármacos que mejoren el pronóstico de los tumores periampulares.

1. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

Las cuatro fases en las que se ha dividido el estudio (pre-experimental, clínica, experimentación animal y recogida e interpretación de datos) responden a la necesidad de organizar el estudio a partir de la hipótesis de trabajo, los objetivos que pretendemos conseguir y la estandarización del método utilizado para que pueda ser fácilmente reproducible por otros investigadores.

1.1. Animal utilizado en el modelo

El animal sobre el que basamos el modelo experimental es el ratón desnudo (*Mus musculus* y la cepa Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}), que por sus características inmunológicas permiten el crecimiento del injerto de tejido tumoral humano sin probabilidad de rechazo. Todos los ratones son machos para evitar la interferencia del crecimiento tumoral con los ciclos hormonales femeninos.

La mutación nu fue descubierta en 1962 por el Dr. N. R. Grist en una población exogámica cerrada de ratones albinos en el Laboratorio de Virus del Hospital Ruchill, Glasgow, Escocia pero no fue publicado hasta 1968 por S. Flanagan [76]. Este modelo de ratones desnudos atímicos se mantiene como una colonia aislada y dada sus características especiales son adecuados para su uso en oncología, inmunología, y otros campos de la investigación biomédica.

Debido a que carecen de un timo, no pueden generar linfocitos T maduros. Por lo tanto no son capaces de producir respuestas inmunitarias adaptativas, incluyendo:

- Formación de anticuerpos que requieren colaboración de células T helper CD4+
- Respuestas inmunes mediadas por células , que requieren las células T CD4 + y / o CD8 +
 - Respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (requieren células T CD4 +)
 - Destrucción de células infectadas por virus o células malignas (requiere linfocitos T CD8 + citotóxicos)
 - Rechazo de injerto (requiere tanto las células T CD4 + y CD8 +)

Gracias a las características descritas, los ratones desnudos han servido para obtener información sobre el sistema inmunológico, leucemias, tumores sólidos, SIDA y otras formas de deficiencia inmune, así como la lepra. Por otra parte, la ausencia de funcionamiento de las células T impide a los ratones desnudos rechazar aloinjertos y xenoinjertos [77], particularidad que hemos empleado en este estudio. Además de la ventaja inmunológica este tipo de animal es barato en cuanto a la adquisición de los mismos y su mantenimiento lo cual también favorece su elección para este estudio y para futuras líneas de investigación.

Algunas características del animal elegido para este modelo experimental, como son el bajo peso y el pequeño tamaño del mismo, nos genera una serie de limitaciones en cuanto a la técnica de implante. Las dosis de fármacos anestésicos deben estar muy bien ajustadas al peso del animal y el instrumental utilizado debe cumplir unos requisitos específicos para evitar complicaciones durante el implante y en el periodo postimplante.

Una vez realizado el implante, la revisión de los animales se realiza cada semana y evaluamos el peso del espécimen, la situación de la herida quirúrgica y sus posibles

complicaciones así como el crecimiento del implante tumoral que al ser subcutáneo se observa sin dificultad.

1.2. El modelo de xenoinjerto subcutáneo

La localización que hemos elegido para nuestro modelo experimental es la subcutánea debido a sus potenciales ventajas: escasa morbilidad quirúrgica, fácil observación del crecimiento tumoral y de la toma de muestras, con poco impacto en la calidad de vida del animal de experimentación. A pesar de todas estas ventajas nuestro modelo experimental presenta una serie de limitaciones que hemos identificado y son las siguientes:

- No se ha realizado un estudio anatomopatológico a las muestras obtenidas macroscópicamente por el cirujano antes de ser implantadas en el animal de experimentación, por lo que cabe la posibilidad de que no se haya implantado tejido tumoral y sea la causa de la ausencia de crecimiento.
- No existen estudios previos en la bibliografía sobre la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos que hemos utilizado (Ki67, Alfa-SMA, TUNEL y CD31) en los tumores periampulares y por tanto no tenemos referencias estadísticas sobre su expresión. Para corregir este defecto hemos utilizado la fórmula matemática de la interpolación para obtener los valores absolutos que corresponden a un porcentaje deseado. Hemos seleccionado de forma arbitraria el 50% como punto de corte para definir dos grupos (expresión baja o alta). Este hecho condiciona a que los datos

obtenidos en el estudio no sean extrapolables al conjunto de la población y solo podemos utilizarlos para realizar comparaciones intramuestrales y ofrecer los primeros datos sobre la expresión de estos marcadores en los tumores periampulares.

- La técnica de implantación ha sido desarrollada por los investigadores de este proyecto y por tanto durante la realización del mismo han desarrollado su curva de aprendizaje lo cual podría haber afectado tanto a la morbimortalidad de los especímenes como al correcto implante de la muestra tumoral.

La ventaja fundamental que presenta nuestro estudio con respecto a los que existen en la literatura en los que se induce un cáncer de páncreas al ratón mediante tóxicos [51-59], es que el origen de la muestra tumoral es un sujeto humano que voluntariamente ha decidido donarnos parte de su tejido tumoral. Por tanto, se trata de un tumor de origen humano, con genes, mutaciones y receptores celulares humanos, al cual le permitimos crecer y desarrollarse en el animal de experimentación. Cualquier terapia que utilicemos en nuestro modelo animal en un futuro es más fácil de extrapolar a la actividad clínica que en el caso de los tumores pancreáticos que se generan en el animal de experimentación mediante tóxicos.

Una vez obtenidos los resultados en las curvas de Kaplan-Meier para el crecimiento tumoral, hemos observado que el periodo de 6 meses para observar si existe crecimiento tumoral es excesivo. El 100% de la muestra había desarrollado tumor entre la semana 13 (Pase 0) y 15 (Pases 1 y 2). Este dato puede ser útil en estudios futuros para la adecuada gestión de los recursos.

Con respecto a la técnica de realización del implante es fundamental la realización de la misma en condiciones de esterilidad quirúrgica y bajo la campana de flujo laminar para evitar contaminación del ratón ya que como se ha comentado es inmunodeprimido. No se ha utilizado profilaxis antibiótica en ninguna intervención. En cuanto a los fármacos que mantendrán la analgesia y sedación durante la intervención quirúrgica: ketamina (80 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y un neuroléptico (droperidol, 100 mg/kg). Hay que destacar que la acción sedante e hipnótica del droperidol es débil, pero como neuroléptico suprime los movimientos anormales manteniendo los reflejos medulares. El efecto anestésico suele durar 1 h aproximadamente durante el cual se realiza el implante. La incisión se realiza en el dorso del ratón para evitar que pueda morder la sutura y lesionarse.

Algunas muestras se conservan en el Biobanco con el objeto de poder ser utilizadas en el futuro en otros proyectos de investigación, así como guardar las muestras analizadas en el presente proyecto de investigación.

1.3. Parámetros anatomopatológicos e inmunohistoquímicos analizados

Los análisis histológicos tienen una finalidad en nuestro estudio según el tipo de tinción utilizada. La hematoxilina-eosina nos permite realizar el estudio histológico básico: comprobar la estirpe histológica del tumor perimpular y su grado de diferenciación. La tinción de Masson nos cuantifica el grado global de tejido conjuntivo y fibrosis que existe en la muestra.

Por otro lado las tinciones inmunohistoquímicas utilizan unos anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente que se fijan a unos receptores diana específicos que en nuestro caso son:

- Ki67: Marcador de proliferación celular del tumor.
- TUNNEL: Marcador de muerte celular programada o apoptosis.
- CD31: Marcador de angiogénesis.
- α -SMA: Marcador de fibrosis estromal.

Este conjunto de marcadores inmunohistoquímicos nos crea un perfil tumoral completo en el que podemos valorar características fundamentales de los mismos y que pueden ser diana en un futuro de agentes terapéuticos.

2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En cuanto a los resultados obtenidos tenemos que destacar que aproximadamente el 66% de los injertos totales son viables y crecen en el ratón receptor. En el estudio de Perez M et al [78] se utiliza un modelo experimental in vivo con el implante de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal procedentes de humanos en el hígado del ratón (xenoinjerto ortotópico) en el que la tasa de desarrollo tumoral es del 40%. Debemos matizar que según el pase en el que nos encontremos hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto al desarrollo tumoral, obteniéndose tumor en el pase 0 en el 40% de los injertos y en el pase 1 y 2 en el 100%. Esta diferencia en el porcentaje de desarrollo tumoral puede deberse a dos motivos:

- Las muestras originales son extraídas por los cirujanos de forma macroscópica. En algunas de las muestras puede que no exista tumor ya que las que crecen en el primer pase siempre desarrollan tumor en los siguientes y no se realizó comprobación anatomopatológica de los implantes tumorales obtenidos del humano.
- Puede que exista una selección de los tumores más agresivos o que proliferan mejor en el primer pase, descartándose aquellos con crecimiento lento o ausencia de este.

Las muestras humanas implantadas presentan las características habituales descritas en la literatura de los tumores periampulares. El paciente presenta una edad media de 70 años, el lugar más frecuente donde asienta el tumor es la cabeza pancreática (son los que se diagnostican más precozmente ya que producen

sintomatología más llamativa como ictericia o colangitis) seguido de los tumores ampulares. No tenemos casos en nuestra serie de tumores duodenales o de vía biliar distal.

El estadio más frecuente en el caso de los adenocarcinoma de páncreas (80% de la muestra) según el TNM es el estadio II y ello se debe a que las neoplasias con estadios avanzados suelen ser inoperables.

El tratamiento con quimioterapia neoadyuvante solo se administró en un paciente ya que presenta una eficacia controvertida y escasa mejora de la supervivencia. Un 60% de los pacientes recibieron adyuvancia con distintas combinaciones de fármacos o en monoterapia. La mediana de supervivencia de los pacientes de nuestra serie fue de 1.25 \pm 0.46 años y el 100% han sido éxitos lo cual nos confirma la agresividad y mal pronóstico que presentan este tipo de neoplasias.

El tiempo de desarrollo tumoral en el ratón tuvo diferencias significativas en los pases sucesivos. Se puede observar a partir de la curva de Kaplan-Meyer realizada que en el pase 0 el 40% de la muestra que desarrolla tumor lo hace antes de la semana 15. Este dato se puede utilizar en el futuro de este tipo de estudios para determinar el tiempo de seguimiento de los animales con injerto. En los sucesivos pases (P1 y P2) El 100% de los tumores se desarrollan antes de las 15 semanas.

En cuanto al estudio anátomo-patológico se observa como son tumores moderadamente o bien diferenciados, en su mayoría con escasa fibrosis y escaso n° de mitosis. A pesar de estas características, poco agresivas a priori, son tumores de mal pronóstico como hemos podido comprobar en nuestros datos epidemiológicos.

En el estudio inmunohistoquímico de las muestras humanas observamos como la expresión del marcador de proliferación ki67 es leve y existe elevada fibrosis

cuantificada mediante alfa-SMA, lo cual no concuerda con la tinción anatomopatológica del Masson. La apoptosis celular y la neoangiogénesis, cuantificada mediante TUNEL y CD31 respectivamente, es leve. En resumen podemos definirlo como un grupo de tumores bien diferenciados con escasa proliferación, moderada fibrosis y un índice de apoptosis leve.

En cuanto a los resultados de la técnica de implantación del tumor podemos afirmar que es segura con un escaso índice de morbimortalidad que se corresponde con la curva de aprendizaje de los investigadores que la realizan. Un vez que la curva de aprendizaje se ha completado los índices de morbimortalidad son muy próximos a cero. La evolución del peso de los ratones fue satisfactoria y el 100% tuvo una ganancia ponderal significativa lo cual nos hace pensar que ni la técnica quirúrgica ni el hecho de injertar una lesión tumoral supone un impedimento para la correcta supervivencia del animal de experimentación.

La evolución de los parámetros anatomopatológicos entre los distintos pases nos permite comprobar si los injertos tumorales sufren cambios significativos en su estructura y marcadores. Se observa que los tumores implantados tienden mantenerse estables en cuanto al grado de fibrosis. Por otro lado, se observa una desdiferenciación en los sucesivos pases que no es estadísticamente significativa hasta el pase 2, lo cuál puede ser debido al pequeño tamaño de la muestra (n). Este hallazgo puede resultarnos útil para generar tumores más agresivos donde experimentar nuestros futuros fármacos citostáticos.

El índice proliferativo Ki67 tiende a mantenerse estable con ligero descenso en su expresión hasta ser leve en el 100% del pase 2 sin presentar diferencias estadísticamente significativas. La fibrosis medida mediante la expresión del alfa-

SMA tiende a disminuir en los sucesivos pases de forma estadísticamente significativa, lo cual no coincide con la tinción de tricrómico de Masson ya comentada previamente en la que la fibrosis se mantiene en los distintos pases. La causa de este hallazgo puede radicar en que la tinción de Masson es una graduación subjetiva del examinador y destaca tanto la fibrosis como el tejido conjuntivo. Por otro lado el Alfa-SMA es una proteína cuya expresión puede cuantificarse de forma objetiva y valora la cantidad de tejido conjuntivo exclusivamente.

La expresión del marcador de apoptosis (TUNEL) se mantiene estable en los distintos pases y el de neoangiogénesis (CD31) presenta un ligero aumento en los pases 1 y 2. Estos dos últimos marcadores no presentan diferencias estadísticamente significativas en los sucesivos pases.

Por tanto tras el estudio anatomopatológico básico y de inmunohistoquímica podemos afirmar que el injerto tumoral se mantiene estable en los distintos pases y el único cambio estadísticamente significativo es una disminución en la cantidad de tejido conjuntivo. Esta disminución del tejido conjuntivo puede deberse a que extraemos el tumor de su nicho y por tanto la señales moleculares que favorecen la reacción desmoplásica en el tejido pancreático de origen, característica de los ADCP, se ve interrumpida.

Hemos analizado las características fenotípicas de los xenoinjertos y su relación con desarrollo tumoral. Existen dos variables en las que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas y que por tanto pueden influir en el desarrollo de tumor en el animal de experimentación: la estirpe tumoral y el número de mitosis.

En cuanto a la estirpe tumoral, los tumores ampulares han tenido un índice de desarrollo tumoral mucho mayor que los ADCP, lo cual puede deberse a las

características propias de estos últimos que son tumores bien diferenciados con escaso índice de proliferación. El número de mitosis también se relaciona con el desarrollo tumoral ya que nos indica una mayor índice de proliferación.

Este proyecto para validar un modelo experimental de xenoinjerto subcutáneo de tumores periampulares tiene el objetivo de ser en el futuro la base de múltiples líneas de investigación para el tratamiento de dichos tumores. Hemos observado que no existen cambios significativos en las características histopatológicas e inmunohistoquímicas del tumor por lo que es un buen modelo para iniciar estas líneas de investigación que nuestro grupo está desarrollando como se puede comprobar en Perez et al [78]. En este estudio se comenzó a utilizar un modelo experimental similar al que proponemos en este estudio, utilizando un xenoinjerto ortotópico de metástasis hepáticas humanas de cáncer colorrectal en ratones desnudos con un índice de desarrollo fue del 40%. Con el desarrollo de nuestro modelo experimental y la técnica quirúrgica hemos llegado a conseguir un índice de desarrollo del 66% y demostramos que no hay diferencias entre los sucesivos pases.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- El implante subcutáneo del xenoinjerto de carcinoma periampular ha demostrado ser eficaz y seguro, con una tasa de desarrollo del implante del 66.6%.
- Las variables fenotípicas del injerto que favorecen el desarrollo tumoral son el elevado número de mitosis y la estirpe tumoral.
- En el análisis histopatológico del implante subcutáneo de xenoinjerto de carcinoma periampular hay una tendencia a la dediferenciación tumoral a lo largo de los pases.
- El análisis inmunohistoquímico del implante subcutáneo de xenoinjerto de carcinoma periampular presenta un aumento en la expresión del marcador alfa-SMA (fibrosis) a lo largo de los pases. No se encontraron diferencias en la expresión de los marcadores Ki67, TUNEL y CD31.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferraro A y Ferraina P. Tumores periampulares en Galindo F: Cirugía digestiva 2009; IV-482, pág. 1-20.
2. Pozzo-Salvatierra BL y Kimura-Fujikami K. Tumores periampulares. Anales de Radiología México 2013;2:95-104
3. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. Ann Oncology 2014; European mortality prediction for the year 2014. Ann Oncol 2014;25:1650-6.
4. Khosravi Shahi P, Díaz Muñoz de la Espada VM. Adenocarcinoma de páncreas: actualizaciones terapéuticas. An Med Interna 2005;22:390-4.
5. Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link KH. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. World J Surg 2003;27:1075-84.
6. Lowenfels A, Maisonneuve P. Pancreatic cancer: development of a unifying etiologic concept. Ann N Y Acad Sci 1999;880:191-200.
7. Van Cutsem E, Haustermans K, Van Steenberghe W. New treatment possibilities for pancreatic and biliary tumours. Ann Oncol 2000;11:165-9.
8. Brand RE, Lynch HT. Genotype/Phenotype of familial pancreatic cancer. Endocrinol Metab Clin North Am 2006;35:405-15.
9. Boffetta P, Aagnes B, Weiderpass E, Andersen A. Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs. Int J Cancer 2005;114:992-5.
10. Duell EJ. Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. Mol Carcinog 2012;51:40-52.
11. Mancuso TF, el-Attar AA. Cohort study of workers exposed to betanaphthylamine and benzidine. J Occup Med 1967;9:277-85.
12. Gallus S, Lugo A, La Vecchia C, Boffetta P, Chaloupka FJ, Colombo P, et al. Pricing policies and control of tobacco in Europe (PPACTE) project: cross-

- national comparison of smoking prevalence In 18 European countries. *Eur J Cancer Prev* 2014;23:177–185.
13. Hidalgo-Pascual M, Ferrero-Herrero E, Castillo-Fé MJ, Guadarrama-González FJ, Peláez-Torres P, Botella-Ballesteros F. Epidemiology and diagnosis of the pancreatic cancer. *Rev Esp Enfer Dig* 2004;96:714-22.
 14. Gold EB, Goldin SB. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7:67-91.
 15. Lowenfels AB, Maisonneuve P. “Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer”. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:197-209.
 16. Chang KJ, Parasher G, Christie C, Largent J, Anton-Culver H. Risk of Pancreatic Cancer, Disparity Between African Americans and Other Race/Ethnic Groups. *Cancer* 2005;103:349-57.
 17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5-29.
 18. Bajetta E, Di-Bartolomeo M, Stani SC, Artale S, Ricci SB, Bozzetti F, et al. Chemoradiotherapy as preoperative treatment in locally advanced unresectable pancreatic cancer patients: results of a feasibility study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:285-9.
 19. Mallinson CN, Rake MO, Cocking JB, Fox CA, Cwynarski MT, Diffey BL, et al. Chemotherapy in pancreatic cancer: results of a controlled, prospective, randomised, multicentre trial. *Br Med J* 1980;281:1589-91.
 20. Glimelius B, Hoffman K, Sjoden PO, Jacobsson G, Sellstrom H, Enander LK, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 1996;7:593-600.
 21. Geneser F: *Histología*. 3ª edición. Ed Médica Panamericana. 2000. Madrid.

22. Klatt EC: *Robbins y Cotran. Atlas de Anatomía Patológica*. 1ª edición. Elsevier España. 2007. Madrid.
23. Mayer RJ: *Cáncer de Páncreas*. En: Kasper DL, Barunwald E, Fauci AS, et al: *Harrison. Principios de Medicina Interna*. 16ª edición. Mc Graw Hill. 2006. Mexico DF.
24. García-Borobia F, Fabregat-Proas J: *Adenocarcinoma de páncreas y del área periampular*. En: Parrilla-Paricio P y Landa-García JI: *Cirugía AEC*. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. 2010. Madrid.
25. Steer ML: *Páncreas exocrino*. En: Courtney M. Townsend, Daniel Beuchamp R, Mark Evers B, Kenneth L Mattox: *Sabiston. Tratado de Cirugía*. 18ª edición. Elsevier. 2009.
26. Hruban RH, Klimstra DS. Adenocarcinoma of the pancreas. *Semin Diagn Pathol* 2014;31:443–51.
27. Lizarazo Rodríguez, JI. Patogénesis del cáncer de páncreas. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 2008 23(4), 391-399.
28. Gao L, Bo H, Wang Y, Zhang J, Zhu M. Neurotrophic Factor Artemin Promotes Invasiveness and Neurotrophic Function of Pancreatic Adenocarcinoma In Vivo and In Vitro. *Pancreas* 2015;44:134–143.
29. Xu Q, Wang Z, Chen X, Duan W, Lei J, Zong L, et al. Stromal-derived factor-1 α /CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway promotes perineural invasion in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2015; 6:4717-32.

30. Moreno-Planas JM, Sánchez-Ortega A, García-Bueno JM. Avances en cáncer de páncreas, del laboratorio a la clínica. CRC 2010.
31. Willett CG, Daly WJ, Warshaw AL. CA 19-9 is an index of response to neoadjuvantive chemoradiation therapy in pancreatic cancer. *American Journal of Surgery* 1996;172: 350–2.
32. Nagaraju GP, El-Rayes BF. SPARC and DNA methylation: Possible diagnostic and therapeutic implications in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett* 2012;328: 10–7.
33. Jiang YJ, Lee CL, Wang Q, Zhou ZW, Yang F, Jin C, Fu DL. Establishment of an orthotopic pancreatic cancer mouse model: Cells suspended and injected in Matrigel. *World J Gastroenterol* 2014;20: 9476-85.
34. Barton CM, Hall PA, Hughes CM, Gullick WJ, Lemoine NR. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1991;163:111-6.
35. Iacobuzio-Donahue CA, Hruban RH. Gene expression in neoplasms of the pancreas: applications to diagnostic pathology. *Advances in Anatomic Pathology*. Vol 10. No3. pp 125-134.
36. Sohn TA, Yeo CJ. The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: a review. *Surg Oncol* 2000;9: 95-101.
37. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic Cancer Biology and Genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2;897-909.

38. Pour PM, Pandey KK, Batra SK. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma?. *Mol Cancer* 2003; 2:13.
39. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but are susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356:215-21.
40. Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del Castillo C, Falconi M, Shimizu M, et al. International Consensus Guidelines for Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas *Pancreatology* 2006;6:17–32
41. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Mark Evers B. Inflammatory Mechanisms Contributing to Pancreatic Cancer Development. *Ann Surg* 2004;239:763–71.
42. Parikh AA, Liu WB, Fan F, Stoeltzing O, Reinmuth N, Bruns CJ, et al. Expression and Regulation of the Novel Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Neuropilin-1 by Epidermal Growth Factor in Human Pancreatic Carcinoma. *Cancer* 2003;98:720-9.
43. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. The MET receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor. *J Cell Biol* 1993;121:145-5.
44. Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Beger HG, Do DA, Kobrin MS, et al. Increased expression of acidic and basic fibroblast growth-factors in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 1994;144:117-28.

45. Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donohue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo CY, Chen D, et al. Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increases ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget* 2011;2:862–73.
46. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4167-71.
47. Arturo Rosenblueth & Norbert Wiener. The role of models in scient. *Philosophy of Science*, 12: 4; 1945, 316-21.
48. Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Hashimoto S, Enomoto T, et al. Histological Advantages of tumor Graft: a murine model involving transplantation of human pancreatic cancer tissue fragments. *Pancreas* 2013;42:1275-82.
49. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, et al. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1984;44:717–26.
50. Zimmerman JA, Trombetta LD, Carter TH, Weisbroth SH. Pancreatic carcinoma induced by N-methyl-N'-nitrosourea in aged mice. *Gerontology* 1982;28:114- 20.
51. Gingell R, Wallcave L, Nagel D, Kupper R, Pour P. Metabolism of the pancreatic carcinogens N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine and N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine in the Syrian hamster. *J Nat Cancer Inst* 1976; 57: 1175-8.
52. Pour P, Althoff J, Gingell R, Kupper R. A further pancreatic carcinogen in Syrian golden hamsters: N-nitroso-bis (2-acetoxypropyl) amine. *Cancer Lett* 1976;1:197-202.

53. Pour P, Mohr U, Cardesa A, Althoff J, Krüger FW. Pancreatic neoplasms in an animal model: Morphological, biological, and comparative studies. *Cancer* 1975; 36:379-89
54. Arjona-Sánchez Á, Ruiz-Rabelo J, Perea MD, Vázquez, R, Cruz A, Del C. Muñoz M, Padillo FJ. Effects of capecitabine and celecoxib in experimental pancreatic cancer. *Pancreatology*, 2010; 10; 641-47.
55. Ruiz-Rabelo JF, Vázquez R, Perea MD, Cruz A, González R, Romero A, Padillo FJ. Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer. *Journal of Pineal Research*, 2007;43;270-75.
56. Padillo FJ, Ruiz-Rabelo JF, Cruz A, Perea MD, Tasset, I, Montilla P, Muntané, J. Melatonin and celecoxib improve the outcomes in hamsters with experimental pancreatic cancer. *Journal of Pineal Research*, 2010;49;264-70.
57. Roebuck BD, Longnecker DS. Species and rat strain variation in pancreatic nodule induction by azaserine. *Journal of the National Cancer Institute* 1977;59:1273-7.
58. Longnecker DS, Curphey TJ. Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Cancer Research* 1975;35:2249-58.
59. Osvaldt AB, Wendt LR, Bersch VP, Backes AN, de Cássia ASR, Edelweiss MI, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. *Surgery* 2006;140:803-9.
60. Al-Wadei HA, Schuller HM. Nicotinic receptor-associated modulation of stimulatory and inhibitory neurotransmitters in NNK-induced adenocarcinoma of the lungs and pancreas. *J Pathol* 2009;218, 437-45.

61. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; 321:1801-6.
62. Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, Rasheed Z, Solomon A, Zou GM, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* 2009;8:310-4.
63. Baumgarten AJ, Fiebig HH, Burger AM. Molecular analysis of xenograft models of human cancer cachexia--possibilities for therapeutic intervention. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4:223-31.
64. Quesnelle KM, Wheeler SE, Ratay MK, Grandis JR. Preclinical modeling of EGFR inhibitor resistance in head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* 2012;13: 935-45.
65. Huynh H, Soo KC, Chow PK, Panasci L, Tran E. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs. *Clin Cancer Res* 2006;12:4306-14.
66. Yamaguchi T, Ikehara S, Nakanishi H, Ikehara Y. A genetically engineered mouse model developing rapid progressive pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 2014;234:228–38.
67. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 2003;4:437–50.
68. Partecke LI, Sandler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, et al. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur Surg Res* 2011;47:98-107.

69. Jiang YJ, Lee CL, Wang Q, Zhou ZW, Yang F, Jin C, Fu DL. Establishment of an orthotopic pancreatic cancer mouse model: Cells suspended and injected in Matrigel. *World J Gastroenterol* 2014;20: 9476-85.
70. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998-1999; 17:279-84.
71. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469-83.
72. Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donohue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo CY, Chen D, et al. Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increases ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget* 2011;2:862-73.
73. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 2008;3:157-88.
74. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437-50.
75. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, et al. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 2006;66:95-106.
76. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 1966 8(3):295-309.
77. Song Y, Sun W, Weng X, Liang Z, Yu Q, Wang Z, Ouyang L, Chen J, Wu X, Shen G, Wu X. Tumor rejection effects of allorestricted tumor peptide-specific

- CD4(+) T cells on human cervical cancer cell xenograft in nude mice. *Cell Transplant.* 2012;21(7):1503-14.
78. Perez M, Lucena-Cacace A, Marín-Gómez LM, Padillo- Ruiz J, Robles-Frias MJ, Saez C, Garcia-Carbonero R y Carnero A. Dasatinib, a Src inhibitor, sensitizes liver metastatic colorectal carcinoma to oxaliplatin in tumors with high levels of phospho-Src. *Oncotarget.* 2016;7(22):33111-24. doi: 10.18632/oncotarget.8880.
79. Garcia PL, Council LN, Christein JD, Arnoletti JP, Heslin MJ, Gamblin TL, Richardson JH, Bjornsti MA y Yoon KJ. Development and histopathological characterization of tumorgraft models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One.* 2013 Oct 23;8(10):e78183. doi: 10.1371/journal.pone.0078183. eCollection 2013.

ANEXOS

ANEXO I. INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA (PROYECTO CEEA-US2014-013/5)



Comité Ético de Experimentación Animal
de la Universidad de Sevilla

ANEXO VIII

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEAA) LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Órgano habilitado para la evaluación de proyectos de Experimentación Animal, mediante resolución del 3 de septiembre de 2013 de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

EL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEAA)/ COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN (CEI) DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido en la Sesión celebrada el día 26/02/2015 y según consta en el acta 26/02/2015 ha valorado el estudio presentado por Jordi Muntanet Relat, Categoría (s) (según RD 1201/2005) C desde 21/06/2006

Titulado: DESARROLLO DE MODELO MURINO DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS A PARTIR DE XENOINJERTO HUMANO.

Y con código de evaluación de proyecto número CEEA-US2014-013/5

INFORMA

1. *El proyecto, ha sido evaluado de forma apropiada al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto se realizará de acuerdo al REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.*
2. *El proyecto está justificado dados los beneficios que se prevén alcanzar desde el punto de vista científico o educativo.*
3. *La finalidad del proyecto justifica la utilización de animales y está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de la forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible, así como tendiendo a los principios de reemplazo, reducción y refinamiento.*
4. *El proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación, siendo tanto el/los vocal/es (científico/s) evaluador/es de este proyecto, como el/la especialista en bienestar animal, ajeno/a totalmente al mismo.*
5. *La evaluación realizada en base a la documentación presentada por el investigador responsable, da lugar a las siguientes clasificaciones:*

Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad:

(Utilizar el espacio necesario. Añadir tantas evaluaciones y clasificaciones como sean necesarias según el número de procedimientos que conlleve el proyecto)

Procedimiento: Implante de carcinoma subcutáneo

Observaciones: Se debe vigilar el crecimiento del tumor para que no repercuta en el bienestar animal.

Clasificación: Leve

Vicerrectorado de Investigación
Pabellón de Brasil
c.e.: Comite_etico@listas.us.es



Procedimiento: Implante de carcinoma intraperitoneal
Observaciones: Puesto que no hay bibliografía previa, se recomienda una prueba piloto y en cualquier caso una supervisión del bienestar animal continua.
Clasificación: MODERADO

Procedimiento: Implante de carcinoma en páncreas
Observaciones: Puesto que no hay bibliografía previa, se recomienda una prueba piloto y en cualquier caso una supervisión del bienestar animal continua.
Clasificación: MODERADO

Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013 *(Utilizar el espacio necesario)*

Excepciones: no

Evaluación conformidad 3R: El proyecto está conforme con las 3R

Análisis daños/beneficios: Los posibles beneficios potencialmente pueden ser importantes y justifican la realización del proyecto.

Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva:

Resultado: No hay bibliografía previa

Evaluación retrospectiva: SI Fecha evaluación retrospectiva: 01/03/2017

Documentación para realizar la evaluación retrospectiva (en caso afirmativo):

- Grado de consecución de los objetivos.
- Evaluación del daño infringido a los animales, incluido el número y las especies de animales utilizados, y la severidad de los procedimientos.
- Cualquiera de los elementos que puedan contribuir a una mejor aplicación del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento.

POR TODO LO ANTERIORMENTE EXPUESTO, CONFIRMO QUE EL PROYECTO SOMETIDO A ESTE INFORME DEL ÓRGANO HABILITADO:

1. Se clasifica como: Tipo II
2. Que la evaluación del proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, resulta ser: FAVORABLE
3. Observaciones: Evaluación retrospectiva requerida puesto que varios ensayos se realizan por primera vez.
4. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Elaborado por: Secretario Órgano Habilitado

Nombre: C. Oscar Pintado Sanjuán

Fecha: 26/02/2015

Firma

Revisado y aprobado por: Presidente Órgano Habilitado

Nombre: Javier Vitorica

Fecha: 26/02/2015

Firma

Vicerrectorado de Investigación
Pabellón de Brasil
c.e.: Comite_etico@listas.us.es

ANEXO II: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO ENTREGADO A LOS PACIENTES

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturalaleza: Se le pide su consentimiento para que una parte del tejido que se le va a extirpar en la intervención quirúrgica, se emplee para investigar sobre la existencia de proteínas que se componen como marcadores pronósticos de su enfermedad que representen diferencias en la evolución de la misma.

El ADENOCARCINOMA DE PANCREAS (ADCP) es un tumor derivado de la malignización del tejido pancreático, cuya incidencia está aumentando en todo el mundo. La ausencia de tratamientos efectivos frente al ADCP, hace que el pronóstico de esta enfermedad sea especialmente sombrío, pues las opciones terapéuticas no quirúrgicas actuales son insuficientes para controlar la enfermedad. Los mejores resultados se han obtenido en aquellos tumores cuyo diagnóstico y tratamiento se ha llevado a cabo en fases precoces.

En los últimos años se han publicado estudios que pretenden identificar factores pronósticos que ayuden a seleccionar aquellos pacientes que se puedan beneficiar de los recursos terapéuticos disponibles (tanto quirúrgicos como no) para controlar la enfermedad, con pobres resultados. Seleccionaremos pacientes con ADCP y obtendremos muestras de plasma en el momento de inclusión en el estudio, así como de tejido sano y tumoral de la pancreatocoma. Realizaremos un análisis proteómico de todas las muestras para la identificación de potenciales biomarcadores de ADCP circulantes en sangre. Las proteínas identificadas serán validadas en el plasma del paciente, así valoradas su presencia en el tejido tumoral. Se sentarán las bases para la identificación de las posibles modificaciones posttraduccionales de las proteínas identificadas en el plasma y validadas en el tejido tumoral y no tumoral adyacente de los pacientes con ADCP.

Importancia: Este estudio permitirá que otras personas se beneficien de futuros tratamientos menos agresivos que la cirugía.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente: Las relacionadas con la intervención quirúrgica. Es decir, sangrado, infección o fístula digestiva.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de la Unidad de Cirugía Hepato-Bilio-Pancreática en el teléfono: 966 012 317.

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

<TÍTULO>

Yo (Nombre) y Apellidos).....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio < Impacto de la Expresión Diferencial de Marcadores Proteómicos en la Evolución Clínica y Pronóstico del Adenocarcinoma de Páncreas. Estudio Translacional>

He recibido suficiente información sobre el estudio < Impacto de la Expresión Diferencial de Marcadores Proteómicos en la Evolución Clínica y Pronóstico del Adenocarcinoma de Páncreas. Estudio Translacional> He hablado con el profesional sanitario informador:.....

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.

- Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado < Impacto de la Expresión Diferencial de Marcadores Proteómicos en la Evolución Clínica y Pronóstico del Adenocarcinoma de Páncreas. Estudio Translacional>

Firma del paciente (o representante legal en su caso)

Firma del profesional sanitario informador

Nombre y apellidos:..... Fecha:

Nombre y apellidos:..... Fecha:

ANEXO III: CLASIFICACIÓN TNM DEL ADCP SEGÚN LA AJCC



Definitions

Primary Tumor (T)

- TX** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Carcinoma in situ^{1**}
- T1** Tumor limited to the pancreas, 2 cm or less in greatest dimension
- T2** Tumor limited to the pancreas, more than 2 cm in greatest dimension
- T3** Tumor extends beyond the pancreas but without involvement of the celiac axis or the superior mesenteric artery
- T4** Tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable primary tumor)

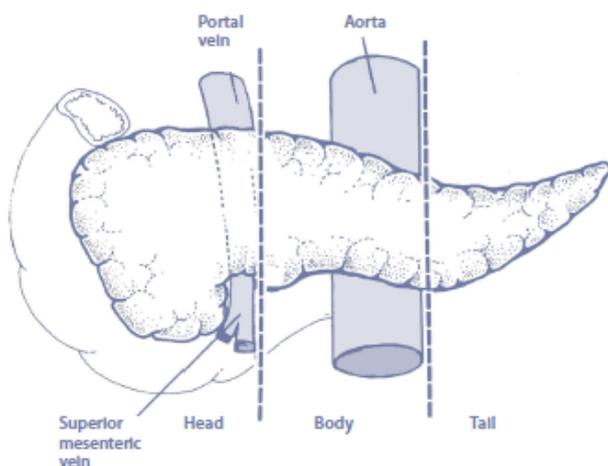
Regional Lymph Nodes (N)

- NX** Regional lymph nodes cannot be assessed
- N0** No regional lymph node metastasis
- N1** Regional lymph node metastasis

Distant Metastasis (M)

- M0** No distant metastasis
- M1** Distant metastasis

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stage III	T4	Any N	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1



Tumors of the head of the pancreas are those arising to the right of the superior mesenteric-portal vein confluence.

Notes

- ¹ Endocrine AND exocrine tumors are now staged by a single pancreatic staging system.
- ² Also includes the "PanIn1" classification.



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society



Copyright 2010 American Joint Committee on Cancer. Printed with permission from the AJCC.

The American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010). Published by Springer Science & Business Media, LLC (SBM)