



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado en Investigación en
Cirugía y Especialidades Médico Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL

**“Papel de los fibroblastos peritumorales
en la progresión del cáncer de páncreas
humano: estudio del gen erizo”**

Autor: Belén Porrero Guerrero

Oviedo, 2017



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado en Investigación en
Cirugía y Especialidades Médico Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL

**“Papel de los fibroblastos peritumorales
en la progresión del cáncer de páncreas
humano: estudio del gen erizo”**

Autor: Belén Porrero Guerrero

Director: Luis Barneo Serra

Oviedo, 2017



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE _____ /
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN _____



RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer death in the world. With a very unfavorable prognosis, its treatment continues to be studied in order to improve the survival with new therapeutic measures. Peritumoral stroma, in pancreatic cancer, is not only a spectator, but plays a very important role in invasion and tumor progression.

Because of this, the thesis is based on three objectives, to analyze the influence of peritumoral fibroblasts on local growth and tumor invasion, genes involved in the hedgehog gene pathway for their involvement in tumor proliferation and invasion and the efficacy of the BMP7 protein in pancreatic cancer.

MATERIAL AND METHODS

Immunodepressed mice, SCID and nude mice are used as animal models. We performed xenotransplantation to analyze the results.

Normal, peritumoral and tumor fibroblasts were cultured *in vitro* from surgical samples of pancreatic cancer to study their local growth capacity. In addition to staining with specific antibodies of proCOL11A1, SMA and Vimentina.

Xenotransplantation in SCID mice at the head of the pancreas with CAPAN1 cells associated or not with peritumoral fibroblasts.

Finally, xenotransplantation, in nude mice, of pancreatic cancer was performed to treat the recombinant BMP7 protein.

RESULTS

Peritumoral fibroblasts were cultured "*in vitro*", with a larger growth curve than normal fibroblasts. In addition, staining with proCOL11A1 was positive for this tumor tissue.

In gene expression, we demonstrated that there is an overexpression in the peritumoral fibroblasts of SMO and BMP7, and SMO overexpression activates the hedgehog gene pathway and favors tumor progression.

We created an animal model of human pancreatic cancer with larger tumor size and more metastasis in the xenograft model of CAPAN1 and peritumoral fibroblasts. Treatment with BMP7 protein controls local tumor growth but does not appear to have the same effect once the tumor is metastasized.

CONCLUSIONS

The production of fibroblasts is feasible "*in vitro*".

The growth curve is higher in the peritumoral fibroblasts.

Peritumoral fibroblasts stimulate the proliferation of CAPAN1 cells, which has allowed us to create an animal model of human pancreatic cancer. They favor tumor invasion.

The BMP7 protein appears to inhibit local tumor invasion but favor metastasis

“En cada acto médico debe estar presente el respeto por el paciente y los conceptos éticos y morales; entonces la ciencia y la conciencia estarán siempre del mismo lado, del lado de la humanidad”.

René Gerónimo Favalaro

A mis padres, por creer en mí cada día y gracias a los cuales soy quien soy.

A mi madre por su positividad y su forma de ver la vida, sin ella no sería nada.

A mi padre por ser la mitad del cirujano que soy hoy y siempre será parte de mí.

A mi hermana por ser mi cómplice, mi confidente y mi amiga.

A Matteo por estar siempre dispuesto a ayudarme.

A Roberto, por ser mi apoyo y mi ilusión día a día.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS, Y MIL GRACIAS MÁS:

Muy especialmente al Dr. Luis Barneo por su gran ayuda, orientación y entusiasmo en la dirección de esta Tesis y darme la oportunidad de poder elaborarla. Por enseñarme la faceta investigadora tan difícil y a la vez tan bonita. Sin duda sin él esta Tesis no hubiese sido posible.

Al equipo que durante todos estos años me han ayudado en todo lo relacionado con el trabajo de campo, análisis, elaboración y enriquecimiento de este trabajo, por su ayuda y colaboración desinteresada:

Gracias de corazón a Fernando Vázquez Villa por su colaboración en los xenotrasplantes y la recogida de muestras. Y por la ayuda que he recibido en la elaboración de toda la expresión de genes.

A Juan Ramón De Los Toyos, por su especial motivación en la investigación traducida en la facilidad en la elaboración del trabajo.

A Carmen García Pravia, patóloga del Hospital Universitario Central de Asturias, por su ayuda para la extracción correcta de las muestras quirúrgicas, el estudio anatomopatológico de todas ellas y su facilidad para explicar y enseñar el estudio microscópico de los tejidos.

A María Teresa Fernández García, responsable de la Unidad de histopatología molecular en modelos animales de cáncer del IUOPA, por su apoyo e ilusión en el trabajo con la colaboración y ayuda en el estudio de las muestras animales.

A Eva García Pérez, por su dedicación para llevar a cabo el trabajo con los cultivos y cocultivos que han sido un gran pilar de esta tesis.

A Laura Suárez Fernández, técnica imprescindible en este trabajo, por su gran manejo y ayuda en la preparación de las muestras histológicas.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros, los residentes del Servicio de Cirugía General y Digestivo del hospital Universitario Central de Asturias, Camilo y Paul, por su ayuda en los xenotrasplantes realizados durante estos años.

Y, en especial, a mi compañera y amiga Ester, sin ella y su apoyo día tras día en el desarrollo y elaboración de la tesis no hubiese conseguido este resultado, es parte de su esfuerzo también.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Cáncer de páncreas humano.....	19
1.1.1. Datos epidemiológicos.....	19
1.1.2. Factores de riesgo.....	21
1.1.3. Anatomía patológica.....	24
1.1.4. Presentación clínica.....	26
1.1.5. Diagnóstico.....	28
1.1.6. Estadificación.....	30
1.1.7. Tratamiento.....	33
1.2. Biología molecular del cáncer.....	39
1.2.1. Estroma.....	39
1.2.2. Gen erizo-hedgehog.....	41
1.2.3. Proteína recombinante BMP-7.....	46
1.3. Modelo animal.....	47
2. JUSTIFICACIÓN.....	51
3. HIPÓTESIS.....	55
4. OBJETIVOS.....	59

5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
5.1. Línea celular tumoral de adenocarcinoma ductal de páncreas humano.....	65
5.2. Muestras quirúrgicas de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.....	66
5.2.1. Recogida de datos.....	66
5.2.2. Traslado de la muestra quirúrgica a anatomía patológica.....	67
5.2.3. Obtención de muestras para cultivo y conservación en nitrógeno líquido.....	68
5.3. Cultivos.....	69
5.3.1. Cinética de crecimiento.....	69
5.3.2. Morfología celular.....	71
5.4. Expresión de genes.....	72
5.4.1. Introducción.....	72
5.4.2. Muestras utilizadas.....	74
5.4.3. Chequeo de la calidad y cantidad de las muestras.....	75
5.4.4. Procesamiento de las muestras.....	77
5.4.5. Análisis de datos.....	77
5.5. Ratones utilizados.....	78
5.5.1. Ratones SCID.....	78
5.5.2. Ratones <i>nude</i>	78
5.6. Xenotrasplante.....	79
5.6.1. Procedimiento quirúrgico.....	79
5.6.2. Necropsia.....	81
5.6.3. Modelo animal de cáncer de páncreas.....	81
5.7. Tratamiento con proteína recombinante BMP-7 en xenotrasplantes.....	85
5.8. Análisis estadístico.....	87

6. RESULTADOS.....	89
6.1. Análisis de cultivos.....	91
6.1.1. Cinética de crecimiento.....	91
6.1.2. Morfología celular.....	93
6.2. Análisis de expresión de genes.....	96
6.2.1. Amplificación específica de genes humanos.....	96
6.2.2. Datos de expresión en las líneas celulares de los trasplantes.....	96
6.2.3. Sobreexpresión o represión de los genes en los ratones receptores de trasplante frente a los valores de las líneas celulares “in vitro”.....	98
6.3. Análisis de xenotrasplantes.....	101
6.3.1. Resultados: nuevo modelo animal de cáncer de páncreas humano.....	101
6.4. Tratamiento con BMP-7.....	109
7. DISCUSIÓN.....	115
8. CONCLUSIONES.....	127
9. BIBLIOGRAFÍA.....	131
10. ANEXOS.....	154

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER DE PÁNCREAS HUMANO

1.1.1. Datos epidemiológicos

La situación actual del cáncer en el mundo, según el programa GLOBOCAN de la OMS del año 2012, estima que existían 14 millones de nuevos casos de cáncer, que 8,2 millones murieron por esta enfermedad y que 32,5 millones viven con este tipo de patología (1).

A nivel mundial el cáncer de páncreas ocupa el decimoquinto lugar (Figura 1) y constituye la cuarta y quinta causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente. En el 2012, según datos del programa GLOBOCAN, la incidencia del cáncer de páncreas representaba 337.872 nuevos casos/año (2,4 casos/ 100.000 habitantes/año) y se producían 330.391 nuevos casos/año (4,0 casos/100.000 habitantes/año) (1), lo que nos da una idea de la letalidad de esta patología.

Según datos del programa de GLOBOCAN 2012, en España los tumores de páncreas se sitúan en el decimocuarto lugar (Figura 2) con 6367 nuevos casos diagnosticados al año, pero 5720 fallecimientos con una prevalencia de 3437 a los 5 años (1).

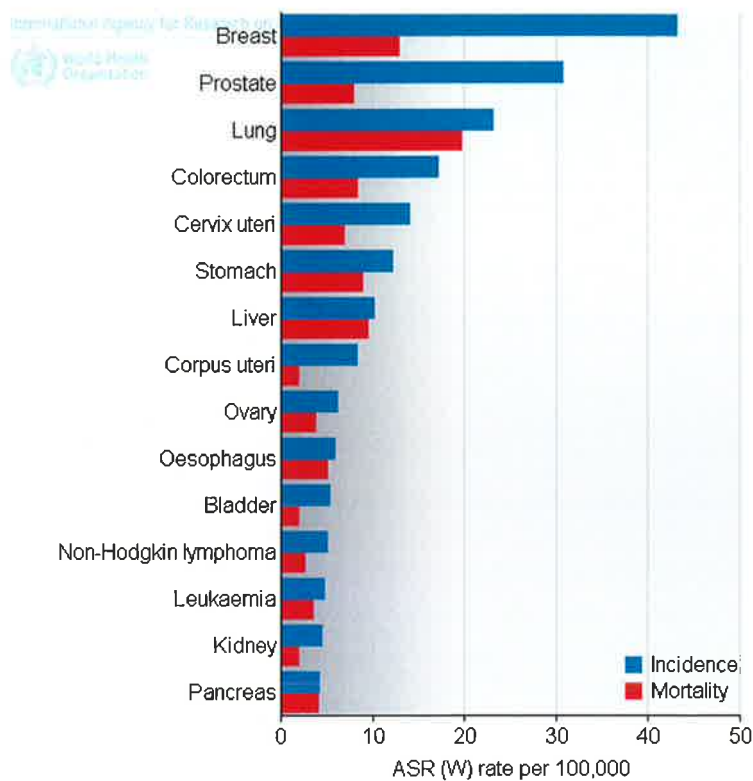


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de páncreas en el mundo. GLOBOCAN 2012- IARC. Tomado de GLOBOCAN 2012. (1)

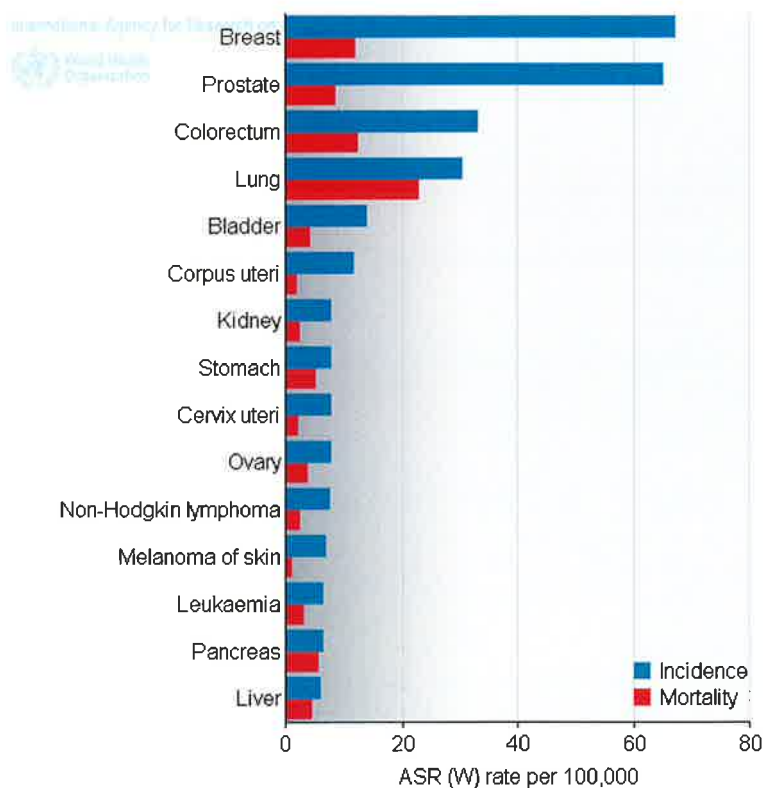


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de páncreas en España. GLOBOCAN 2012- IARC. Tomado de GLOBOCAN 2012. (1)

El cáncer de páncreas es el octavo tumor maligno más frecuente, y es considerado la cuarta causa de muerte por cáncer en Estados Unidos (2), lo que indica su agresividad, precedido tan solo por el de pulmón, colon y mama. Es la causa más frecuente de obstrucción biliar extrahepática en pacientes de más de 50 años.

Presenta una mayor incidencia en el varón, aunque en los últimos años parece que existe una lenta disminución en el porcentaje de casos en el hombre blanco. En contraste, ha aumentado el porcentaje en mujeres blancas y mujeres y hombres negros. Nos hace pensar en cierto componente genético la presencia de mayor incidencia en determinados grupos étnicos (3).

La edad media de aparición del adenocarcinoma de páncreas es a los 60-64 años, a partir de la cual la incidencia aumenta rápidamente, siendo rara su presencia en edades inferiores a los 40 años. El 80% de los casos se produce en sujetos entre los 60 y 80 años (4, 5).

1.1.2. Factores de riesgo

La etiología del cáncer de páncreas es incierta. Aumenta notablemente el riesgo de sufrir cáncer de páncreas el hábito tabáquico, la ingesta de alcohol, café, disolventes orgánicos, productos derivados del petróleo, dietas ricas en grasas, pancreatitis crónica y la diabetes mellitus. Otros factores que también influyen son el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el grupo sanguíneo, la hepatitis y *Helicobacter pylori* (HP) (6). También influyen el alcohol, café, los disolventes orgánicos, productos derivados del petróleo y la obesidad e inactividad física. De hecho en los últimos años la incidencia de este tumor ha aumentado ligeramente, y parece que es debido a estos factores ambientales y dietéticos (7).

La dieta occidental con un alto consumo de grasas saturadas y carnes, en unos estudios se relaciona con el cáncer de páncreas (8, 9, 10) pero en otros no (11, 12). Sin embargo, la dieta rica en frutas y verduras parece tener un efecto protector (13). La relación entre el consumo de alcohol y café con el cáncer de páncreas es contradictoria,

además es difícil estudiar estos factores cuando en muchos casos los dos consumos van asociados al mismo colectivo de personas.

Existen análisis que sugieren una relación del consumo de alcohol con el cáncer de páncreas, es pequeña y limitada a los grandes bebedores (más de 60 mg/día) (14, 15, 16). La relación entre el tabaco y el alcohol con el cáncer de páncreas es difícil si queremos analizarlo como variables independientes debido al alto número de personas que consumen alcohol y fuman a la vez, y el número de cigarrillos y de grados de alcohol consumido también están asociadas.

Del mismo modo existen estudios que relacionan el alto consumo de café con el cáncer de páncreas, sin ser estadísticamente significativo cuando se asocia con fumadores (17, 18, 19).

En cuanto a la asociación con el tabaco, el riesgo relativo de cáncer de páncreas entre los fumadores es de 2,5 (20) y el riesgo aumenta en relación con la cantidad de cigarrillos consumidos (21, 22, 23). El riesgo se redujo en un 48 por ciento en dos años tras la interrupción y se estabilizó a los 10-15 años, finalmente se compara al riesgo de los no fumadores (24).

Algunos estudios relacionan la falta de actividad física, el índice de masa corporal elevado y el cáncer de páncreas. Un IMC de más de 30 Kg/m² se asoció a un aumento significativo del riesgo de cáncer de páncreas (25, 26, 27). Otros estudios han sugerido que la obesidad y el sobrepeso desarrollan cáncer de páncreas a edad más temprana que un individuo con peso normal, además parece que tienen peor pronóstico (28, 29).

La incidencia de la diabetes mellitus aumenta en la población con cáncer de páncreas (30), pero la relación entre la diabetes y el cáncer de páncreas es discutida. En estudios aparece la diabetes como factor de cáncer de páncreas mientras que en otros constituye simplemente una manifestación clínica (31, 32, 33, 34).

La asociación entre la infección por HP y el riesgo de cáncer pancreático sigue siendo controvertida. Nuevos artículos demuestran que la asociación es nula entre la infección por HP y el riesgo de cáncer pancreático en las poblaciones de Europa occidental. Sin embargo, la asociación sugerida entre la gastritis crónica atrófica y el

riesgo de cáncer de páncreas justifica una verificación independiente en futuros estudios y, si se confirma, nuevos estudios sobre los mecanismos subyacentes (35).

Existe asociación entre pancreatitis crónica y cáncer de páncreas, en artículos publicados fue casi tres veces mayor en pacientes con más de dos años de diagnóstico de la pancreatitis. Los casos de cáncer de páncreas más jóvenes (<65 años) pueden mostrar asociaciones más fuertes con pancreatitis crónicas de más de dos años de evolución (36).

Se describe agregación familiar en el cáncer de páncreas (5-10%) (37, 38, 39) y también algunos síndromes hereditarios, que aumentan su riesgo (pancreatitis crónica familiar) (40, 41, 42). Las mutaciones BRCA1 y BRCA2, especialmente relacionadas en la oncogénesis del cáncer de mama y ovario, se asocian a un mayor riesgo de cáncer de páncreas (43, 44, 45), así como la del STK11 responsable del síndrome de Peutz – Jeghers (46, 47).

Es importante conocer la agregación familiar del cáncer de páncreas y sus genes implicados, como hemos mencionado en el párrafo anterior, para las implicaciones terapéuticas y los estudios genéticos que se pueden realizar a estos pacientes de riesgo (48).

Por último en el cáncer de páncreas se han descrito tres tipos de alteraciones genéticas (2, 49):

- Activación de oncogenes promotores del crecimiento celular: especialmente la del oncogén K-ras que constituye el 100% de los primeros pasos en la oncogénesis pancreática.
- Mutaciones que determinan una inactivación de genes supresores. Destaca la mutación del gen p53 observada en el 75% de los cánceres de páncreas. Otros genes supresores implicados son p16, SMAD-4, DPC, y DCC.
- Expresión excesiva de los factores de crecimiento y de sus receptores. Los cambios más frecuentes afectan a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y a los receptores de HER2, HER3 y HER4. La sobreexpresión de los receptores EGF se correlaciona con la invasión tumoral, un mayor poder metastásico y un pronóstico menos favorable. El incremento en la expresión de HER2 comporta un fenotipo mejor diferenciado.

1.1.3. Anatomía patológica

El adenocarcinoma ductal y sus variantes explican del 80% al 90% de todas las neoplasias pancreáticas (50). Entre un 60% a un 70% del cáncer de páncreas exocrino se localiza en la cabeza del páncreas, y se subdividen en tipos histológicos (ver Tabla 1).

El análisis macroscópico de las lesiones describe masas duras, irregulares y arenosas, de color gris amarillo y mal definidas. En el momento del diagnóstico suelen tener un diámetro mayor de 3 cm y se acompañan de metástasis ganglionares y a distancia.

El grado de diferenciación microscópica, el índice de mitosis y la cantidad de moco del tumor es variable en cada caso. Es importante saber que, a menudo, se aprecia una reacción desmoplásica intensa del estroma y fibrosis. El halo de pancreatitis crónica que suele rodear al tumor, obedece presumiblemente a la obstrucción de los conductos vecinos por la masa tumoral. Son muy frecuentes las zonas de invasión linfática y vascular dentro y alrededor del tumor. El crecimiento perineural del tumor es sumamente característico de este cáncer y explica su tendencia a extenderse al plexo neural vecino produciendo, como hemos dicho previamente, dolor epigástrico y dorsal.

El carcinoma no quístico mucinoso, el carcinoma de células en anillo de sello, el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma anaplásico, el carcinoma de células gigantes y el carcinoma sarcomatoideo son variantes del adenocarcinoma ductal que difieren fundamentalmente en el grado de diferenciación y en el aspecto morfológico.

Tabla I. Clasificación de la OMS de los tumores malignos de páncreas exocrino (51).

**CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES
PRIMARIOS MALIGNOS DEL PÁNCREAS**

1. Displasia ductal severa-carcinoma *in situ*.
2. Adenocarcinoma ductal:
 - a. Carcinoma mucinoso no quístico
 - b. Carcinoma en células en anillo de sello
 - c. Carcinoma adenoescamoso
 - d. Carcinoma indiferenciado o anaplásico
 - e. Carcinoma mixto ductal-endocrino
 - f. Carcinoma indiferenciado con células gigantes tipo osteoclasto
3. Cistoadenocarcinoma seroso.
4. Cistoadenocarcinoma mucinoso.
5. Carcinoma mucinoso intraductal papilar.
6. Carcinoma de células acinares.
7. Pancreatoblastoma.
8. Carcinoma sólido seudopapilar

La progresión de un epitelio ductal histológicamente normal hacia una neoplasia intraepitelial pancreática (PanNI) de bajo grado y, por último, una neoplasia intraepitelial de alto grado se asocia con la acumulación de cambios genéticos específicos. Los primeros consisten en mutaciones de HER2 y K-ras, los cambios intermedios abarcan mutaciones de p16 y los asociados al cáncer *in situ* o invasivo precoz dependen de mutaciones de p53, BRCA2 y DPC4.

1.1.4. Presentación clínica

La presentación clínica del cáncer de páncreas suele ser un conjunto de síntomas relacionados con la localización del tumor, los más frecuentes son ictericia, dolor y pérdida de peso (52). Hay que tener en cuenta que son tumores insidiosos que pueden estar presentes durante mucho tiempo lo que les hace extenderse rápidamente antes de dar sintomatología, sobre todo los de cuerpo y cola de páncreas, ya que los de cabeza con tamaños medios de 2-3 cm pueden causar ictericia obstructiva al diagnóstico.

Los síntomas, una vez que se manifiestan, dependen de la localización del tumor. Aproximadamente el 60-70% de los cánceres de páncreas se localizan en la cabeza, un 20% en el cuerpo/cola (53). El síntoma fundamental es la aparición de ictericia indolora, generalmente progresiva, debido a la obstrucción del colédoco intrapancreático (52, 54). El diagnóstico será más precoz cuánto más próximo se encuentre la neoplasia del colédoco y lo obstruya. Cuando existe dolor abdominal este es poco preciso, de características inespecíficas, localizado en epigastrio, de baja intensidad, origen visceral y su evolución es de varios meses (55, 56). Si hubiera dolor de partes altas y media de la espalda se podría sospechar de enfermedad avanzada y con posible extensión a los plexos nerviosos celíaco y mesentérico, lo que orienta a irrecesibilidad de la neoplasia. La pérdida de peso inexplicable, astenia o anorexia se inclina más hacia procesos más avanzados, de igual forma que puede darse vómitos o hemorragia digestiva por invasión duodenal del tumor. Por otra parte, si el tumor obstruye el conducto de Wirsung puede provocar dilatación retrógrada y esteatorrea clínica.

La exploración clínica de los pacientes es importante, palpación de adenopatías, sobre todo supraclavicular izquierda (adenopatía de Virchow) o depósitos metastásicos periumbilicales (ganglio de sor María José). La presencia de ascitis obliga a descartar carcinomatosis. En un tercio de los pacientes aparece el signo de Courvoisier-Terrier, que consiste en la palpación de la vesícula biliar distendida a través de la pared abdominal (57, 58). El inicio *de novo* de una diabetes mellitus en pacientes no obesos mayores de 40 años puede ser el primer síntoma de la enfermedad hasta en un 15% de los pacientes (2), y hasta en un 50% de los casos ambas enfermedades se encuentran asociadas (31, 32). La asociación de la pancreatitis aguda como la crónica es

controvertida con el cáncer de páncreas pero puede aparecer una pancreatitis aguda como primera manifestación por obstrucción ductal.

Tabla II. Manifestaciones clínicas del cáncer de páncreas.

Frecuentes	Infrecuentes
<p><i>Cáncer de la cabeza del páncreas</i></p> <p>Adelgazamiento (92%)</p> <p>Dolor (72%)</p> <p>Ictericia (82%)</p> <p>Coluria (63%)</p> <p>Acolia (62%)</p> <p>Anorexia (64%)</p>	<p>Náuseas (37%)</p> <p>Debilidad (35%)</p> <p>Prurito (24%)</p> <p>Vómitos (37%)</p>
<p><i>Cáncer de cuerpo y cola de páncreas</i></p> <p>Adelgazamiento (100%)</p> <p>Dolor (87%)</p> <p>Debilidad (43%)</p> <p>Nauseas (45%)</p> <p>Anorexia (33%)</p> <p>Vómitos (37%)</p>	<p>Ictericia (7%)</p> <p>Coluria (5%)</p> <p>Acolia (6%)</p> <p>Prurito (4%)</p>

Esta neoplasia se origina en los ductos pancreáticos, y es dos veces más frecuente en la cabeza del páncreas que en el cuerpo y cola del mismo. El pronóstico de esta enfermedad es muy malo, debido a una diseminación vascular, linfática y perineural muy precoz. Los pacientes con la neoplasia localizada en la cabeza del páncreas que son resecados presentan una supervivencia global del 20%, y una supervivencia media que oscila entre doce y veinte meses. Por otro lado, en pacientes con enfermedad localmente avanzada, sin metástasis, la supervivencia puede oscilar entre seis y diez meses, mientras que cuando el diagnóstico se hace con metástasis, la sobrevida puede no superar los seis meses. La resección quirúrgica presenta la única posibilidad de curación o supervivencia prolongada en pacientes con cáncer de páncreas pero sólo el 15% son candidatos a procedimiento quirúrgico en el momento del diagnóstico.

1.1.5. Diagnóstico

Existen tres hallazgos comunes en el cáncer de páncreas: la ictericia, la pérdida de peso y el dolor epigástrico.

La determinación de marcadores tumorales en el cáncer de páncreas, CEA y el CA 19-9, nos ayuda al diagnóstico pero a nivel orientativo, ya que no existe un marcador serológico preciso. Sí son de utilidad en el seguimiento y para los que reciben quimioterapia con enfermedad a distancia, y es útil para el pronóstico de la enfermedad (2). El marcador tumoral CA 19,9, en artículos recientes demuestran su importancia pronóstica (59).

La **ecografía abdominal** debe ser la primera prueba a realizar para orientarnos en el diagnóstico, descartar patología litiásica y localizar el nivel de la obstrucción. Además, el estudio del hígado y la presencia de ascitis. Aunque es una técnica operador-dependiente, su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del cáncer de páncreas oscila entre 75- 89% y 90-99%, respectivamente (60).

La **tomografía computarizada** (TC) helicoidal trifásica (61) tiene una alta sensibilidad para realizar el diagnóstico y establecer la estadificación preoperatoria del tumor, de cara a una posible reseccabilidad, la sensibilidad es mayor para tumores de más tamaño con un 100% para los > 2cm. La administración de contraste permite apreciar las relaciones de la masa pancreática con el eje mesentérico portal, con el tronco celíaco y con la arteria mesentérica superior. El objetivo es conseguir un valor predictivo positivo para la resección quirúrgica próximo al 75%. En el cáncer de páncreas la imagen típica es una masa hipodensa mal definida en el parénquima pancreático, como signos secundarios incluyen una interrupción del conducto pancreático, dilatación del conducto pancreático o biliar común y/o atrofia del parénquima.

La **resonancia magnética (RM)** es una técnica fiable para el diagnóstico de lesiones pancreáticas. Debido a la excelente resolución del contraste de los tejidos blandos puede separar fácilmente los tumores quísticos de los no quísticos. Los tumores quísticos a menudo son fáciles de diagnosticar con resonancia magnética, sin embargo, los tumores no quísticos pueden mostrar un amplio espectro de características de imagen, que pueden imitar el adenocarcinoma ductal. La implementación de nuevas secuencias de pulso resistentes al movimiento y técnicas respiratorias, así como los reconocidos beneficios de la colangiopancreatografía MR, hacen de la RM sea un examen muy preciso para la evaluación de las masas pancreáticas. Además, la resonancia magnética tiene la capacidad de evaluar de forma no invasiva los conductos pancreáticos, el parénquima pancreático, los tejidos blandos vecinos y la red vascular del páncreas. Puede identificar diferentes características de diversas lesiones pancreáticas sólidas, permitiendo potencialmente la diferenciación de adenocarcinoma de otras entidades benignas y malignas (62).

La colangiopancreatografía MR tenía un papel único y valioso en la investigación de pacientes en los que la CPRE no ha sido efectiva porque nos ayuda a evitar el uso de procedimientos invasivos como la colangiografía transhepática percutánea en el diagnóstico de la enfermedad de las vías biliares (63).

Ante la existencia de dudas diagnósticas, o en aquellos casos en los que la TC-RM abdominal no aprecia masa y sí que exista una dilatación de la vía biliar, está indicada la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) diagnóstica y ocasionalmente terapéutica, para visualizar la ampolla de Vater y el duodeno así como los conductos biliares y pancreáticos. Por lo tanto, la CPRE se está convirtiendo en una modalidad terapéutica en el cáncer de páncreas, sobre todo en pacientes que presentan colestasis por obstrucción tumoral del sistema biliar. La ecoendoscopia permite ayudar a localizar tumores pequeños, establece sus relaciones y permite realizar una PAAF tanto de la lesión como de las adenopatías regionales.

La **tomografía por emisión de positrones (PET)** se utiliza para diferenciar la pancreatitis crónica del adenocarcinoma y valorar la presencia de metástasis, sin perder de vista su limitación de disponibilidad y costo (64).

En general, tanto con las técnicas descritas previamente de CPRE como de ecoendoscopia se puede realizar biopsias de la masa sospechosa de tumor pancreático, sin embargo no es aconsejable la realización sistemática de la biopsia para confirmar el diagnóstico, y se indica ante tumores irresecables para el tratamiento quimiorradioterapéutico o antes del tratamiento neoadyuvante en los casos indicados.

1.1.6. Estadificación

El sistema de estadificación del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) se utiliza para el cáncer de páncreas (65), está basado en extensión tumoral (T), afectación de los ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis a distancia (M).

Tabla III. Sistema TNM del American Joint Committee on Cancer para estadificar el cáncer de páncreas.

T- Tumor primario	
TX	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado al páncreas de 2cm o menor
T2	Tumor limitado al páncreas mayor de 2cm
T3	Tumor que se extiende más allá del páncreas, pero sin afectación del tronco celíaco o arteria mesentérica superior
T4	Tumor que afecta al tronco celíaco o a la arteria mesentérica superior
N- Ganglios linfáticos regionales	
NX	Los ganglios linfáticos no pueden ser valorados
N0	No se observan metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales
M- Metástasis a distancia	
MX	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas
M0	No existen metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Tabla IV. Estadios según American Joint Committee on Cancer para estadificar el cáncer de páncreas.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio III	T4	Cualquier N	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, Springer, 2010, pág. 241- 9.

La clasificación se basa en los estudios diagnósticos a los que son sometidos los pacientes previamente, sobre todo para valorar los criterios de irresecabilidad más utilizados de una masa pancreática (66):

Tumores resecables:

- No metástasis a distancia
- Plano graso claro entre el tumor y el tronco celíaco (TCe), la arteria hepática (AH) y la arteria mesentérica superior (AMS)
- No evidencia radiográfica de infiltración o “englobamiento” de la vena mesentérica superior (VMS) o trombosis de origen tumoral.

Tumores localmente avanzados, borderline o marginalmente resecables:

- No metástasis a distancia.
- Invasión de la VMS o vena porta (VP) demostrándose estenosis de la luz, “englobamiento” de VP y VMS pero sin afectación de arterias cercanas, oclusión de segmentos cortos de las venas por trombo tumoral o “englobamiento” con

segmentos proximal y distal del vaso libre permitiendo resección con márgenes libres.

- “Englobamiento” de la arteria gastroduodenal, con afectación de un segmento corto de la AH, sin extensión al TCe.
- Contacto con la AMS que no exceda de 180° de la circunferencia.

Tumores irresecables:

Cabeza:

- Metástasis a distancia
- “Englobamiento” de la AMS en más de 180 grados.
- Infiltración del TCe.
- Oclusión de la VMS o VP sin posibilidad de reconstrucción.
- Invasión de la aorta o “englobamiento” por el tumor.

Cuerpo:

- Metástasis a distancia.
- “Englobamiento” de la AMS o del TCe mayor de 180°.
- Oclusión de VP o VMS sin posibilidad de reconstrucción.
- Invasión aórtica.

Cola:

- Metástasis a distancia.
- “Englobamiento” de la AMS o del TCe mayor de 180°.

Ganglios linfáticos:

- Metástasis en ganglios linfáticos fuera del campo quirúrgico de resección.

- Trombosis completa de VMS o VP.
- “Englobamiento” circunferencial de AMS, TCe o AH proximal.
- Invasión o “englobamiento” de aorta o vena cava inferior (VCI).
- Invasión de VMS por debajo del mesocolon transversal.
- Ascitis.

Los tumores en estadio I y II se pueden resear. Existen signos de mal pronóstico a la hora de clasificar un tumor de páncreas como la aneuploidía, un tamaño tumoral grande (T2), la presencia de ganglios regionales afectados (N1) y una resección incompleta por el margen pancreático o retroperitoneal. Sin embargo los tumores en estadio III y IV se consideran irreseables por enfermedad a distancia (estadio IV) o afectación de grandes vasos (estadio III). La supervivencia media de los pacientes en estadio III varía de 8 a 12 meses, mientras que la de los tumores en estadio IV solo lo se encuentra entre 3 y 6 meses.

1.1.7. Tratamiento

Cuando hablamos de cáncer de páncreas hay que tener en cuenta que debido a la localización retroperitoneal, la falta de síntomas específicos y la sensibilidad limitada de métodos diagnósticos casi todos los pacientes se diagnostican en enfermedad incurable. A pesar de la resección curativa y la quimioterapia adyuvante, la recurrencia es sólo cuestión de tiempo.

Tratamiento quirúrgico:

La cirugía hasta el día de hoy es el único tratamiento con posibilidades curativas del cáncer de páncreas. Sólo el 15-20% de los pacientes son candidatos a la resección quirúrgica. Este tipo de intervención quirúrgica debe realizarse en un centro especializado y con un volumen adecuado para reducir la alta morbimortalidad que se asocia a esta cirugía. La mortalidad en centros con alto volumen de esta patología es inferior al 5% con una morbilidad superior al 35% (67, 68, 69).

La mayor experiencia en cirugía pancreática y los desarrollos en técnicas quirúrgicas han reducido las tasas de mortalidad y morbilidad quirúrgicas. La resección quirúrgica seguida por la terapia adyuvante combinada es actualmente el tratamiento estándar para el cáncer de páncreas resecable. Los pacientes con tumores marginales o marginales resecables comienzan a tener resultados favorables después de quimioterapia neoadyuvante o quimiorradiación. Varios estudios prospectivos aleatorios han concluido que la pancreaticoduodenectomía "extendida" para el cáncer de cabeza pancreática, que involucra la disección radical de los ganglios linfáticos y tejido blando peripancreático, no parece proporcionar ningún beneficio de supervivencia en comparación con la pancreaticoduodenectomía "estándar". Por el contrario, la cirugía extensa para la cola pancreática o cáncer de cuerpo puede resultar en tasas favorables de resección R0 y resultados de supervivencia. Sin embargo, se requieren más datos prospectivos de ensayos aleatorios antes de que se puedan considerar establecidas estas conclusiones. Los abordajes laparoscópicos se están utilizando cada vez más en el campo de la cirugía pancreática. Además, la cirugía laparoscópica asistida por robot también ha sido probada en algunos centros especializados. Una vez más, en la actualidad, la falta de datos sobre los resultados evita cualquier conclusión definitiva en esta etapa sobre la utilidad de esos enfoques en comparación con los enfoques abiertos estándar (70).

Debemos saber las contraindicaciones del tratamiento quirúrgico:

- Metástasis a distancia.
- Obstrucción de la arteria mesentérica superior.
- Vena mesentérica superior no reconstruible.
- Afectación de la vena cava, Aorta, arteria hepática o tronco celiaco.

Tumor en la cabeza del páncreas:

- El tratamiento de elección es la duodenopancreatectomía cefálica/ Whipple con o sin preservación pilórica.
No existe en el momento actual evidencia de que una técnica sea mejor que otra ni en los parámetros del procedimiento ni en cuanto a las complicaciones postoperatorias, sin diferencias en la supervivencia a largo plazo.
- El tratamiento convencional de esta patología incluye la resección de la parte afecta del páncreas y la exéresis del tejido linfático locorregional. La linfadenectomía radical aumenta la morbilidad y la estancia hospitalaria sin incrementar la mortalidad ni logra mejorar la supervivencia a largo plazo. Además, en estudios realizados no se hallaron adenopatías a nivel retroperitoneal como única manifestación de la extensión ganglionar de la enfermedad.
- La pancreatectomía total debe realizarse cuando tenemos un tumor de cabeza y cuerpo de páncreas y ante la posible complicación de una dehiscencia de la anastomosis pancreático-yeyunal.
- Cuando la existencia de una afectación vascular es la única limitación para conseguir una resección pancreática con márgenes libres de tumor, debe plantearse la posibilidad de una resección venosa. Cuando en el TC la afectación venosa es superior al 50 % existe una elevada posibilidad de precisar resección vascular. La supervivencia a largo plazo de los pacientes con afectación venosa es similar a los que no la precisan por lo que se puede decir que depende más de la localización estratégica del tumor que de la agresividad biológica, y no debe considerarse de forma aislada una contraindicación para la resección.
- Para pacientes con ictericia obstructiva, la descompresión de la vía biliar ha dado lugar a diferentes enfoques contradictorios. En general, se aconseja realizarla cuando la bilirrubina supera los límites de 9 mg/dl.

Tumores en cuerpo / cola del páncreas:

- Pancreatectomía distal con esplenectomía.

Complicaciones postquirúrgicas:

- Retraso del vaciamiento gástrico.
- Fístula pancreática.
- Fístula biliar e intestinal.
- Hemoperitoneo.
- Hemorragia digestiva alta.
- Dehiscencia anastomosis gastrointestinal.
- Pancreatitis del remanente.
- Abscesos intraabdominales.

Tratamiento adyuvante:

La *Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO)* recomienda tratamiento adyuvante a todos los pacientes con cáncer de páncreas en los que esté indicada la resección (71). El objetivo principal del tratamiento adyuvante es aumentar la supervivencia sin afectar excesivamente la calidad de vida (72).

Antes de comenzar con el tratamiento adyuvante, todos los pacientes deben someterse a una nueva estadificación con TC y un nivel sérico del marcador tumoral CA 19-9.

El cáncer de páncreas tiene una muy alta tasa de recurrencia sistémica (mayor al 80%) y una alta tasa de recidiva local (mayor del 20%) por lo que se ha intentado asociar la quimioterapia y radioterapia para mejorar el tiempo de supervivencia de estos pacientes. Los fármacos que hasta el día de hoy han demostrado una terapia eficaz son la gemcitabina y los platinos en el tratamiento adyuvante tras la resección pancreática. La RT adyuvante, que a menudo se da con la sensibilización de las dosis de quimioterapia, reduce las recidivas locales pero no existen estudios que demuestren un efecto sobre la supervivencia. Por lo tanto, la elección óptima de la modalidad de tratamiento (quimioterapia con o sin RT) sigue siendo controvertida (73). Las directrices más recientes (2012) para el tratamiento del adenocarcinoma pancreático en la ESMO sugieren que la quimiorradioterapia adyuvante debe solo utilizarse en el

contexto de un ensayo controlado aleatorio (71). Múltiples estudios y meta análisis sugieren un beneficio significativo en la supervivencia global de la quimioterapia sin radioterapia después de la resección pancreática (74, 75, 76). Esto está en contraste con las directrices de National Comprehensive Cancer Network (NCCN), lo que sugiere que, o bien 5-fluorouracilo (FU) sistémico con quimiorradioterapia de gemcitabina o quimioterapia sola son opciones aceptables para la terapia adyuvante.

Hoy en día existen nuevos conceptos en el tratamiento del cáncer de páncreas:

- La resección R0 (completa) tiene mucha importancia, antes sólo nos fijábamos en el margen de resección del páncreas pero ahora damos importancia al margen retroperitoneal, ya que la afectación de dicho margen se asocia con un pronóstico peor (68).
- El cambio de la irradiación en los últimos 25 años, con la dosis exacta para el tratamiento de los tumores gastrointestinales supramesocólicos, y la planificación con TC.
- La especialización del cirujano en la patología pancreática, cuanto más número de intervenciones quirúrgicas se realicen por un cirujano menos es el número de complicaciones en este proceso (77).

Existen múltiples estudios del tratamiento adyuvante del cáncer de páncreas:

ESPAC- 1 (75, 76): Estudio Europeo, que pretendía estudiar los beneficios relativos de la quimioterapia adyuvante, quimiorradioterapia sola o quimiorradioterapia seguida de quimioterapia con la observación. Utilizado 5- Fluorouracilo (FU). Al final los resultados se presentaron en dos publicaciones separadas, una que agruparon los resultados de los tres ensayos aleatorios en paralelo (75) y un informe posterior que se centró en los 289 pacientes asignados al azar al estudio de cuatro brazos (76). Se concluyó que la quimioterapia sola tenía mayor beneficio en la supervivencia.

CONKO- 001: Un beneficio en la supervivencia de la monoterapia con gemcitabina adyuvante. Los pacientes eran asignados al azar a la gemcitabina o sin tratamiento adyuvante tras la cirugía. En la actualización más reciente, también hubo una mejoría modesta pero significativa en la supervivencia global que favoreció gemcitabina (78).

ESPAC- 3: Tratamiento adyuvante, tras cáncer de páncreas resecado, con gemcitabina o leucovorina más FU (79). Con una mediana de seguimiento de 34 meses, la supervivencia media fue similar (23,6 frente a 23 meses con gemcitabina y tratamiento con fluoropirimidinas, respectivamente). Sin embargo, los pacientes asignados a FU / leucovorina tenían más de grado de toxicidad relacionada con el tratamiento.

El informe del Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) revela la combinación de 5-fluorouracilo más radioterapia aumenta la tasa de supervivencia a los 2 años del 18% al 43% entre los pacientes con márgenes negativos de resección (80).

El objetivo principal de la vigilancia después del tratamiento curativo para cualquier tipo de cáncer es la detección de recurrencia local o a distancia. La mayoría de las recidivas después de un tratamiento potencialmente curativo del cáncer de páncreas exocrino se producen dentro de los dos años, y pueden ser locorregional o a distancia, lo más frecuente es en el hígado, los pulmones y la cavidad peritoneal (81). La gran mayoría de recurrencias no son susceptibles de tratamiento potencialmente curativo.

Tratamiento neoadyuvante:

PREOPANC: es un estudio que tiene como objetivo la hipótesis de que la mediana de supervivencia global de los pacientes con tumor de páncreas borderline o resecable puede ser mejorada con radioquimioterapia preoperatoria, consiguiendo resecciones R0 (82).

Existen ya múltiples estudios que intentan demostrar como la neoadyuvancia es segura, eficaz y factible en el cáncer de páncreas. Nos permite pasar a tumores resecables con bordes quirúrgicos libre de enfermedad (83, 84).

NEOPA: es el primer estudio que investiga el impacto de la quimiorradioterapia neoadyuvante en el cáncer de páncreas. Con una hipótesis de aumento de supervivencia del 12% en aquellos pacientes con tratamiento neoadyuvante (85).

Quimioterapia en el cáncer de páncreas avanzado:

La quimioterapia sistémica proporciona un beneficio para los pacientes con cáncer de páncreas avanzado, la mejora de los síntomas y la supervivencia relacionados con la enfermedad en comparación con los mejoras en la calidad de vida.

Actualmente la primera línea de tratamiento del cáncer de páncreas avanzado es el FOLFIRINOX (5- FU, leucovorina, oxaliplatino e irinotecán) en lugar de gemcitabina o un doblete a base de gemcitabina, pacientes con un buen estado funcional ECOG (escala que mide calidad de vida, diseñada por el *Eastern Cooperative Oncology Group*) y un nivel de bilirrubina total en suero que es <1,5 veces el límite superior normal. Regímenes más nuevos que combinan LV y 5-FU con agentes como irinotecán y / o oxaliplatino (que son altamente activos para el cáncer colorrectal metastásico) son prometedores para el cáncer de páncreas avanzado (86).

1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

1.2.1. Estroma

Es importante saber que una de las características del carcinoma ductal de páncreas es el abundante tejido estromal que presenta el tumor rodeando a los acinos pancreáticos. Varios estudios van enfocados al papel de estos fibroblastos de la reacción desmoplásica. En 1998 se destacó la evidencia del efecto de estas células peritumorales en la angiogénesis, resistencia a la terapia y diseminación metastásica (87).

El tejido estromal no es solo un espectador en el cáncer de páncreas humano, el estroma activado incluye fibroblastos peritumorales, células estrelladas, células endoteliales, células nerviosas, células del sistema inmune y matriz extracelular (88).

Los fibroblastos peritumorales de la reacción desmoplásica del tumor se activan en respuesta al estrés oxidativo y a través de la secreción de citosinas y factores de crecimiento. Las interacciones de las células del cáncer de páncreas con los fibroblastos crean el microambiente fibrótico del tumor, apoyando así el crecimiento tumoral y la

diseminación metastásica, el aumento de la quimio resistencia e impactando en la vascularización del tumor (89, 90, 91, 92, 93).

La actividad del fibroblasto peritumoral aumenta en el páncreas enfermo con la disposición excesiva de matriz extracelular, mientras que la densidad microvascular y el número de acinos normales disminuye. Además como los fibroblastos peritumorales se activan con la hipoxia, esta reacción desmoplásica del estroma se extiende permanentemente más allá del páncreas normal formando un halo típico de pancreatitis crónica rodeando a la lesión. Es importante saber que las lesiones de metaplasia y las lesiones displásicas se encuentran en este estroma activado (94, 95).

Los fibroblastos activados son más potentes que las células cancerosas en términos de producción de los factores de crecimiento endovascular.

Con todo esto estudiado podemos afirmar que los fibroblastos de la reacción desmoplásica peritumoral facilitan la invasión tumoral y juegan un papel importante en la progresión del cáncer.

Una opción prometedora en el cáncer de páncreas es la terapia de administración dirigida contra el estroma del tumor junto a la quimioterapia, hay que desarrollar tratamientos antiestromales para que las células tumorales (dispersas entre la reacción fibrótica del tumor) sean más accesibles a los agentes quimioterápicos.

Con todo esto también podemos afirmar que, la deposición de un estroma rico en colágeno alrededor de un cáncer puede representan un refuerzo fisiológico para confinar el cáncer. Por lo tanto, el estroma rico en colágeno en el adenocarcinoma de páncreas es factor pronóstico independiente (96).

1.2.2. Gen erizo (hedgehog)

Historia:

El gen *Drosophila hedgehog*, descubierto en 1980, fue bautizado de tal forma puesto que su pérdida de función causa un fenotipo cubierto por dentículos puntiagudos en las moscas de las frutas, similares a las de un erizo (97).

El Hh tiene tres homólogos en vertebrados: Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) y Sonic hedgehog (Shh), los dos primeros fueron nombrados según especies de erizos existentes y el último nombrado en honor al personaje de videojuegos de Sega. El Dhh se expresa en las células de Sertoli en los testículos, el Ihh se expresa a su vez en el cartílago y es importante para el crecimiento de hueso postnatal, y el Shh es el homólogo de hedgehog en vertebrados con mayor número de funciones, principalmente en el desarrollo embrionario.

Las proteínas de la familia hedgehog son factores paracrinos con actividades morfogenéticas. En el embrión inducen la diferenciación celular, y generan barreras entre tejidos. Para que una proteína hedgehog sea funcional debe estar acoplada a una molécula de colesterol. Esta unión tiene como resultado adicional, una mayor capacidad de difusión entre tejidos. La vía de hedgehog (Hh) es un importante regulador de la diferenciación celular, la proliferación, la polaridad del tejido, el mantenimiento de células madre y la carcinogénesis (98, 99). El primer enlace de señalización de Hh al cáncer fue a través de estudios de una enfermedad familiar rara, el síndrome de Gorlin, en 1996 (100, 101). Varios estudios revelaron la activación de esta vía en el carcinoma de células basales, el meduloblastoma, la leucemia, tumores gastrointestinales, de pulmón, de ovario, de mama y de próstata (102). Se han realizado, por esta razón, varios ensayos clínicos con inhibidores de la vía para evaluar su eficacia en el tratamiento y prevención de diversos tumores sólidos (el cáncer de páncreas parece un buen candidato para el tratamiento experimental con inhibidores de hedgehog).

Tabla V. Hitos de la investigación sobre la señalización de Hh (103).

1980	Discovery of Hh in fly
1987	Discovery of GLI in glioma
1993	Cloning of vertebrate Hhs
1996	Linking Hh to developmental defects
1996	Linking Hh to cancer- Ptch1 as first TSG
1998	Linking Hh to cancer- SMO as first oncogene
1998	Linking cylopamine to Hh signaling
2002	Synthesis of Hh signaling inhibitors
2003-	Linking Hh signaling to more common cancers
2009-	First successful clinical trial in human cancer

Vía de señalización:

Los mecanismos de señalización generales de la ruta de Hh se conservan de las moscas a los seres humanos. Existen dos moléculas importantes en este proceso, implicadas directamente en el proceso de tráfico transmembrana de la célula, Ptch y Smo (104, 105, 106). La proteína transmembrana Patched (PTC en la mosca y dos PTC en vertebrados, PTCH1 y PTCH2) es el receptor principal de esta vía. Estudios de células cultivadas de tejidos indican que PTC inhibe otra proteína transmembrana Smoothened (Smo) a una concentración inferior, siendo esta proteína el transductor de señal clave de la vía de Hh (107). En ausencia de ligandos Hh, como Sonic hedgehog (Shh), se cree que el receptor transmembrana Patched (PTC) bloquea el receptor de Smoothened (Smo) mediante un mecanismo desconocido. De esta forma las moléculas Gli (factores de transcripción que activan a genes en el núcleo y promueven la proliferación celular) se procesan con la ayuda de Su (Fu) / KIF7 en formas represoras que inhabilitan la vía de señalización Hh (108). Es decir, sin Gli activo en el núcleo, la transcripción en el gen diana de la vía Hh es suprimida.

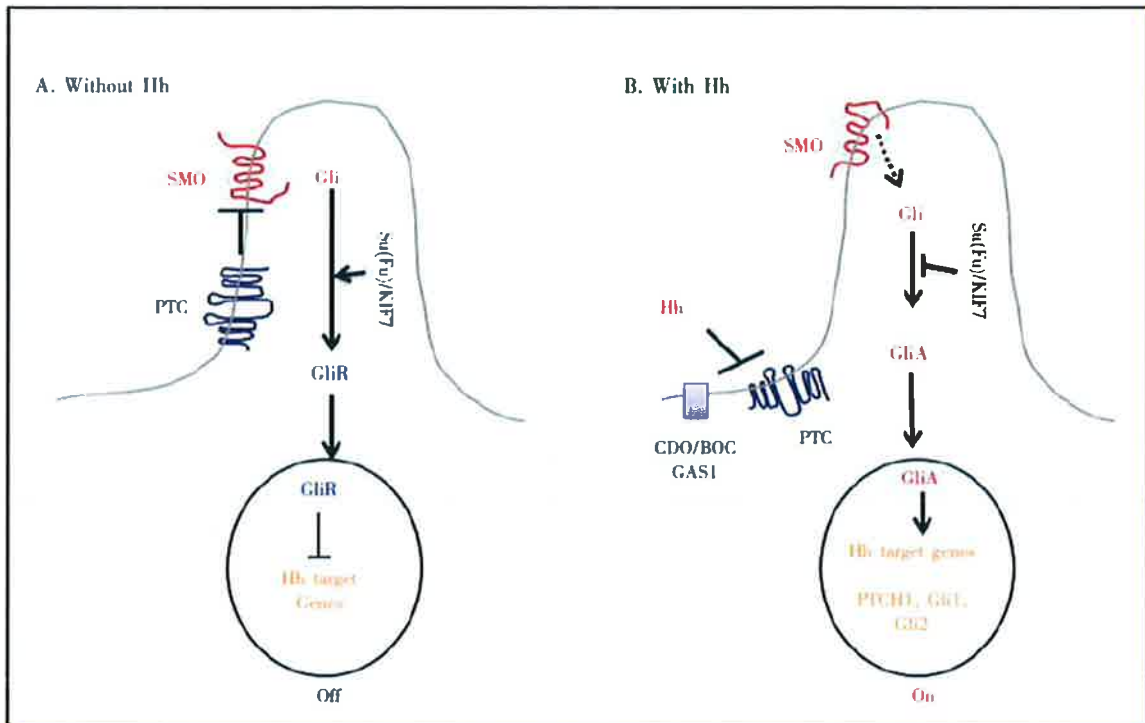


Figura 3. Un modelo simplificado para la señalización Hh en células de mamíferos. SMO es el transductor de señal clave de la vía Hh. A, en ausencia de los ligandos Hh, se cree que el receptor PTC está localizado en el cilio para inhibir la señalización SMO. Las moléculas de Gli se procesan con la ayuda de las moléculas Su (Fu) / KIF7 en formas represoras, que desactivan la vía de señalización Hh. B, en presencia de Hh, se piensa que PTC es transportado fuera del cilio y es incapaz de inhibir SMO. Los co-receptores de ligandos Hh incluyen CDO, BOC y GAS1. La recepción de Hh promueve el cambio conformacional SMO, facilitando la activación de Gli (GMA), estimulando la expresión del gen diana Hh. Este proceso puede ser inhibido por KIF7 y Su (Fu). (Los reguladores positivos están en rojo, los reguladores negativos están en azul y los genes están en naranja.) (103).

La vía de Hh incluye las tres proteínas secretadas, los ligandos Dhh, Ihh y Shh, que se unen al receptor Patched, el cual libera a Smo. Éste permite que el factor de transcripción de la familia Glioma (Gli) se traslade al núcleo activando la expresión de una variedad de genes, tales como: BMP4, FOXA2, FOXM1.

La vía del Hh está activada de forma aberrante en el cáncer, sea por mutación de Patched y de Smo, sea por sobreexpresión de ligandos, como el Shh en el caso del cáncer de páncreas. Así, las células del adenocarcinoma de páncreas producen ligandos Shh, que actuando de forma paracrina, liberan al Smo del control por parte de Patched (108).

Además, los ligandos Shh, secretados por el tumor, actúan sobre los fibroblastos de la matriz peritumoral favoreciendo la formación del estroma fibrótico. En modelos animales de cáncer de páncreas, la inhibición de la vía del Hh produce una disminución de la fibrosis peritumoral y de esta forma se aumenta la supervivencia del animal (109). Aparece una mayor vascularización en el área fibrótica lo que permitirá que la acción de la quimioterapia sea más eficaz.

Los fibroblastos del cáncer de páncreas presentan una mayor expresión de SMO que los fibroblastos no tumorales, como se ha descrito en trabajos de investigación importantes (110).

Actualmente hay varios ensayos clínicos con inhibidores de la vía del Hh en el cáncer de páncreas (103).

Se ha constatado un nexo entre las señales del Hh y la transición epitelio-mesenquimal (TEM) porque actúan sobre la morfogénesis de tejidos embrionarios y adultos. Recientemente, ambas señales han estado implicadas en tumores malignos. Algunos genes relacionados con el mesénquima, como el SIP1, fueron activados por Gli1 Sin embargo, poco se sabe de las señales Hh y TEM. Estos hallazgos sugieren que la expresión génica mesenquimal de las células indiferenciadas se mantiene o se refuerza en las células cancerosas mediante señalización Hh (111).

En el caso del cáncer de páncreas uno de los genes que presentan mayor sobreexpresión es el colágeno 11A1. La proteína Col 11A1 juega un papel primordial en las metástasis del cáncer de páncreas. La detección de proCOL11A1 a través de la inmunohistoquímica permite una distinción muy precisa entre pancreatitis aguda y cáncer de páncreas. El anticuerpo anti-proCOL11A1 es negativo en las células estromales del páncreas normal y casi ausente en la inflamación benigna. Estos resultados sugieren fuertemente que proCOL11A1 es un marcador específico para el cáncer de páncreas (112).

Actualmente, se cree que la aparición de las células con la capacidad de generar metástasis es independiente de la evolución del tumor y, de hecho, parece que puede darse en las primeras fases del proceso tumoral, incluso en las lesiones precancerosas

Papel específico de Hh en el cáncer de páncreas:

Las alteraciones en la señalización del Hh se han demostrado en varios tipos de cáncer humano. Las mutaciones en la línea germinal que afecta a la vía del Hh se asocia a trastornos de desarrollo, pero también mutaciones somáticas que activan la vía de Hh se asocian a múltiples tumores humanos (113).

Varias líneas de evidencia apoyan la idea de que la señalización de hedgehog tiene un papel en el mantenimiento y la progresión del cáncer de páncreas. La Gli 1 promueve la migración celular y la invasión de células pancreáticas (114). La vía Hh se sobreexpresa en la mayoría de los tumores pancreáticos, la expresión y la importancia de Shh en el adenocarcinoma de páncreas ha sido investigado. Se encontró un nivel más elevado de expresión de Shh en los tejidos de adenocarcinoma de páncreas que en tejido pancreático normal (115). La señalización de la vía está involucrada en el mantenimiento de las células madre que están implicadas en las metástasis sistémicas del cáncer de páncreas. Se ha encontrado en los fibroblastos del estroma del adenocarcinoma de páncreas una sobreexpresión de algunos de estos genes, se sobreexpresa el SMO que junto con Shh activa la expresión de Gli1 y promueve la proliferación de más fibroblastos (110). Por ello, los cánceres de páncreas tienden a tener un estroma fibroso que comprime extrínsecamente la vascularización del tumor, lo que da resistencia de los fármacos (116). El estudio de Shh y SMO puede ayudarnos en el futuro para encontrar un diana más eficaz en el cáncer de páncreas.

Se demuestra, mediante un modelo de xenotrasplante de cáncer de páncreas, como el bloqueo terapéutico de la vía Hh elimina las células madre del cáncer, mejora los resultados y puede efectuar una cura cuando se combina con gemcitabina. Estudios recientes y el uso de un modelo de ingeniería genética en el cáncer de páncreas, demostraron cómo un inhibidor de molécula pequeña de SMO, IPI-926, aumenta la supervivencia cuando se utiliza en combinación con gemcitabina en un modelo ratón. Por una parte, existe una reducción notable en la reacción fibrosa densa que acompaña a estos tumores y aumenta la neovascularización de estos tumores, lo que facilita la distribución de gemcitabina a las células malignas. Estos estudios también nos ayudan a entender la importancia del estroma en el cáncer de páncreas y la idea de que eliminando el estroma mejora la administración de fármacos y efectos terapéuticos.

La vinculación de la activación de la señalización de Hh a una variedad de cánceres humanos y el descubrimiento de nuevos inhibidores de la señalización Hh ofrece oportunidades para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer. Sin embargo, la falta de comprensión de los mecanismos moleculares para la vía Hh, la identificación de los tipos de tumores adecuados para la aplicación terapéutica, la necesidad de modelos fiables y reproducibles de ratón para optimizar la dosis de los fármacos y minimizar los efectos secundarios así como nuevas estrategias para disminuir la resistencia a los fármacos, constituyen varios retos importantes que deben ser superados para la aplicación clínica.

1.2.3. Proteína recombinante BMP-7

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son una familia de proteínas capaces de inducir material óseo. Son moléculas diméricas pertenecientes a la familia de factores de crecimiento beta, se han identificado hasta 20 tipos diferentes. Múltiples estudios se centraron en la función de BMP-7 (117), como factor para inducir hueso, cartílago y tejido conjuntivo. Son un potente factor de diferenciación osteoblástica, que inducen la diferenciación de las células mesenquimales y células precursoras de osteoblastos (118, 119, 120). Los potenciales terapéuticos del BMP-7 han sido ampliamente estudiados tanto en animales como en ensayos clínicos de seres humanos (121,122). Debido al buen resultado de BMP en ortopedia, ha dado lugar a la comercialización de BMP-7 recombinante humana.

A pesar de los estudios contradictorios, los investigadores creen que las BMP podrían tener un doble papel en la carcinogénesis. Por un lado, el BMP-7 inhibe la proliferación y la invasión de células tumorales en el cáncer de mama, próstata, riñón y pulmón (123). Sin embargo, aumentan la latencia del tumor en el sitio metastásico (124). Estudios “in vitro” demuestran que la BMP-7:

- Cambia la morfología de los fibroblastos y disminuye la migración de los mismos.
- Inhibe la transición epitelio-mesenquimal (TEM) al contrarrestar la acción de los TGF- β .
- Induce la transición mesénquima-epitelial por disminuir la expresión de los marcadores mesenquimales.

Por lo anterior mencionado, la proteína recombinante BMP-7 puede ser útil en el tratamiento del cáncer de páncreas.

1.3. MODELO ANIMAL

Actualmente los modelos genéticos del ratón se están convirtiendo en la herramienta para la comprensión de la importancia del efecto del estroma en la carcinogénesis pancreática.

Durante el último siglo los ratones se han empleado como modelo animal de cáncer (125). En la actualidad hay cuatro áreas de investigación sobre el cáncer usando modelos de ratón: biología básica y fisiología, terapias experimentales, prevención y susceptibilidad y riesgo genético. Se utilizan porque se ha demostrado que estos modelos pueden ser útiles para validación de la función genética, caracterización de nuevos genes cancerígenos, biomarcadores de tumores y tumorogénesis (126).

Los modelos de xenotrasplante en ratón se usan para estudios preclínicos (127). Estos xenotrasplantes se realizan mediante inyección en el órgano del ratón de células tumorales humanas cultivadas in vitro o trasplante de masa tumoral humana directamente en el animal. Los modelos de ratón para xenotrasplante de cáncer de páncreas dependen de los requisitos experimentales. Se utilizan ratones inmunocomprometidos para que acepten el xenotrasplante, como los ratones desnudos

atímicos o con inmunodeficiencia gravemente comprometida, SCID (128). Los ratones SCID, son homocigotos para el gen recesivo mutante “scid” que se localiza en el extremo centromérico del cromosoma 16, son defectuosos en el gen de la inmunoglobulina y el receptor de células T, por lo tanto carecen de células maduras B y linfocitos T (129). A través de los xenotrasplantes en este tipo de ratón inmunodeprimido se han descubierto nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Las ventajas de trabajar con xenotrasplantes de tumor son que presentan la complejidad y anomalías epigenéticas del tumor humano, ayudan en el desarrollo de enfoques terapéuticos moleculares y pueden implantarse ortotópicamente para reproducir el entorno en el cual el tumor crece (130).

Los dos tipos principales de xenotrasplante, utilizados en el estudio del cáncer de páncreas, son el heterotópico y el ortotópico, los cuales se diferencian por la localización del injerto implantado.

- A. Xenotrasplante heterotópico: El más frecuente de este tipo es el subcutáneo, las células se inyectan entre la dermis y el músculo del ratón a nivel del flanco izquierdo. Durante años en la investigación preclínica ha sido el más utilizado debido a que son más baratos, rápidos y reproducibles. Se ha empleado para multitud de estudios sobre fármaco diana en el cáncer, estudios de gemcitabina (131) y otros bloqueadores (132) obteniendo buenos resultados y otras opciones potenciales del tratamiento del cáncer de páncreas. Existen inconvenientes ya que la célula tumoral no crece en el órgano animal similar al humano y tienen poco impacto en la práctica clínica (133), por ello los xenotrasplantes ortotópicos se utilizan más en la investigación clínica.

- B. Xenotrasplante ortotópico: En este modelo se implanta un slice tumoral o inyectan células tumorales en el órgano equivalente del que se ha originado el cáncer en el humano, en el caso del cáncer de páncreas en la cabeza del páncreas del ratón. Es más real la interacción del tumor-huésped para aparición de enfermedad metastásica, sitio específico de la terapia, expresión de los genes

específicos y los escenarios clínicos. Las principales desventajas son que la realización de un xenotrasplante ortotópico es más laboriosa, técnicamente desafiante, cara, y requiere cicatrización y recuperación más larga en el tiempo (134). Existen algunos estudios que intentan reducir el tiempo postoperatorio con la inyección de células tumorales guiada por ecografía para minimizar la cicatrización o el control de metástasis por RM, pero conlleva un costo adicional muy importante (135).

Tabla VI. Comparación de los distintos modelos animales en el cáncer de páncreas humano.

Modelo animal	Coste	Tiempo consumido	Enfoque clínico	Reproducibilidad clínica
Transgénico	++++	++++	+	++++
X. Heterotópico	+	+	++++	+
X. Ortotópico	++	++	+++	++

Debido al beneficio reducido, en el tratamiento de cáncer de páncreas, del uso único con el agente terapéutico de gemcitabina, intentamos mediante el modelo de xenotrasplante ortotópico de cáncer de páncreas en la investigación preclínica mejorar el desarrollo de terapias para este tipo de cáncer. En un futuro animales transgénicos serán los utilizados para intentar resolver y mejorar algunas limitaciones de hoy día (136).

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de páncreas hoy día sigue siendo una patología con un pronóstico muy malo, con un diagnóstico tardío en la mayoría de los casos y un tratamiento muy limitado.

Es preciso estudiar nuevas líneas de tratamiento, con nuevas dianas terapéuticas, sobre las que actuar y mejorar la medicina en este tipo de tumores tan agresivos, y que en muchas ocasiones nos faltan herramientas para actuar frente a ellos.

Nuevas investigaciones sobre la biología molecular de los tumores nos ayudan a poder trabajar en nuevas vías de tratamiento, siempre intentando conseguir conocer más de los mecanismos de progresión del cáncer. De este modo, si conseguimos entender y tener estudiado el comportamiento de esas células tumorales que proliferan y migran a otros tejidos, conseguiremos los medios para poner freno a esa progresión.

Se plantea este trabajo de tesis doctoral en el Hospital Universitario Central de Asturias para investigar, en nuestro campo de la cirugía y el contacto con el cáncer de páncreas, y poder conseguir nuevas terapias, gracias al apoyo del modelo animal.

Utilizar el modelo animal de ratón para nuestra tesis nos ha permitido un estudio experimental del trabajo mencionado.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPÓTESIS CONCEPTUAL

El estroma, y más concretamente los fibroblastos peritumorales, influyen en el desarrollo del cáncer de páncreas.

3.2. HIPÓTESIS OPERACIONAL PRINCIPAL

Asociando fibroblastos peritumorales humanos a una línea tumoral de cáncer de páncreas se conseguiría un modelo animal agresivo de cáncer de páncreas, útil para ensayar nuevas terapias.

3.3. HIPÓTESIS SECUNDARIA

Teniendo en cuenta que la proteína BMP-7 inhibe la transición epitelio-mesenquimal podría aplicarse para el tratamiento del cáncer de páncreas.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. PRIMER OBJETIVO

Analizar la influencia de los fibroblastos peritumorales en el crecimiento local e invasión del cáncer de páncreas humano:

- “In vitro” por medio de cocultivos de fibroblastos peritumorales con las células tumorales del cáncer de páncreas humano.
- “In vivo” por medio de xenotrasplantes de células tumorales de cáncer de páncreas con/sin fibroblastos peritumorales.

4.2. SEGUNDO OBJETIVO

Estudiar la expresión de genes implicados en la vía erizo (hedgehog) en el cáncer en el modelo animal de cáncer de páncreas.

4.3. TERCER OBJETIVO

Analizar la eficacia de la proteína BMP-7 en los xenotrasplantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

La tesis se basa en el trabajo de investigación realizado en el Bioterio de la Universidad de Oviedo con protocolos de actuación y la aportación del Hospital Universitario Central de Asturias. Describo de forma detallada cada uno de los protocolos que se han seguido y el trabajo de campo.

5.1. LINEA CELULAR TUMORAL DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANO

Se eligió la CAPAN-1 por ser más representativa del adenocarcinoma ductal de bajo o moderado grado, como son la mayoría de los casos clínicos. Se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC).

CAPAN-1: Capan-1 es una línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático humano. Estas células crecen en cultivo de tejido adherente y muestran morfología epitelial. En cultivo, estas células son capaces de invadir a través de una matriz extracelular, como Matrigel. Las células Capan-1 son resistentes al 5-fluorouracilo, que recuerdan al tumor original del que se derivaron. Forman tumores mal diferenciados cuando se inyectan en ratones inmunocomprometidos. Además otra característica es que albergan una sola supresión de pares de bases en el alelo BRCA2, lo que da lugar a la expresión de una proteína truncada y disfuncional. Además, tienen una mutación oncogénica en K-Ras (G12V) y una mutación inactivante en p53. Expresan niveles elevados del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y no expresan la proteína SMAD4 (es decir, SMAD4-null). Las células Capan-1 son útiles tanto como un modelo de xenoinjerto para el cáncer pancreático como un sistema celular para estudiar los efectos de la deficiencia de BRCA2 (137, 138, 139).

5.2. MUESTRAS QUIRÚRGICAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

5.2.1. Recogida de datos

Para realizar el trabajo contamos con las muestras quirúrgicas de pacientes intervenidos, en el Hospital Universitario Central de Asturias, de cáncer de páncreas. Siempre con el consentimiento del paciente y la colaboración del cirujano (Cirugía General y Aparato Digestivo), personal de quirófano y servicio de Anatomía patológica. El paciente seleccionado como posible donante de muestra quirúrgica para nuestro estudio firma un consentimiento informado que explica y se le explica al paciente que se va a utilizar su tejido para trabajos con fines de investigación, el paciente debe saberlo y firmarlo si está de acuerdo una vez que ha recibido toda la información. Este consentimiento escrito de los pacientes y nuestro proyecto pasan lo primero de todo por el Comité de ética del Hospital Universitario Central de Asturias.

Cada muestra quirúrgica de nuestro estudio es recogida de quirófano de un paciente intervenido de cáncer páncreas, anotamos la identificación del paciente (número de historia clínica), la fecha de la intervención, la ubicación del tumor descrita en las pruebas de imagen preoperatorias y el estadio (según el TNM) de la enfermedad en la hoja de protocolo. Marcamos en nuestra hoja de protocolo las muestras almacenadas para nitrógeno líquido y para cultivo, del tejido pancreático normal, peritumoral y tumoral.

Dejamos reflejado el diagnóstico definitivo por parte del estudio de anatomía patológica y el estadio tumoral final del paciente, se adjunta a la hoja de protocolo una copia del informe anatomo-patológico.

Como últimos dos pasos para la recogida de datos tenemos la confirmación de los cultivos, saber si nuestras muestras recogidas y enviadas al banco de tejido han crecido o se han contaminado los cultivos, diferenciamos entre los cultivos para fibroblastos de tejido normal, peritumoral y tumoral. Y por otro lado anotar el destino final de los

cultivos y de las muestras para inmunohistoquímica, xenotrasplante, expresión de genes y western-blot.

Con este sistema de hoja de recogida como protocolo nos aseguramos tener perfectamente numerada e identificada cada muestra y su destino final en el trabajo de investigación.

5.2.2. Traslado de la pieza quirúrgica a anatomía patológica

El trabajo realizado para llevar a cabo nuestro proyecto está coordinado entre servicios y personas, los viernes con el parte quirúrgico de la semana próxima, del servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo, se decide de qué pacientes se van a extraer las muestras quirúrgicas. Se avisa del número de pacientes y el día de las intervenciones para preparar los materiales necesarios en el servicio de anatomía patológica, banco de tejidos y la parte del nitrógeno líquido.

El día de la intervención estamos pendientes de la cirugía para saber si el tumor de páncreas del paciente que hemos seleccionado es extirpable o no, ya que el hallazgo en el quirófano de tumor irresecable es posible, y así poder comunicarlo al resto. Si es resecable y nos va a servir como muestra del trabajo avisamos para preparar el nitrógeno líquido y lo vayan llevando a anatomía patológica, que es el lugar al que trasladamos la pieza quirúrgica extirpada. Con la hoja del protocolo de recogida de datos, que he descrito previamente, cumplimentada.

Para trasladar la pieza quirúrgica, en este caso el páncreas resecado, al servicio de anatomía patológica preparamos una cubeta metálica con seis bolsas de 250 ml de suero salino que van a permanecer en el congelador hasta que se extirpe la pieza. Además, del paciente, obtenemos suero en dos tubos de tapón rojo.

Cuando se ha extirpado la pieza quirúrgica nos avisan y vamos al quirófano a recibirla para ponerla inmediatamente en la cubeta, rodeada de las bolsas de solución salina y trasladarla a anatomía patológica lo más rápido posible, pasarán menos de veinte minutos.

5.2.3. Obtención de muestras para cultivo y conservación en nitrógeno líquido

Una vez que ha llegado la pieza quirúrgica al servicio de anatomía patológica, se avisa al responsable para que junto a él podamos tomar las muestras que necesitamos para nuestro estudio, es muy importante saber que en ningún momento se altera la pieza quirúrgica en cuanto a su estudio anatomo-patológico por eso nos ayuda el responsable y nos indica que muestra podemos obtener.

En la mesa de recepción de muestras, de forma aséptica, se extrae la pieza quirúrgica de la cubeta en la cual la hemos transportado desde quirófano y con un bisturí se escindirá primero el tejido normal de páncreas, luego la zona peritumoral y, finalmente, la zona tumoral. Todo ello con comprobaciones histológicas.

Nuestras muestras, van destinadas a distintos fines de cultivo, estudio inmunohistoquímico, expresión de genes y xenotrasplantes. Lo primero se obtiene tejido de 2-3 mm para conservar en nitrógeno líquido, tres crioviales de tejido pancreático normal, tres de tejido peritumoral y otros tres de tejido tumoral. Los crioviales se introducen rápidamente en la lechera de nitrógeno líquido junto a los dos tubos de suero del paciente y son trasladados al servicio de inmunología.

Seguido a esto, cambiamos de bisturí para obtener otras tres muestras de tejido pancreático, normal, peritumoral y tumoral, que por el mismo orden ponemos en tres tubos de ensayo con el líquido de conservación para el servicio de anatomía patológica.

Por último y solo si se ha decidido hacer con ese tejido xenotrasplantes en ratones con slice (1-2mm) de tejido pancreático debemos obtener tres láminas de tejido pancreático tumoral para conservar en líquido hasta el trasplante que realizaremos pocas horas después.

En esta fase y para que todo esté perfectamente identificado antes de que cada muestra pase al servicio destinado para el estudio, se comprueba que la hoja del protocolo de recogida de datos esté bien.

5.3. CULTIVOS

5.3.1. Cinética de crecimiento

En nuestra tesis ante la realidad de que la interacción de las células tumorales y el estroma que les rodea juega un papel crítico en el crecimiento tumoral, la capacidad para metastatizar y la quimiorresistencia, así como evidencias experimentales “in vitro” de que el potencial invasivo de las células tumorales puede verse aumentado cuando dichas células se cocultivan con fibroblastos estromales, decidimos aislar las células (fibroblastos) tanto de la zona tumoral como peritumoral de nuestras muestras quirúrgicas de páncreas para valorar el crecimiento “in vitro” de ambos grupos celulares y el efecto de ambos tipos celulares sobre la proliferación de una línea celular tumoral de cáncer de páncreas humano (células CAPAN 1).

Las biopsias se obtuvieron como previamente se describe y se transportaron hasta el laboratorio en RPMI-1640 Medium (Gibco, Invitrogen) suplementado con antibióticos (Amikacina y Vancomicina, 40 µg / ml).

Las biopsias se cortaron en pequeños fragmentos utilizando tijeras. Los fragmentos fueron digeridos enzimáticamente con colagenasa (Type I 2 mg/ml) entre 1-2 horas. Después de la digestión, la solución de colagenasa se centrifuga a 400 g durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% Suero Bovino Fetal (SBF, Gibco, Invitrogen), amikacina y vancomicina (40 µg / ml).

Los fragmentos restantes se sometieron a una segunda digestión con 0.05% tripsina y 0.02% EDTA (T/E, Gibco, Invitrogen) entre 30-60 minutos. La solución de T/E se recogió en un tubo y se inactivó con la misma cantidad de medio de cultivo, Se centrifugó a 400g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en medio.

Las células obtenidas tanto de la colagenasa como de la tripsina se sembraron en una placa de 6 pocillos con medio de cultivo y se mantuvieron a 37°C y un 5% de CO₂. EL medio se cambió cada 3 días.

Cuando los cultivos primarios fueron confluentes, las células se lavaron 2 veces con PBS y se trataron con T/E hasta que se despegaron completamente de la superficie de la placa. La T/E conteniendo las células se neutralizó con medio de cultivo y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo y las células se sembraron doblando la superficie inicial.

Cultivos subconfluentes (entre el 70-90% de confluencia) de pases bajos (entre el pase 2 y el pase 6) fueron utilizados para los experimentos: inmunohistoquímica, xenotrasplantes y criopreservación.

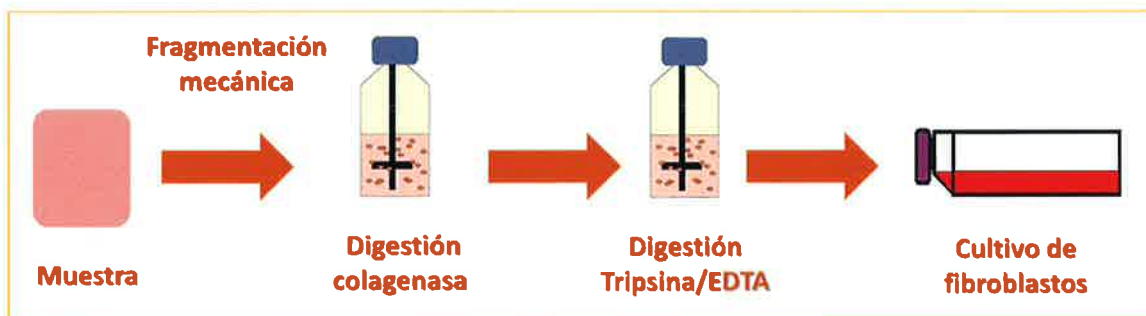


Figura 4. Esquema gráfico de cultivo y crecimiento de fibroblastos.

En el banco de tejidos para los xenotrasplantes las células fueron despegadas de la superficie de cultivo mediante T/E a 37°C. Las separamos en tres grupos:

- a) Células tumorales solas (1 x 10⁶)
- b) Células tumorales con células peritumorales (ratio 2:1)
- c) Células tumorales con células normales (ratio 2: 1)

Todas las suspensiones celulares, incluyendo las mezclas de células, fueron suspendidas en 50 µl de PBS.

El excedente de células se congeló usando DMEM +10%SBF + 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide) como crioprotector. Los crioviales se mantuvieron a -80°C durante 24 horas y posteriormente se pasaron al tanque de nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo.

Los cocultivos se realizaron para valorar el efecto de las células obtenidas de las muestras normales y peritumorales sobre la proliferación de la línea celular CAPAN mediante el cocultivo en transwell (6-well type, high-density membrane with 0.45 mm pore; Millipore). Como control se tomó el crecimiento de las células CAPAN solas.

Las células CAPAN se sembraron en la parte inferior del transwell (50.000) mientras que las células normales o peritumorales se sembraron en la parte superior. Se sembraron el mismo número de células en cada pocillo (10.000), para posteriormente poder cuantificarlas.

5.3.2. Morfología celular

Tinciones celulares:

El Servicio de Anatomía Patológica (Dra. Carmen García Pravia) realizó las tinciones convencionales de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de las muestras quirúrgicas que posteriormente se utilizarían ya para trasplantes, ya para obtener cultivos de fibroblastos. El estudio histopatológico de los animales fue realizado en la Unidad de histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer del Instituto Universitario del Principado de Asturias (Dra. María Teresa Fernández García).

Se utilizaron cuatro anticuerpos para estas tinciones (Tabla VII). La tinción se realizó de forma totalmente manual y con el sistema de detección Dako En Vision TM FLEX+, Mouse, High pH. Los pasos a seguir de las tinciones están protocolizados según llegan las muestras al servicio.

Tabla VII. Resumen de los anticuerpos empleados en las tinciones.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Tiempo incubación	Especificidad
DMTX1	1E8 33	Oncomatrix	1/400	30min	Monoclonal/Mouse
Vimentina	V9	Biogenex	1/400	15min	Monoclonal/Mouse
Ck7	OV-TL 12/30	Dako	Ready to use	20min	Monoclonal/Mouse
SMA	1 A4	Dako	Ready to use	20min	Monoclonal/Mouse

Los anticuerpos que tiñen a los fibroblastos son el DMTX1, la Vimentina y el SMA. Los que tiñen a la célula epitelial tumoral es el Ck 7.

Inmunocitofluorescencia de los cultivos y microscopia confocal:

Las células cultivadas obtenidas de las muestras quirúrgicas se fijaron en acetona a -20°C durante 10 minutos, se secaron a temperatura ambiente y luego se lavaron en Dako buffer durante 30 minutos. Las muestras se incubaron con los anticuerpos monoclonales en las condiciones especificadas en la Tabla VII. Como anticuerpos secundarios se usaron el verde y el rojo, ambos de anti-conejo Alexa-546 (1:500, Invitrogen), durante una hora a temperatura ambiente. Por último, las secciones se montaron en un medio conteniendo DAPI (Vector Labs).

La doble tinción (proCOL11A1 vs. VIM, proCOL11A1 vs. CK7, proCOL11A1 vs. SMA y VIM vs. CK7) se visualizó y fotografió con Leica TCS SP2 microscopio confocal a 63X y 100X, con las siguientes fuentes de excitación de cada fluorocromo: Argón/Krypton laser (488 nm), Helium/Neón laser (546 nm) y azul-violeta Diodo (405 nm).

5.4. EXPRESIÓN DE GENES

5.4.1. Introducción

El análisis de la expresión de genes se encargó a la empresa Progenika Biopharma. El análisis de expresión de genes por PCR cuantitativa se ha realizado utilizando la tecnología de Fluidigm (www.fluidigm.com).

El sistema BioMarck de Fluidigm utiliza la tecnología TaqMan para la detección del producto amplificado por PCR. La detección con sondas TaqMan se basa en la utilización de un fragmento de DNA (sonda) complementario a una parte intermedia del DNA que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la DNA polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR

será proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando y a su vez también proporcional a la cantidad de RNA que existe en la muestra.

Los Assays de Applied Biosystems: los ensayos TaqMan o Assays de Applied, se denominan con un código de letras y números con el siguiente significado:

- Dos letras indicativas de la especie en estudio. Hs para indicar Humano y Mm para ratón.
- Un código numérico a modo de identificador del Assay.
- Un sufijo con un significado de acuerdo a lo expuesto en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Significado del sufijo de los Assays.

Sufijo del Assay	Posición del Assay
"_m"	La sonda se localiza entre las uniones de dos exones y no detectará DNA genómico.
"_s"	Los cebadores y las sondas están localizadas en un único exón por lo que detectará DNA genómico.
"_g"	Los cebadores y las sondas pueden localizarse en un exón, por lo que podría detectar DNA genómico.

El proceso de selección de los Assays de Applied se ha realizado entre los técnicos de Progenika y los investigadores a partir de la lista de genes de interés. Para cada uno de los genes, utilizando la aplicación disponible en la página web de Applied Biosystems, se ha seleccionado el ensayo más adecuado, priorizando siempre el ensayo recomendado por Applied Biosystems. Además, se ha priorizado aquellos ensayos en que se garantizase la no hibridación con RNA de ratón para los ensayos de humano. El objetivo es que solo amplifiquen los genes humanos procedentes del trasplante.

Tabla IX. La lista definitiva de Assays seleccionados.

Gen Humano	Assay ID
BMP7*	Hs00233476_m1
COL11A1	Hs01097664_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
GLI1*	Hs01110766_m1
PTCH1	Hs00181117_m1
PUM1	Hs00472881_m1
SHH	Hs00179843_m1
SMO	Hs01090242_m1

5.4.2. Muestras utilizadas

Se realizaron los experimentos de análisis de la expresión por PCR cuantitativa a partir de dos tipos de muestras: pellets celulares y biopsias.

Las biopsias se recogieron en el momento del sacrificio de los animales, en condiciones asépticas. Una vez recolectadas se introdujeron el nitrógeno líquido para garantizar la correcta conservación del ARN.

Las muestras procedentes de cultivos celulares de las líneas Capan-1 y los fibroblastos peritumorales caso 29 (FPT29) se despegaron de los frascos de cultivo (superficie de 75 cm²) mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm, dejando solo el pellet celular. Se realizaron varios lavados con PBS y las células se transfirieron a tubos eppendorf.

Ambos tipos de muestras se congelaron en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción del ARN.

En la Tabla X se indica la correspondencia de códigos de muestra del cliente y el utilizado en el procesamiento en Progenika.

Los tejidos procedentes de biopsias de ratones receptores de trasplantes se han codificado de la siguiente manera:

- RCxxT receptor de Capan-1 (tumoral)
- RFxxN receptor de FPT (normal)
- RSCx ratón sano control
- RCFxxT receptor de Capan-1 y FPT (tumoral)

Tabla X. Codificación de muestras.

Código PGK	Código cliente	Tipo de muestra
15SE1473	RC11 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1474	RC12 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1475	RC13 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1476	RC14 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1477	RF11 N	Tejido páncreas no tumoral ratón
15SE1478	RF12 N	Tejido páncreas no tumoral ratón
15SE1479	RF13 N	Tejido páncreas no tumoral ratón
15SE1483	RSC1	Tejido páncreas ratón sano
15SE1484	RSC2	Tejido páncreas ratón sano
15SE1485	RCF11 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1486	RCF12 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1487	RCF13 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1488	RCF14 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1489	RCF15 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1490	RCF16 T	Tejido páncreas tumoral ratón
15SE1497	Capan-1	Pellet celular seco en eppendorf conservado a -80°C
15SE1498	Capan-1	Pellet celular seco en eppendorf conservado a -80°C
15SE1501	FPT29	Pellet celular seco en eppendorf conservado a -80°C
15SE1502	FPT29	Pellet celular seco en eppendorf conservado a -80°C
15SE1503	FPT29	Pellet celular seco en eppendorf conservado a -80°C
15SE1504	FPT29	Pellet celular seco en eppendorf conservado a -80°C

5.4.3. Chequeo de la calidad y la cantidad de las muestras

El ARN total de los pellets celulares se extrajo utilizando el kit RNeasy Mini kit (Qiagen). Para las biopsias se realizó pulverización del tejido congelado en nitrógeno líquido, para evitar la descongelación de la muestra y se extrajo el ARN mediante el kit RNeasy Mini kit (Qiagen). En ambos casos, se hizo tratamiento con DNasa y se recuperó cada muestra en un volumen de 35 µl de agua.

La cantidad y calidad del ARN se estimaron mediante medida espectrofotométrica en Nanodrop y chequeo de una alícuota en Bioanalyzer (el valor RIN se refiere a la

integridad del RNA) (Tabla XI y Figura 5). Para todas las muestras se ha conseguido cantidad suficiente para el procesamiento con sondas TaqMan. Sin embargo, de las muestras provenientes de los pellet el ARN fue de mejor calidad, de hecho, 4 de los ARN provenientes de biopsias muestran una calidad bastante baja (RIN <5). Por ello se deberán evaluar los resultados de estas muestras con mayor prudencia, ya que la degradación del ARN de partida podría afectar a la detección y cuantificación del mARN.

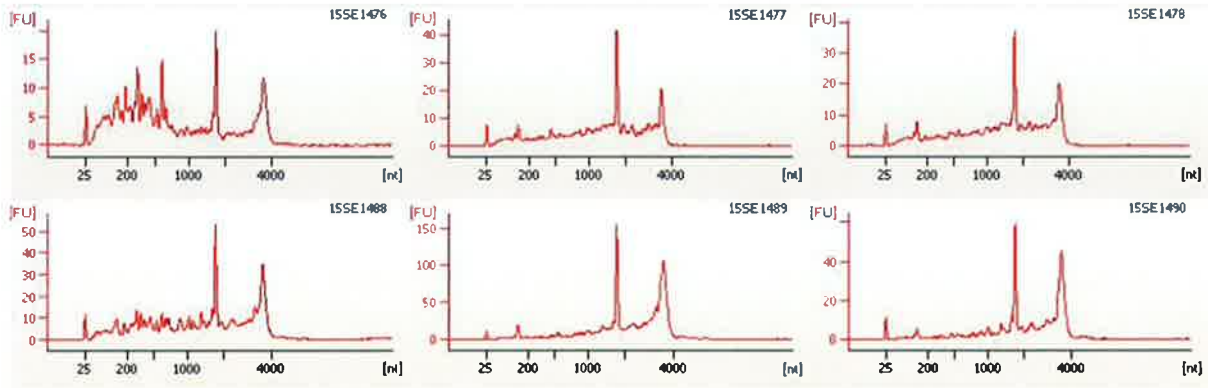


Figura 5. Ejemplo de chequeo de la integridad del ARN en Bioanalyzer.

Tabla XI. Medida de la concentración y pureza del ARN.

Muestra	Código cliente	ng/ μ l	A260/280	A260/230	Total μ g	RIN
15SE1473	RC11 T	1156,08	2,14	2,24	28,9	2,2
15SE1474	RC12 T	191,42	2,08	2,17	4,8	8,1
15SE1475	RC13 T	1335,1	2,14	2,23	33,4	2,3
15SE1476	RC14T	760,08	2,14	2,23	19,0	5,9
15SE1477	RF11N	732,21	2,18	0,53	18,3	5,6
15SE1478	RF12N	2352,7	2,1	2,23	58,8	6,1
15SE1479	RF13N	3066,68	2,04	2,22	76,7	5,8
15SE1483	RSC1-P1	552,77	2,19	1,25	13,8	5,3
15SE1484	RSC2-P2	2161,03	2,11	2,15	54,0	5,7
15SE1485	RCF11T	333,19	2,1	2,3	8,3	2,3
15SE1486	RCT12T	202,31	2,09	1,85	5,1	6,6
15SE1487	RCF13T	253,97	2,09	2,17	6,3	7,7
15SE1488	RCF14T	235,27	2,08	2,19	5,9	5,9
15SE1489	RCF15T	375,51	2,06	2,05	9,4	7,4
15SE1490	RCF16T	121,84	2,11	2,19	3,0	7,8
15SE1497	Capan-1	1904,81	2,09	2,23	47,6	9,3
15SE1498	Capan-1	2461,13	2,05	2,14	61,5	9,5
15SE1501+ 15SE1502	FPT29	250,36	2,06	2	6,3	8,3
15SE1503+ 15SE1504	FPT29	76,11	2,08	0,75	1,9	8

5.4.4. Procesamiento de las muestras

A partir de 100 ng de cada una de las 19 muestras a analizar se ha sintetizado cDNA utilizando el kit AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Agilent Technologies), en un volumen final de 20µl. Se ha realizado una pre-amplificación previa a la qPCR utilizando el kit QIAGEN® Multiplex PCR Kit y el pool de todos los 20x TaqMan® Gene Expression Assays taqman assays. Se procesaron todas las reacciones de PCR en tiempo real en formato microfluídico; 1 array de Fluidigm 48.48.

El presente experimento consta de 19 muestras y 6 genes problema + 2 genes housekeeping (GAPDH y PUM1) para el genoma humano. Para conseguir el mayor provecho de todas las posiciones del array, las 12 primeras muestras provenientes de biopsias se colocaron por duplicado y los ensayos también fueron colocados en el array por duplicado.

Para la PCR se utilizó el kit TaqMan Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems, de acuerdo a las especificaciones facilitadas por el proveedor. Se incluyó agua como control negativo (NTC).

En total se obtuvieron 2016 puntos de resultado (48 pocillos de ensayos x 42 pocillos de muestras) y se disponen de 384 puntos control (reacciones sin muestra). Para cada muestra y ensayo se dispone de 2 o 4 réplicas técnicas, así 2 o 4 valores de Ct.

El archivo “DatosCt_QPCRLBarneo003.xlsx” contiene los valores de Ct debidamente ordenados y el cálculo del porcentaje de puntos sin amplificación detectada (Not Detected).

5.4.5. Análisis de datos

Se analizaron las muestras provenientes de humanos y se compararon con las procedentes de cultivos de células in vitro. A su vez se comprobó que estas muestras no amplificaban en los ratones sanos control (RSC1, RSC2).

El primer paso del análisis consistió en el cálculo del promedio de Cts de las réplicas técnicas disponibles, 2 o 4. Posteriormente se normalizaron estos datos aplicando el método deltaCt.

Como los genes housekeeping seleccionados (GADPH, PUM1) se comprobó que no son específicos de humano y detectan tanto humano como ratón, no se han podido usar para normalizar el resto de genes. Por ello, se han normalizado frente a la mediana de los genes específicos de cada especie (incluyendo los de expresión muy baja). Los datos normalizados frente a esta mediana están en el archivo “DatosNormalizados_QPCRLBarneo003”.

Cálculo de Fold change

Para el cálculo de los valores de FC (Fold Change) para cada una de las muestras problema frente a cada control. Así, en el análisis de los genes humanos se ha comparado cada grupo de ratones receptores con cada una de las dos líneas celulares. El archivo “FC_QPCRLBarneo003” recoge estos valores. El valor de FC indica sobreexpresión para valores >1 , que no hay cambio si $=1$ y represión en caso de ser <1 .

5.5. RATONES UTILIZADOS

5.5.1. Ratones SCID

Son ratones homocigóticos para el gen recesivo mutante “scid” que se localiza en el extremo centromérico del cromosoma 16. Estos ratones no tienen linfocitos funcionales maduros, y por tanto, son muy susceptibles a las infecciones oportunistas letales si no reciben tratamiento crónico con antibiótico. La ausencia de inmunidad B y T recuerda al síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID) en niños.

5.5.2. Ratones *nude*

Ratones con alelo mutante homocigoto recesivo pertenece del cromosoma 11, que aporta la característica que le dio el nombre a la mutación (*nude*), carecía de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos xenotrasplantados.

5.6. XENOTRASPLANTES

5.6.1. Procedimiento quirúrgico

Los ratones SCID o nude los pedimos a los laboratorios Harlan, son todos machos de 22-25 gramos de peso y de 4-6 semanas de vida, necesitan estar una semana para que se aclimaten al nuevo entorno, antes de trasplante. Durante esa semana los ratones están en cajas y se atenderán diariamente, anotando cualquier problema en la hoja de protocolo.

Nosotros tenemos nuestro material para realizar los xenotrasplantes, tanto material estéril, como caja de instrumental y fármacos anestésicos y analgésicos. Comprobamos que todo está correcto antes del día del trasplante.

En el día elegido para el trasplante pasamos a la sala con traje especial, calzas, guantes, gorro y mascarilla. Ponemos en funcionamiento la cámara de flujo laminar. Mientras aseguramos que el personal del Bioterio nos ha conseguido una caja individual para cada ratón que vamos a trasplantar, que tenemos comida para poner y agua con su sistema. Preparamos bajo la cámara de flujo laminar nuestro anestésico, analgesia, sistema de sujeción para el trasplante del ratón, instrumental y la nueva caja individual donde vamos a tener a los ratones trasplantados.

Trasladamos la caja donde tenemos a los ratones a cámara de flujo laminar y extraemos de uno en uno a los ratones para realizar el trasplante. Cuando extraemos al ratón de la caja lo pesamos en una báscula, que tenemos dentro de la cámara de flujo laminar. La anestesia es intraabdominal que inyectaremos al ratón en el flanco izquierdo que donde existe menos posibilidad de lesionar o pinchar una víscera, y se debe coger al ratón con la cola entre el cuarto y quinto dedo de nuestra mano y pechizando la parte occipital para poder darle la vuelta y no te muerda. Utilizamos Ketamina (100 mg/Kg) + Xylazina (20 mg/Kg) intraperitoneal.

Una vez anestesiado el animal lo pasamos a la mesa en la cual vamos a realizar la intervención, con las cuatro patas abiertas y sujetas, y le identificamos con un clip en la oreja.

Limpiamos el tórax y abdomen del animal con Betadine y después se afeita con maquina sin producir heridas en la piel del animal. Pintar de nuevo con Betadine y colocar gasas estériles. Para realizar la laparotomía del ratón utilizamos unas tijeras y pinzas finas hasta el xifoides siendo muy cuidadosos de no lesionar una víscera. Evisceramos el paquete intestinal con delicadeza e identificamos el estómago, el duodeno, el bazo y el páncreas (que en el ratón es una fina estructura pero que se distingue y se visualiza bien).

En este momento, nosotros para nuestro trabajo de investigación hemos realizado trasplante ortotópico por lo que inyectamos células tumorales en la cabeza del páncreas o un slice de páncreas humano al páncreas del ratón. En el caso de células tumorales, inyectamos lentamente, en unos 30 segundos, la solución de células tumorales (que previamente nos han dado desde banco de tejidos) en la cabeza de páncreas, a través de una aguja de 30G con jeringuilla de insulina. Al extraer la aguja presionamos inmediatamente la zona con suavidad durante 1 minuto, para evitar el posible hematoma. Y en el caso de un slice de páncreas se sutura a la cabeza de páncreas con un hilo irreabsorbible muy fino (prolene de 5/0).

Comprobamos que todo está bien antes de recolocar las vísceras en el abdomen y cerramos con una seda de 4/0 la laparotomía. Dejamos al ratón trasplantado, envuelto en gasas para regular la temperatura, en su caja con el agua y la comida.

En la caja de nuestro ratón trasplantado ponemos una etiqueta con los datos del ratón: sexo, peso, número de identificación del ratón día del trasplante, tipo de trasplante y si ha habido alguna incidencia.

Por último, nos aseguramos que el animal despierta y si no es así anotarlo en el protocolo, y observación diaria del ratón con tratamiento según el protocolo. Pesar cada 7 días y anotar en la hoja de tratamiento.

5.6.2. Necropsia

A los 21 días del xenotrasplante sacrificamos a los ratones objeto de estudio para obtener los resultados. La eutanasia la realizamos en el Bioterio en una sala distinta a la del xenotrasplante. El método que utilizamos es la dislocación cervical. Se coloca al ratón sujeto por las cuatro patas para poder examinar la cavidad abdominal, se realiza una incisión en “U” amplia abdominotorácica y se repliega el colgajo hacia la cabeza del animal.

Localizamos el bazo, el páncreas, el duodeno y el hígado, y se realiza la primera foto que abarque toda la cavidad abdominal con los órganos y el tórax.

Disecamos y se secciona en bloque el duodeno, páncreas y bazo con fotografía del tumor pancreático y medición del mismo. Se incluye el bloque en un bote con formal que más tarde llevamos a anatomía patológica.

Posteriormente pasamos a la extracción en bloque del paquete intestinal, riñón, hígado, diafragma y pulmones, también aquí medimos y anotamos las posibles lesiones metastásicas. Realizamos fotografía de la pieza previo a introducirlo en formol.

En esta hoja de protocolo, al igual que en las demás, nosotros hemos anotado cualquier incidencia o hallazgo que tengamos.

Los resultados los analizamos por visualización directa de las lesiones tanto del tumor primario como de los implantes y metástasis, medidos con regla y con fórmulas matemáticas. Y el análisis al microscopio y en el laboratorio de inmunohistoquímica. El volumen del tamaño del tumor: $Eje\ mayor \times (eje\ menor)^2 \times \pi/6$ en mm^3 .

5.6.3. Modelos animales de cáncer de páncreas humano

Modelo animal: ratón scid y nude

En investigación se utilizan los ratones como modelo animal. Se utilizaron dos tipos de ratones, los ratones nude (desnudos), por su carencia de pelo que están asociados a una deficiencia de la función tímica. Por una falta de linfocitos T estos ratones no rechazan piel o tumores de otras cepas y especies, incluso humanos. Y los ratones SCID

que tiene una mutación autosómica recesiva, como explicado en la introducción, por lo que son deficientes en la producción de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, y linfocitos B, productores de inmunoglobulinas y de la inmunidad humoral. Los ratones SCID son todavía más incapaces de diferenciar lo “propio” de lo “no propio” y de una manera más acentuada que los nude.

Lo primero fue saber qué tipo de ratón sería el más adecuado para nuestro estudio de los dos citados, comenzamos realizando xenotrasplante a ambos tipos de ratones y finalmente decidimos realizar el trabajo sobre los ratones SCID ya que mostraban en la necropsia un modelo de cáncer de páncreas humano más notorio que el ratón nude.

Ratones SCID

El objetivo principal de nuestro trabajo fue crear un modelo de animal en el cuál reproducir la enfermedad humana, en nuestro caso el cáncer de páncreas, y así poder, más tarde, utilizar tratamientos específicos. Los animales elegidos para realizar xenotrasplantes fueron los ratones SCID. La forma de crear este modelo animal con cáncer de páncreas humano fue mediante xenotrasplante de células CAPAN 1 (“línea celular de adenocarcinoma ductal de páncreas humano obtenida de ATTP”) y los fibroblastos peritumorales de nuestras muestras quirúrgicas.

Durante el año 2012 hicimos xenotrasplante ortotópico de ratones SCID con células CAPAN 1, fibroblastos peritumorales y slice de páncreas para recoger los resultados, y conseguir el modelo animal de cáncer de páncreas humano, en el mismo día se realizaban trasplantes del mismo modelo.

Comprobamos que teníamos los cultivos necesarios y el manejo de los ratones apropiado para realizar un nuevo modelo animal de cáncer de páncreas humano. Veinte xenotrasplantes ortotópicos, cada ratón con su hoja de recogida de datos como hemos explicado previamente. Dividimos en cuatro modelos a los veinte ratones, el modelo 1 compuesto por cinco ratones trasplantados con un millón de células CAPAN 1 en la cabeza del páncreas, el modelo 2 compuesto por otros cinco a los que se trasplantó un millón de células CAPAN 1 y cien mil fibroblastos peritumorales, el modelo 3 con cinco ratones con xenotrasplante ortotópico de slice de 1-2 mm de tejido pancreático humano, y como grupo control, cinco ratones con cien mil fibroblastos peritumorales.

Realizamos todos los trasplantes el mismo día para cada modelo, las células CAPAN 1 con o sin fibroblastos, los fibroblastos y los slice de páncreas los tienen preparados en el banco de tejidos en la solución para el momento del xenotrasplante. Los trasplantes los realizamos en grupos de cinco ratones, son una muestra homogénea en cuanto a las semanas de vida y el peso entorno a 22-25 g. Lo primero se identifican los ratones con un clip en la oreja y una caja para cada ratón, el procedimiento se realiza bajo la cámara de flujo laminar, como he explicado previamente. Reciben anestesia intraperitoneal con Ketamina y Xylazina (0,4ml según el peso del animal que previamente hemos calculado). Una vez anestesiados les ponemos en la tabla con las cuatro patas sujetas y realizamos la apertura del abdomen, como hemos explicado en el apartado anterior.

Modelo 1: cinco ratones fueron trasplantados con un millón de células CAPAN 1 en solución de 50 µl de PBS (phosphated buffer saline), mediante una jeringa de 30 G en la cabeza del páncreas del ratón. La solución nos la da el banco de tejidos en un vial que debe ser agitado antes de cargarla en la jeringuilla para que las células no sedimenten en el fondo.

Modelo 2: los siguientes cinco viales que nos facilitaron desde banco de tejidos para los siguientes cinco ratones son de un millón de células CAPAN 1 junto con cien mil fibroblastos peritumorales en solución de 50 µl de PBS que los trasplantamos exactamente igual que los anteriores en la cabeza del páncreas.

Modelo 3: cinco ratones trasplantamos con slice de 1-2 mm de páncreas humano, de las muestras quirúrgicas de nuestros pacientes. El slice de páncreas lo suturamos a la cabeza del páncreas del ratón con un prolene de 5/0.

Modelo 4: El grupo control también lo intervenimos ese día con cinco trasplantes de cien mil fibroblastos peritumorales en la cabeza del páncreas del ratón.

Todos los ratones con el procedimiento previamente explicado y la hoja de recogida de datos perfectamente detallada. La hoja de recogida de datos contiene el número de trasplante, con la fecha en la que realizamos los trasplantes, cada ratón con las células trasplantadas y la cantidad, si existe algún comentario del trasplante, una tabla con el día y el peso del ratón. Por último los datos obtenidos de la autopsia, sobre la medida del tumor primario, la presencia o no de metástasis y la foto de los hallazgos.

Nosotros en este estudio y con estos ratones queríamos generar un modelo de cáncer de páncreas humano en ratones SCID usando células tumorales y fibroblastos peritumorales de muestras quirúrgicas. Y así conocer la función real de los fibroblastos peritumorales en la génesis del cáncer.

El sacrificio de los animales se realizó a los 21 días del implante. Y los resultados los analizamos junto al servicio de inmunología y anatomía patológica.

Ratones *nude*

También realizamos xenotrasplantes en ratones nude (de la casa comercial Harlan) con el objetivo de presentar resultados similares en ambos grupos de ratones de experimentación. Los pasos a seguir del xenotrasplante en este grupo son exactamente igual que los previos, ortotópico con la inyección de la células en la cabeza del páncreas del ratón. Los pasos, el protocolo y la técnica quirúrgica. Las células CAPAN 1 y los viales con los fibroblastos normales y peritumorales también nos los facilitaron desde nuestro laboratorio.

En este caso pedimos dieciocho ratones nude para distribuirlos al azar en tres grupos:

Grupo CAPAN: seis ratones a los cuales trasplantamos un millón de células CAPAN 1.

Grupo CAPAN + FN: seis ratones con xenotrasplante de un millón de células CAPAN 1 + cien mil fibroblastos normales.

Grupo CAPAN + FPT: seis ratones con trasplante de un millón de células CAPAN 1 + cien mil fibroblastos peritumorales.

5.7. TRATAMIENTO CON PROTEINA RECOMBINANTE BMP-7 EN XENOTRASPLANTE

Durante el año 2013 realizamos otro grupo de trabajo para analizar el tratamiento con BMP-7 en el modelo de cáncer de páncreas humano. El objetivo que buscamos fue analizar el efecto de la proteína recombinante BMP-7 en un modelo animal experimental de xenotrasplante de cáncer de páncreas.

Utilizamos cuarenta ratones, en este caso ratones desnudos o nude, con una distribución al azar en cuatro grupos de tratamiento. Como en todos los estudios previos de xenotrasplantes de ratones inmunocomprometidos seguimos las reglas de nuestro protocolo, identificamos a los veinte ratones con pendiente clip en la oreja, les pesamos y realizamos el xenotrasplante ortotópico de un millón de células CAPAN 1 y cien mil fibroblastos peritumorales en la cabeza del páncreas del animal. El siguiente paso es asignar el tratamiento que vamos a pautar a cada animal de forma aleatoria: seis ratones a los que se administra vehículo (grupo control), once ratones con gemcitabina, otros doce con BMP-7 y por último once de la combinación de gemcitabina y BMP-7.

Tabla XII. Tratamiento de los ratones distribuido al azar.

Número animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Código grapa																				
Número azar	16	11	5	9	6	17	3	14	4	8	13	10	20	15	18	2	7	12	19	1
Tratamiento	GB	B	G	B	G	GB	G	B	4	G	B	B	GB	GB	GB	V	G	B	GB	V

Los fármacos administrados los tenemos preparados en perfecto estado e identificados en cada jeringuilla. Utilizamos agujas de 30 y la administración es intraperitoneal.

- Vehículo: 200 µl de suero salino.
- Gemcitabina: 200 µl de suero salino con 125 mg/ kg peso/ 2 veces a la semana. Si los ratones pesan alrededor de 25 g, la dosis de Gemcitabina será de 3 mg por ratón.
- BMP7: 200 µl de suero salino con 100 ug/ Kg peso/ día, menos los sábados y domingo. Si los ratones pesan 25 g, la dosis será de 2,5 ug por ratón.
- Gemcitabina + BMP7: en jeringas diferentes.

La aplicación del tratamiento, según la distribución al azar de cada fármaco, será:

- Vehículo cada día, menos sábado y domingo, durante tres semanas.
- Gemcitabina los lunes y los jueves, durante tres semanas.
- BMP7 cada día, menos sábado y domingo, durante tres semanas.
- Gemcitabina + BMP7, la Gemcitabina lunes y jueves durante tres semanas y BMP7 cada día, menos sábado y domingo, durante tres semanas.

A lo largo de las tres semanas que dura el tratamiento de nuestros ratones los pesamos una vez a la semana, los vigilamos todos los días y anotamos anomalías posibles del animal como diarrea, pelaje o falta de actividad. La necropsia se realiza a los 21 días y según el protocolo descrito previamente.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar (SD), con intervalos entre el valor mínimo y el máximo. Las variables cualitativas, como la incidencia de metástasis, se expresaron como cociente (número de casos con metástasis/número total de casos) y se compararon mediante Chi cuadrado con corrección de Yates. Las comparaciones múltiples de medias entre grupos se realizaron mediante ANOVA y cuando éste era significativo con $P < 0.05$, para las comparaciones individuales de los grupos se aplicaron la corrección de Bonferroni o el test de Newman-Keuls. Los tratamientos experimentales se distribuyeron aleatoriamente entre los animales mediante tablas de permutaciones números al azar. Como software estadístico se utilizó MedCalc v12.5.00-64-bit.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS DE LOS CULTIVOS

6.1.1. Cinética de crecimiento

Los fibroblastos normales y peritumorales obtenidos de las muestras quirúrgicas que se aislaron mediante el procedimiento descrito en material y métodos fueron cultivados “in vitro”. En nuestras manos, conseguimos que crecieran fibroblastos uno de cada diez muestras quirúrgicas. Los analizamos mediante curvas de crecimiento y se comparó la proliferación de fibroblastos normales y peritumorales, los fibroblastos obtenidos de la zona peritumoral experimentan una mayor proliferación que los fibroblastos obtenidos de la zona normal, con una P estadísticamente significativa (Figura 6).

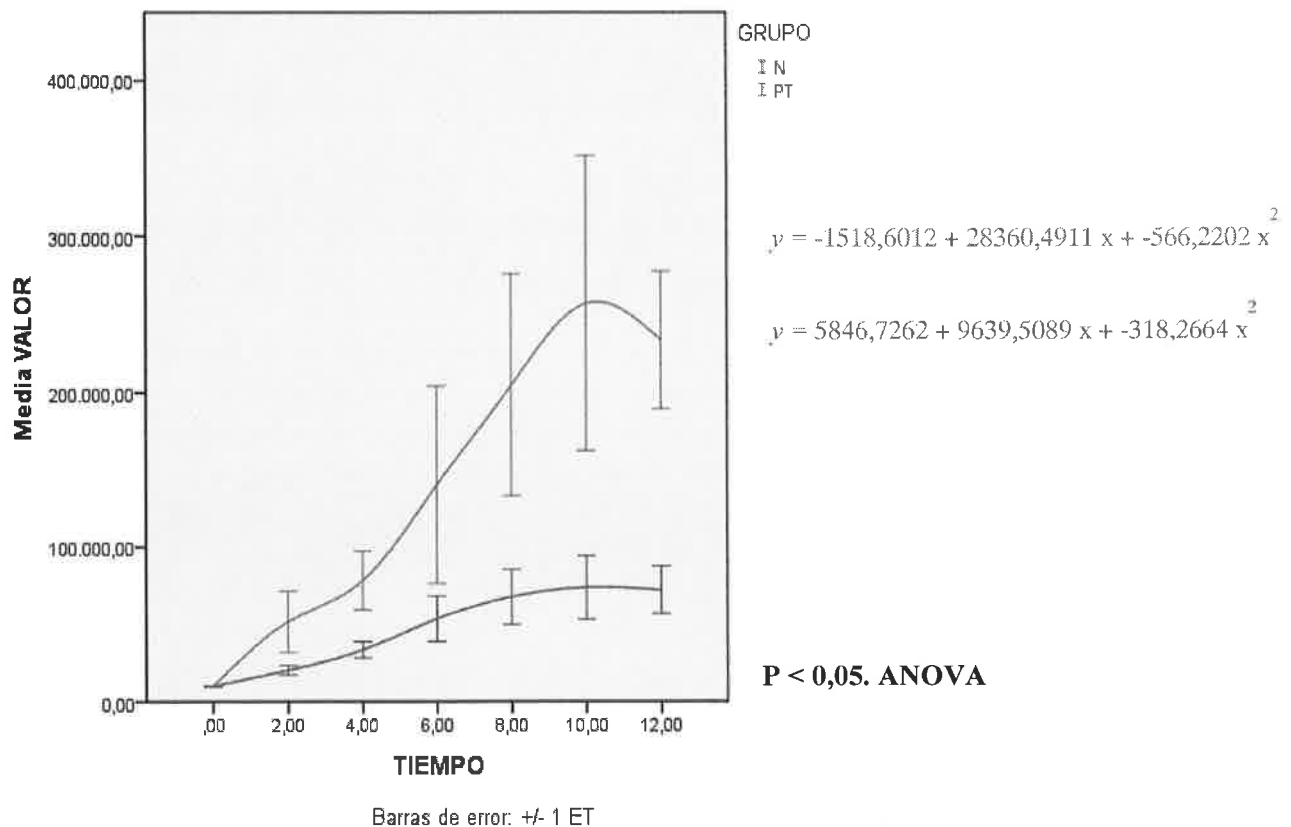


Figura 6. Curva de crecimiento de fibroblastos normales y peritumoral. La curva azul, representada con una “N” muestra la curva de crecimiento de los fibroblastos normales; y la curva verde, “PT”, muestra los fibroblastos peritumorales.

Para comparar este hecho se sembraron el mismo número de fibroblastos en cada pocillo (10.000) y se realizaron curvas de crecimiento, el número de células en cada pocillo se contaban cada dos días, durante 12 días.

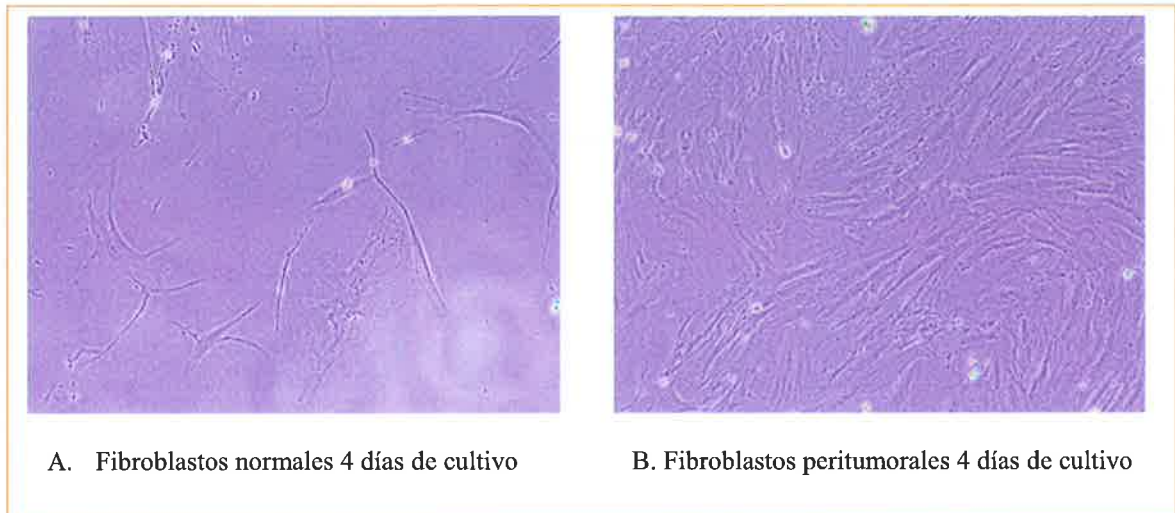


Figura 7. Comparación de fibroblastos en cultivo “in vitro”. La imagen de la izquierda muestra los fibroblastos normales, y la de la derecha, los fibroblastos peritumorales.

Los resultados que hemos obtenido al valorar el efecto que tienen los fibroblastos normales y peritumorales sobre la proliferación de la línea celular CAPAN, mediante el cocultivo de estas células y analizado con curvas de crecimiento, son que los fibroblastos peritumorales provocan un incremento en la proliferación de las células CAPAN comparándolas tanto con el control (las células CAPAN solas) como con el cocultivo con fibroblastos normales (Figura 8).

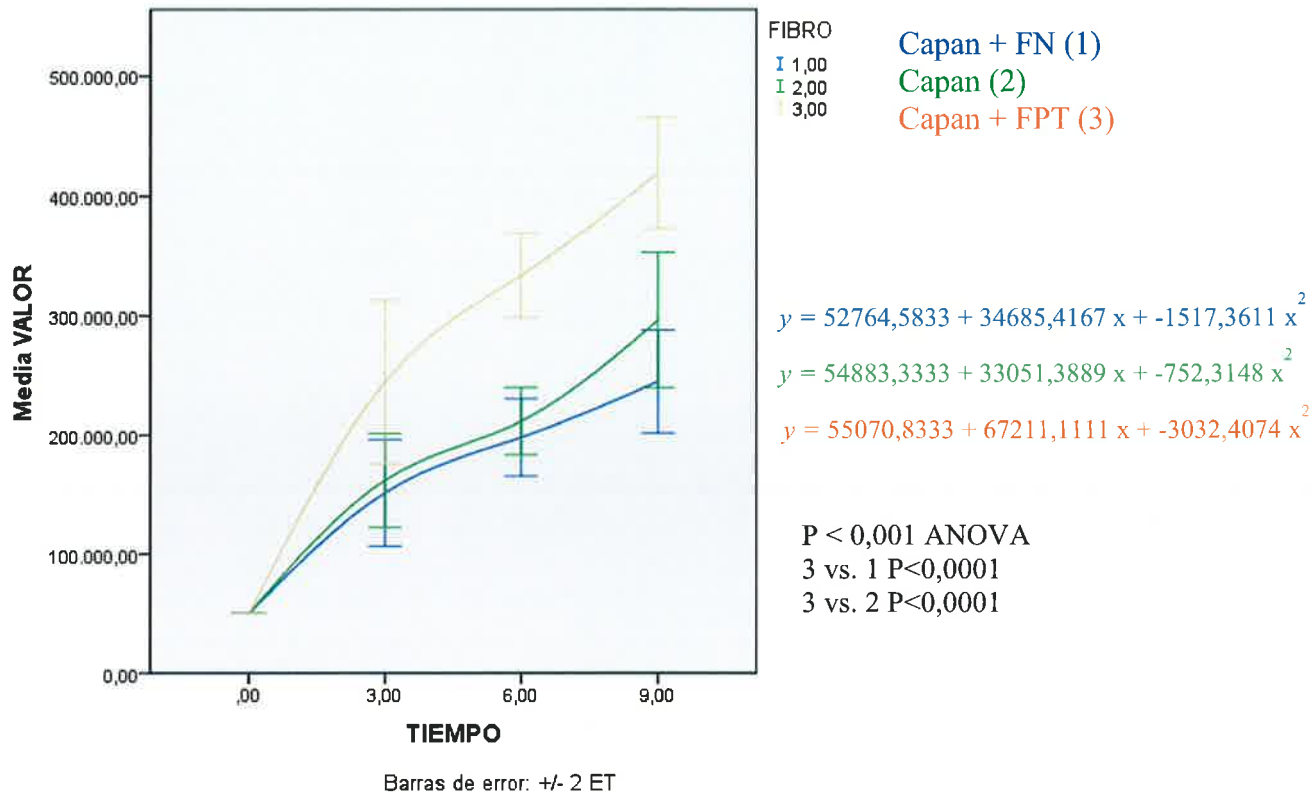


Figura 8. Curva de crecimiento de los distintos cocultivos. La curva de mayor crecimiento son los cocultivos de Capan + FPT (fibroblastos peritumorales), estadísticamente significativa.

6.1.2. Morfología celular

La Figura 9 es un ejemplo de las características tintoriales de las muestras quirúrgicas de las que se obtuvieron fibroblastos para cultivos. La tinción con H&E (Figura 9A) confirma el adenocarcinoma ductal de páncreas, mientras que la inmunohistoquímica revela los fibroblastos de la reacción desmoplásica del tumor (Figura 9B-D), siendo menos numerosos los que captan el anti-proCol11A1.

Las células extraídas de las muestras quirúrgicas y cultivadas en pases 3-6 resultaron ser fibroblastos tanto morfológicamente por su morfología (Figura 7, 10), como por las características fenotípicas al teñirse la mayoría de ellos con marcadores mesenquimales inespecíficos, como la Vimentina, específicos de inflamación, como la alfa-actina del músculo liso, así como con el marcador exclusivo de fibroblastos peritumorales, el proCOL11A1 (figura 10 y 11).

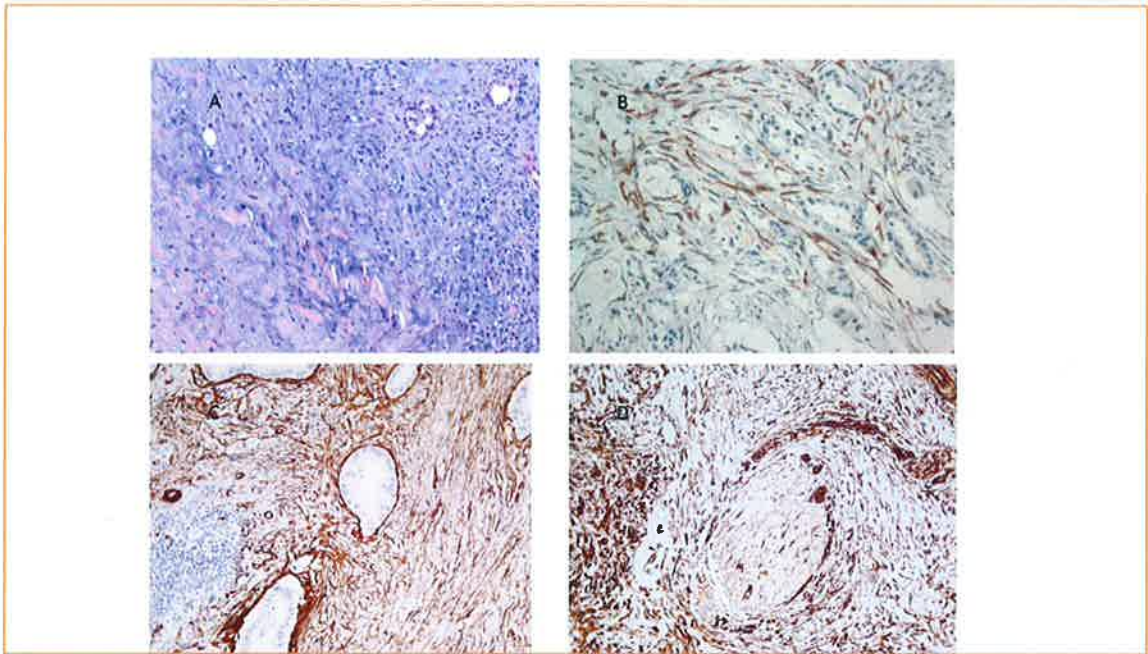


Figura 9. Inmunohistoquímica de los fibroblastos peritumorales del adenocarcinoma ductal de páncreas. A, tinción con hematoxilina-eosina. B, C y D, inmunotinción con proCol11A1, SMA y Vimentina, respectivamente.

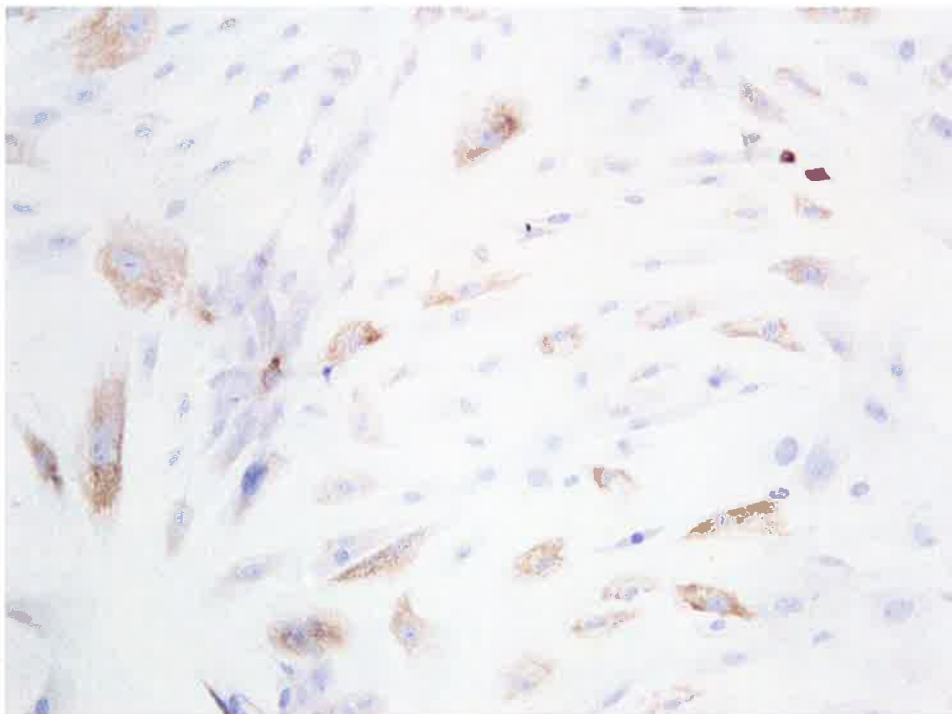


Figura 10. Fibroblastos peritumorales cultivados teñidos con anti-proCol11A1 antes de su implante en el animal.

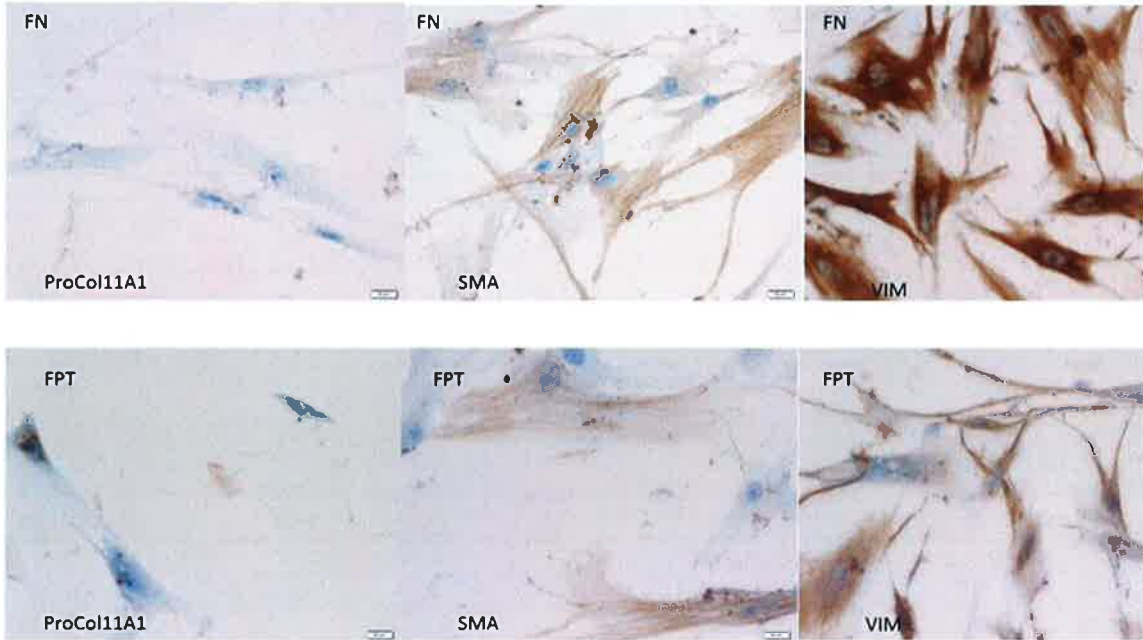


Figura 11. Inmunocitoquímica con anti-proCol11A1, actina del músculo liso (SMA y Vimentina (VIM) de fibroblastos normales (FN) y peritumorales (FPT) cultivados.

Por medio de la tinción doble inmunofluorescente se caracterizó los fibroblastos cultivados (Figura 12). El porcentaje de células epiteliales en los cultivos marcadas con CK7 era escaso.

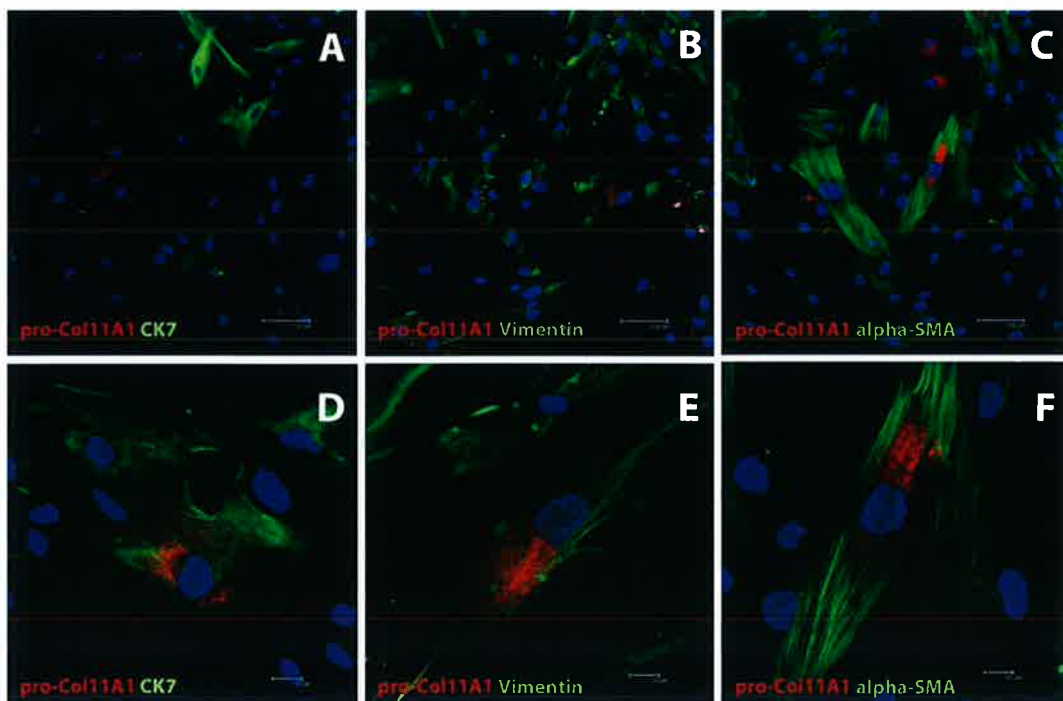


Figura 12. Microscopía confocal de fibroblastos peritumorales cultivados de adenocarcinoma ductal de páncreas. La tinción doble fluorescente señala la presencia de células proCOL11A1+/CK7+, proCOL11A1+/SMA+ y proCOL11A1+/VIM+. Rojo: proCOL11A1, verde: CK7, SMA y VIM, azul: núcleos. Barra escala de 100 μ m (200X) en A, B y C; y 20 μ m (630X) en D, E y F.

6.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES

6.2.1. Amplificación específica de genes humanos

Los genes GLI1, SHH, SMO, COL11A1, y BMP7 se comprobó que ampliaban específicamente en tejido humano, descartando la posibilidad de amplificación cruzada a partir de tejido de ratón. Se debe de recordar que las biopsias de los ratones trasplantados contienen una mezcla de células tumorales humanas, las CAPAN-1, fibroblastos humanos, y tejido de ratón. Esta comprobación es muy importante puesto que es necesario para partir de unos datos brutos fiables.

En cambio, el gen PTCH1 si mostró amplificación cruzada a partir de tejido de ratón. El nivel de expresión es bajo sin embargo debe tenerse al analizar los datos derivados de la expresión de este gen.

Tabla XIII. Resultados de los ensayos específicos para humanos.

Gen Humano	Assay ID	Expresión en ratón
BMP7*	Hs00233476_m1	NO
COL11A1	Hs01097664_m1	NO
GAPDH	Hs02758991_g1	SI
GLI1*	Hs01110766_m1	NO
PTCH1	Hs00181117_m1	Muy baja
PUM1	Hs00472881_m1	SI
SHH	Hs00179843_m1	NO
SMO	Hs01090242_m1	NO

6.2.2. Datos de expresión en las líneas celulares utilizadas en los trasplantes.

Se comprobaron los niveles de expresión de los genes estudiados en la línea Capan-1 y en los FPT. En la línea Capan-1 destaca la elevada expresión de SHH, prácticamente ausente en los FPT. Estos a su vez expresan de manera diferencial COL11A1.

Tabla XIV. Datos de expresión de genes en las líneas celulares trasplantadas

	<i>SHH</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SMO</i>	<i>GLI1</i>	<i>COL11A1</i>	<i>BMP7</i>
Capan-1	6,73	3,66	4,21	1,43	0,00	0,37
FPT	0,00	1,01	1,00	1,08	0,98	0,18

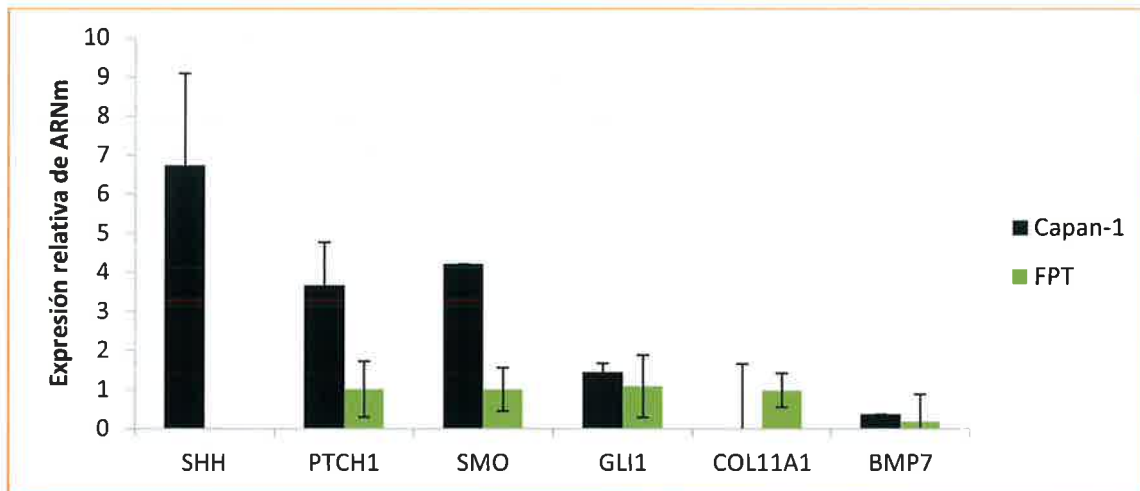


Figura 12. Expresión de los genes en las líneas celulares trasplantadas.

Los genes *SHH* y *BMP7* tienen mayores valores de expresión de ARNm en los ratones receptores del co-trasplante de Capan-1 y FPT (RCF), en comparación con los ratones receptores exclusivamente de Capan-1 (RC). En el caso del gen *BMP7* esta diferencia es estadísticamente significativa. Los datos se muestran en la figura 13.

En general se observa una tendencia de mayores niveles de expresión en los ratones receptores RCF. Destaca que la expresión de *COL11A1* es prácticamente nula en ambos tipos de trasplantes.

Tabla XV. Datos de los niveles de expresión en ratones receptores RC y ratones receptores RCF.

	<i>SHH</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SMO</i>	<i>GLI1</i>	<i>COL11A1</i>	<i>BMP7</i>
RC	4,27	2,19	0,76	1,01	0,01	2,91
RCF	6,37	2,54	1,97	1,16	0,01	13,51

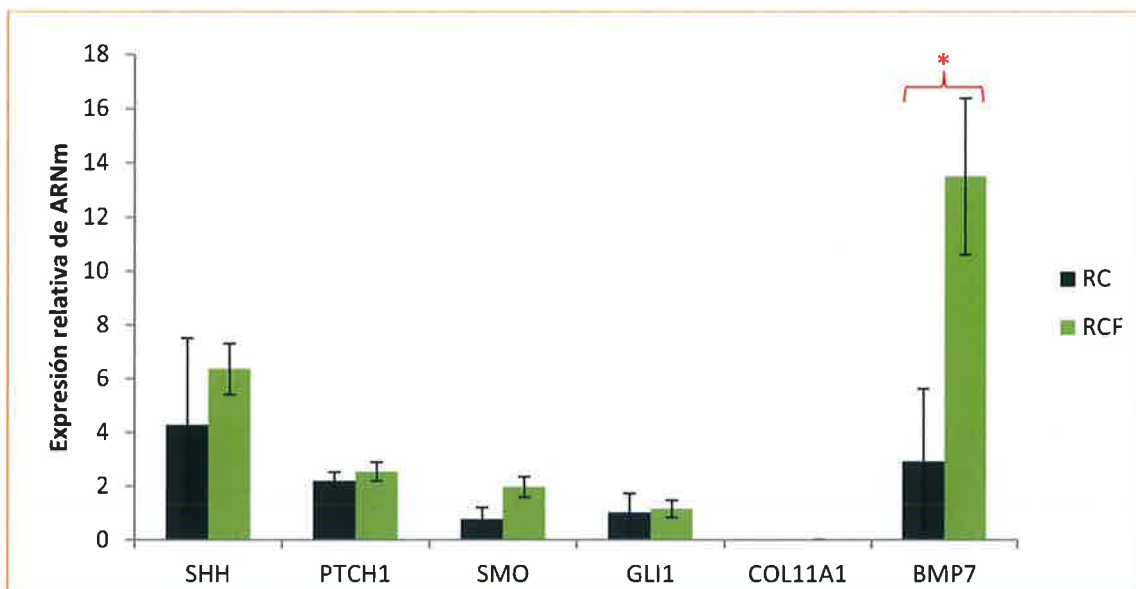


Figura 13. Comparación de los niveles de expresión en ratones receptores RC y ratones receptores RCF. * $P < 0,05$.

6.2.3. Sobreexpresión o represión de los genes en los ratones receptores de trasplantes frente a los valores de las líneas celulares in vitro

Se compararon los valores de expresión de genes en los ratones receptores de trasplantes frente a los valores de Capan-1 y FPT cuando se cultiva in vitro. Esto nos da una idea de las modificaciones que se producen a nivel genómico en esa línea celular por el crecimiento de tumor in vivo.

Para estudiar la sobreexpresión de los genes se utiliza el fold change o tasa de cambio. El valor de fold change indica sobreexpresión para valores mayores que uno, que no hay cambio si es igual a uno y represión en caso de ser menor que uno.

En primer lugar, mostraremos los resultados cuando se comparan ambos grupos de ratones con los niveles de expresión de la línea tumoral Capan-1 cultivada in vitro (Tabla XVI).

Únicamente el gen BMP7 se encuentra sobreexpresado respecto a los valores expresión existentes en la línea Capan-1 observados in vitro. Esta sobreexpresión se produce en ambos tipos de trasplantes, sin embargo, se observa los ratones receptores del co-trasplante RCF tienen mayores niveles de expresión que los ratones receptores de Capan-1. Esta diferencia es estadísticamente significativa.

Tabla XVI. Datos de fold change o tasa de cambio en ratones receptores RC y ratones receptores RCF respecto a los niveles de expresión en la línea Capan-1.

	SHH	PTCH1	SMO	GLI1	COL11A1	BMP7
RC	0,63	0,60	0,18	0,71	0,00	7,86
RCF	0,95	0,69	0,47	0,81	0,00	36,40

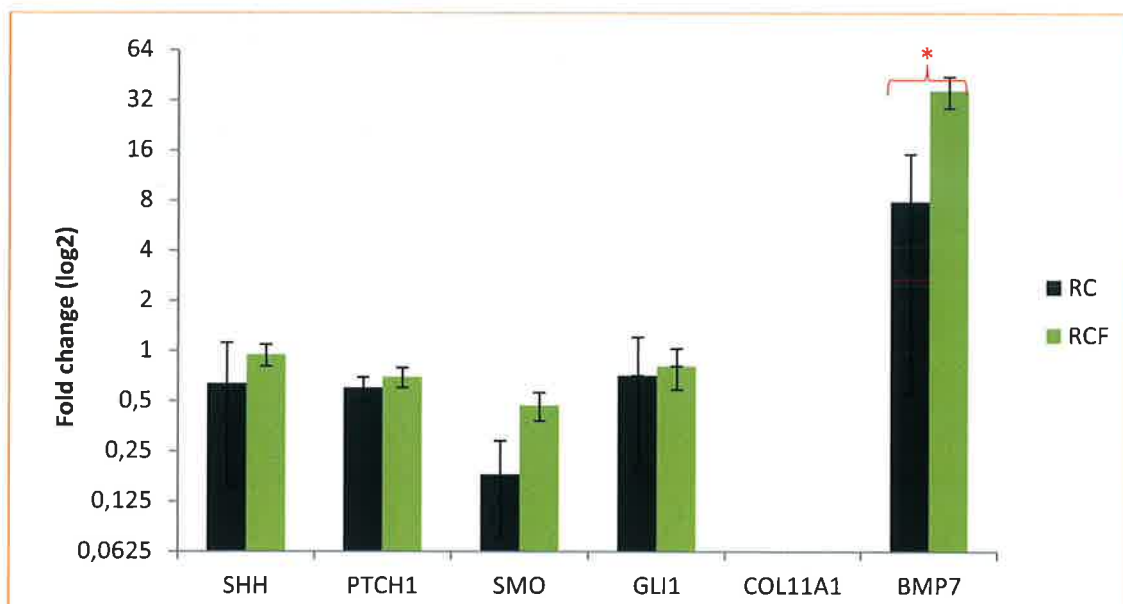


Figura 14. Fold change o tasa de cambio en ratones receptores RC y ratones receptores RCF respecto a los niveles de expresión en la línea Capan-1. * $P < 0,05$.

A continuación, se muestran los resultados cuando se comparan ambos grupos de ratones con los niveles de expresión de los FPT cultivados in vitro.

El resultado más destacado es que el gen SMO está sobreexpresado en los ratones receptores del co-trasplante en comparación con los niveles observados en el cultivo de los FPT. Además, este mismo gen estaría reprimido en los ratones receptores únicamente de Capan-1.

Los otros genes estudiados están todos sobreexpresados salvo el caso del COL11A1. Este estaría reprimido respecto a los niveles observados cuando se cultivan in vitro los FPT. Destacan los altos niveles de expresión del gen SHH en los dos grupos de ratones que sin embargo, no presenta diferencias significativas entre ambos.

El gen BMP7 de nuevo está sobreexpresado en ambos grupos como ocurría en la comparación con la línea tumoral Capan-1.

Tabla XVII. Datos de fold change o tasa de cambio en ratones receptores RC y ratones receptores RCF respecto a los niveles de expresión en los FPT.

	SHH	PTCH1	SMO	GLI1	COL11A1	BMP7
RC	15384,44	2,17	0,76	0,94	0,01	15,81
RCF	22921,77	2,52	1,96	1,07	0,01	73,25

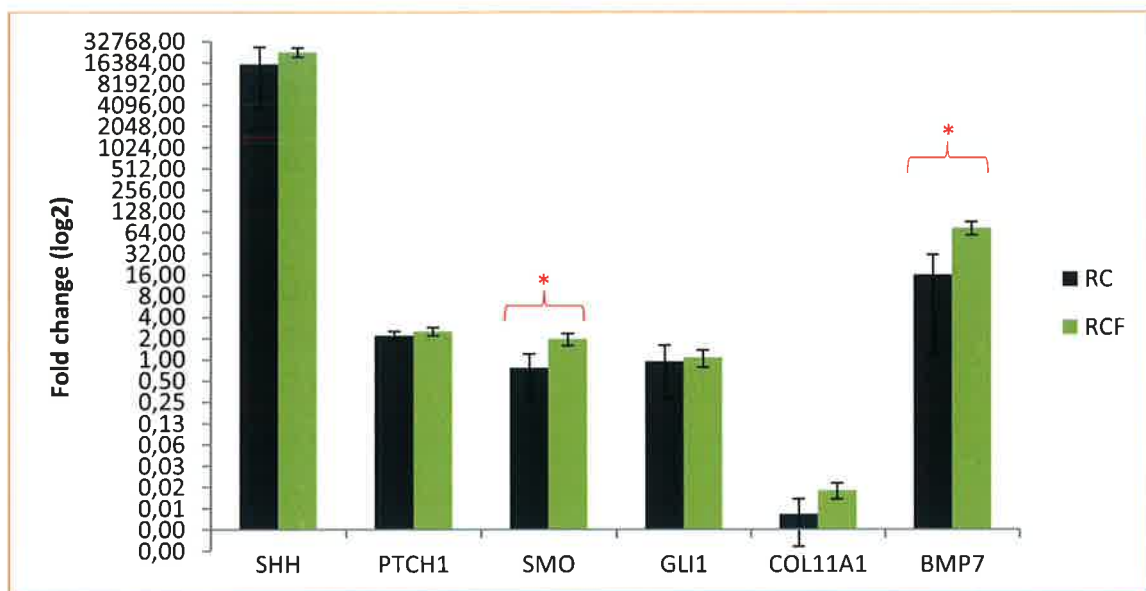


Figura 15. Fold change o tasa de cambio en ratones receptores RC y ratones receptores RCF respecto a los niveles de expresión en los FPT. *P < 0,05.

6.3. ANÁLISIS DE LOS XENOTRASPLANTES

6.3.1. Resultados nuevo modelo animal de cáncer de páncreas humano

Ratones SCID

Modelo 1: Xenotrasplante de cinco ratones con un millón de células CAPAN 1

De los cinco ratones con un millón de células CAPAN 1 trasplantadas, el 100% de ellos desarrollaron un tumor de páncreas visible macroscópicamente y con confirmación de anatomía patológica al microscopio. Presentaron un tumor de tamaño variable, del cual medimos el eje mayor y el eje menor del mismo para poder calcular el volumen en mm³, con la fórmula expresada previamente.

En este modelo el volumen medio fue 2,78 mm³ (0,01 a 11,5 mm³).

No se objetivó invasión local del tumor en ninguno de los cinco casos y tampoco metástasis a distancia a nivel macroscópico ni en el estudio anatomopatológico de los tejidos que remitimos.

Modelo 2: Xenotrasplante de cinco ratones SCID con un millón de CAPAN 1 y cien mil fibroblastos peritumorales.

Tumor macroscópico de páncreas con confirmación patológica en los cinco ratones trasplantados, el 100% de nuestro modelo. En este caso los tumores de páncreas tenían invasión local y el tamaño tumoral difería uno de otros pero en dimensiones similares y mayor que el modelo anterior (Figura 16 y 17).

En este modelo el volumen medio del tamaño tumoral fue 121,4 mm³ (58,7 a 315 mm³).

En la necropsia de estos cinco ratones encontramos metástasis a distancia en cuatro de los cinco animales, las metástasis se confirmaron con anatomía patológica. Visualizamos nódulos metastásicos en el bazo, en el hígado y en peritoneo (Imagen 18 y 19).



Figura 16. Necropsia de ratón SCID. Masa tumoral en la cabeza del páncreas. Se visualiza la cavidad torácica, hígado, bazo, asas de intestino delgado con mesenterio y páncreas.



Figura 17. Pieza en bloque de estómago, duodeno, páncreas y bazo. Masa tumoral en la cabeza del páncreas.



Figura 18. Tumor de páncreas con metástasis hepáticas y esplénicas.



Figura 19. Tumor de páncreas con metástasis en pieza en bloque de intestino delgado, páncreas y bazo.

Modelo 3: Xenotrasplante de láminas de 1-2 mm² de adenocarcinoma ductal de páncreas humano.

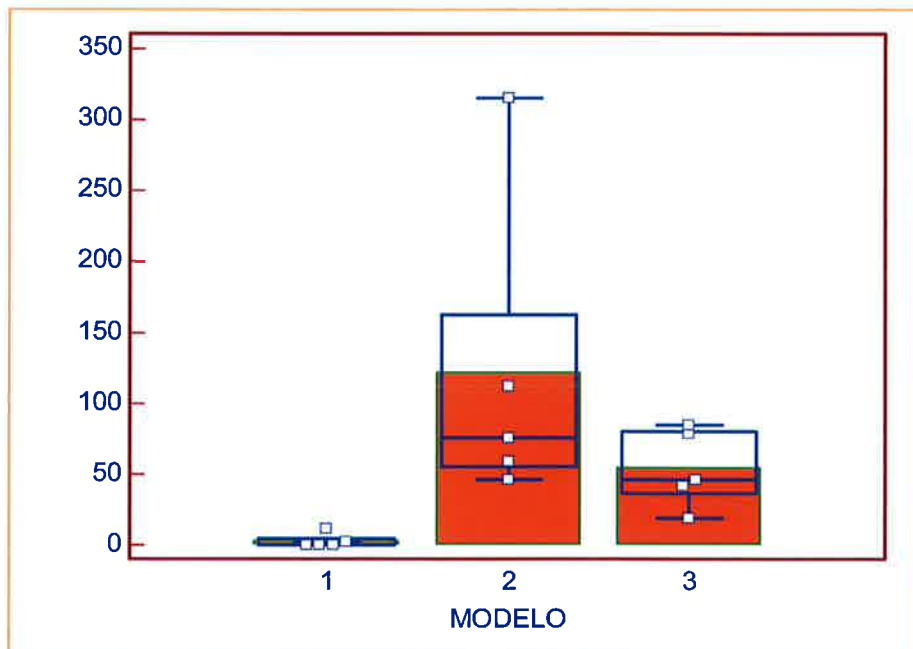
De los cinco xenotrasplante con slice de páncreas obtuvimos tumor en los cinco casos sin invasión local de la enfermedad y sin metástasis macroscópicas ni microscópicas.

El volumen medio del tamaño tumoral fue 54,08 mm³ (18,9 a 84,9 mm³).

Modelo 4: Xenotrasplante de cien mil fibroblastos peritumorales cultivados.

En nuestro último modelo utilizado como grupo control no obtuvimos, como era esperado, tumor en ninguno de los casos.

Con estos resultados hemos analizado comparativas entre grupos (Figura 20 y Tabla XVIII). El modelo 2 presenta el tumor con mayor tamaño y más metástasis.



P<0,001 ANOVA

P<0,05 Student-Newman-Keuls

2 vs. 1 y 3

3 vs. 1

Figura 20. Diagrama de cajas del tamaño tumoral de xenotrasplantes ortotópicos de CAPAN1 (modelo 1), CAPAN1 + Fibroblastos peritumorales (modelo 2) y slice de páncreas (modelo 3).

Tabla XVIII. Mayor volumen tumoral y presencia de metástasis en el modelo 2 (CAPAN 1 y fibroblastos peritumorales).

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
%	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	0 (0/5)
Volumen mm³	2,78	121,4	54,08	-
Metástasis	No	Si	No	-

En este grupo de trabajo con los distintos modelos de ratones analizamos las piezas en el servicio de Anatomía Patológica para el estudio histológico de los xenotrasplantes de la cabeza del páncreas de los animales. En el estudio microscópico las muestras revelaban tumores compatibles con adenocarcinoma ductal de grado bajo-moderado (Figura 21). Las metástasis hepáticas y peritoneales presentaban características similares al tumor xenotrasplantado.

Cuando se inyectaron únicamente fibroblastos peritumorales no apareció tumor en ninguno de los ratones, como era lo esperado. Utilizando el proCol11A1, específico de fibroblastos peritumorales humanos, se podían observar en el área desmoplásica del xenotrasplante algunos fibroblastos humanos (Figura 22).

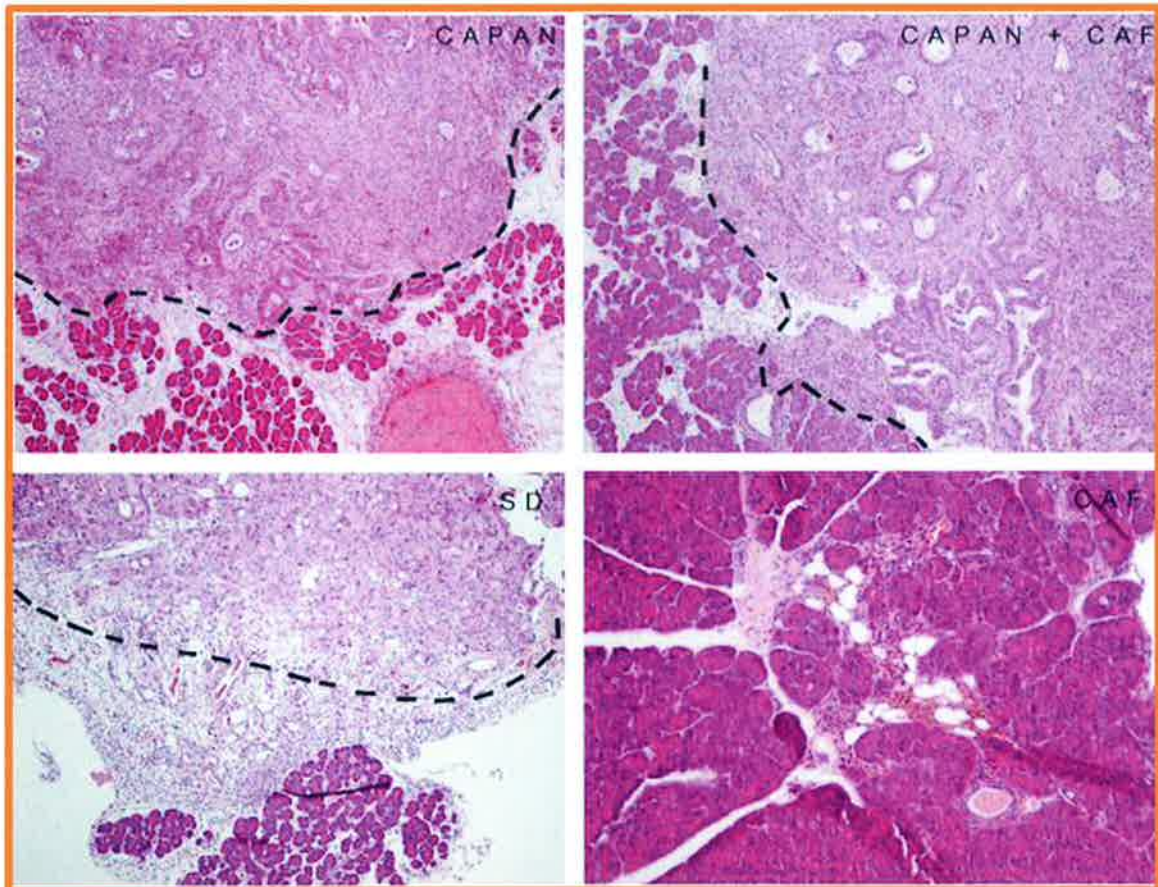


Figura 21. Estudio microscópico con muestras teñidas de hematoxilina-eosina, de los cuatro modelos a estudios. Arriba a la izquierda, Modelo 1: CAPAN1; Arriba a la derecha, Modelo 2: CAPAN1 + CAF (fibroblastos asociados al tumor = fibroblastos peritumorales); Abajo a la izquierda, Modelo 3: slice de 1-2 mm de páncreas; Abajo a la derecha, Modelo 4: grupo control.

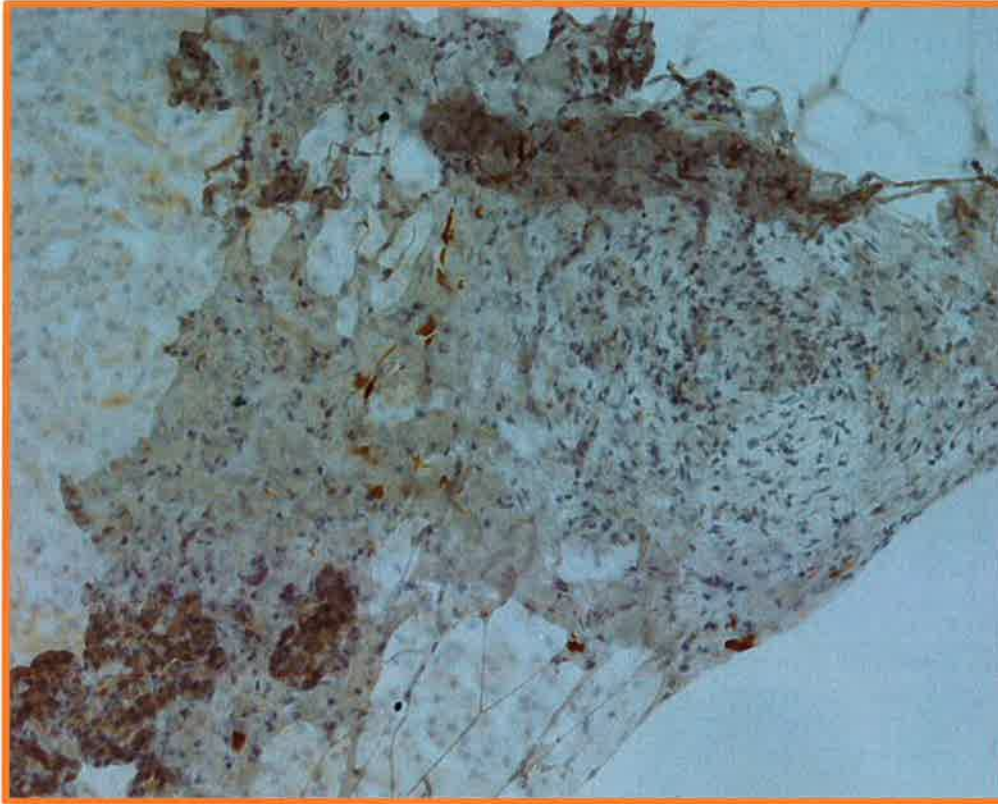


Figura 22. Fibroblastos peritumorales humanos, proCol1A1+, en el xenotrasplante de la cabeza de páncreas de ratón.

Ratones nude

Grupo Capan:

Los cinco ratones de este grupo permanecieron vivos hasta la necropsia y no presentaron ningún signo de alarma. Ninguno de los cinco presentó metástasis.

En este grupo el volumen medio fue 1,72 mm³ con desviación estándar de 1,92.

Grupo Capan + FN:

En este grupo todos los ratones presentaron un tumor con un volumen medio de 3,26 mm³ con desviación de 3,52. Y en este caso uno de los ratones tuvo una metástasis macroscópica.

Grupo Capan + FPT:

Los cinco ratones de este grupo presentaron los tamaños tumorales más grandes del estudio, con cuatro de cinco ratones con metástasis macroscópicas. El volumen medio del tumor fue 6,10 mm³.

Tabla XIX. Xenotrasplante ortotópico de CAPAN1 en ratones *nude*. Un millón de células Capan-1 con/sin 100.000 fibroblastos normales (FN) o fibroblastos peritumorales (FPT) en la cabeza del páncreas.

GRUPO	Tamaño medio tumor (mm ³)± SD	Metástasis hepáticas macroscópicas
Capan	1,72 ± 1,92	0/5
Capan +FN	3,26 ± 3,52	1/5
Capan + FPT	6,10 ± 3,07*	4/5**

Tamaño tumoral: Capan-1 + FPT vs. Capan-1 P<0.05. **Incidencia de metástasis P<0.01 Chi cuadrado corrección de Yates.

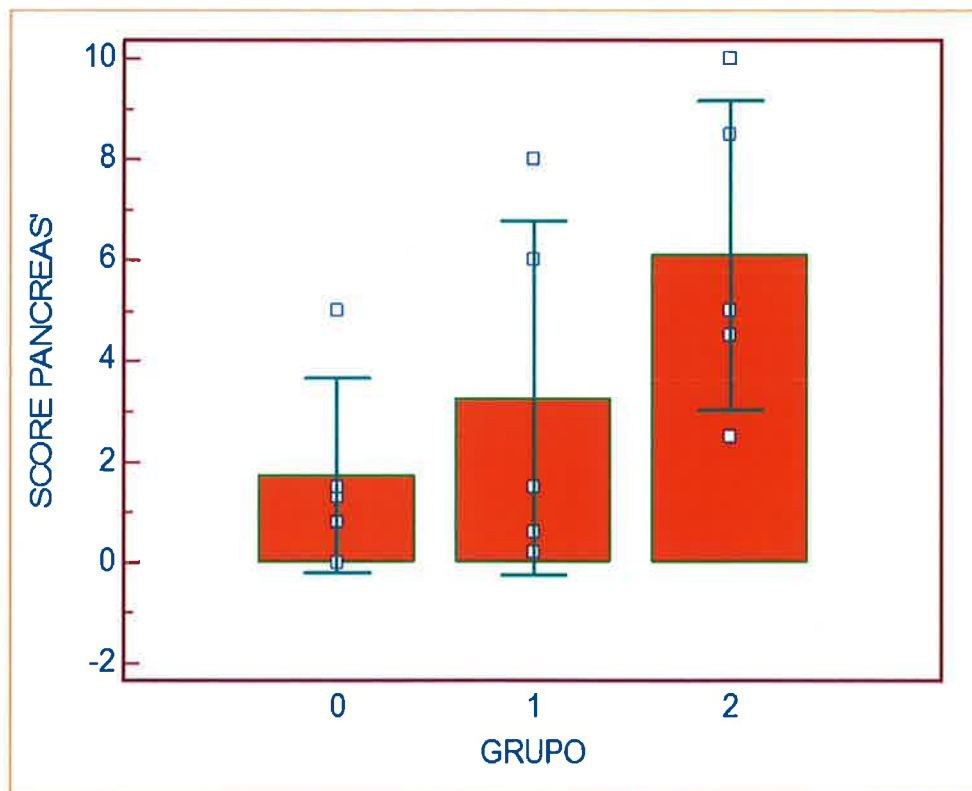


Figura 22. Diagrama de cajas del tamaño tumoral de xenotrasplantes ortotópicos de Capan-1 (Grupo 0), con fibroblastos normales (Grupo 1) y fibroblastos peritumorales (Grupo 2).

6.4. TRATAMIENTO CON BMP7 EN LOS XENOTRASPLANTES

Las muestras quirúrgicas de la necropsia las enviamos a anatomía patológica y al estudio inmunohistoquímico, para analizar los resultados.



Figura 23. Ratones nude en la caja del Bioterio antes del xenotrasplante.

Grupo 1: Tratamiento con vehículo en los xenotrasplantes

En este grupo de trabajo trasplantamos a seis ratones nude con un millón de células CAPAN 1 y cien mil fibroblastos peritumorales en la cabeza del páncreas. Les pautamos tratamiento con vehículo como grupo control. Dos de los seis animales fallecen, las causas del fallecimiento no están claras, uno de ellos parece una hemorragia postrasplante y el otro a los diez días del trasplante sin causa aparente pero sí con disminución de peso.

A los 21 días realizamos la necropsia de los cuatro ratones, sólo en uno de los cuatro no tenía masa tumoral macroscópicamente y confirmamos con anatomía patológica. El volumen medio del tamaño tumoral de los otros tres ratones, según la fórmula que aplicamos en nuestro estudio, fue $26,3 \text{ mm}^3 \pm 15,7$ (8,5 – 38,5).

Las metástasis en hígado e implantes tumorales en la cavidad abdominal aparece en dos de los ratones, visibles en la necropsia y confirmadas por microscopio.

Grupo 2: Tratamiento con Gemcitabina en los xenotrasplantes

Once ratones nude fueron elegidos al azar, como hemos explicado en material y métodos, para tratarlos con el fármaco que hasta la actualidad es el elegido en el cáncer de páncreas humano para la quimioterapia. El xenotrasplante con un millón de células CAPAN 1 y cien mil fibroblastos peritumorales sin incidencias.

Fallecen en el postoperatorio del xenotrasplante cuatro de los once ratones sin causa aparente que nosotros pudiesen identificar en la necropsia, y sin ningún dato en los días posteriores al xenotrasplante de alarma.

De los siete ratones que nos quedan en este modelo de estudio, en la necropsia se visualizó tumor macroscópico en cuatro de los siete con un volumen medio del tumor de páncreas de $4,7 \text{ mm}^3 \pm 4,2$ (1,1 - 10,9). Por supuesto todo ello con la confirmación del patólogo.

Las metástasis hepáticas e implantes peritoneales en este grupo de ratones aparecen en tres de los siete ratones, que esos tres ratones son de los cuatro que presentaron el tumor de páncreas.

Grupo 3: Tratamiento con la proteína recombinante humana BMP7

El grupo estudio de esta tanda de ratones para probar el nuevo fármaco como terapia al cáncer de páncreas ha sido este modelo con doce xenotrasplantes de un millón de células CAPAN 1 y cien mil fibroblastos peritumorales en la cabeza del páncreas del ratón. Fallecen dos ratones de los doce y este caso tampoco obtenemos nada claro en la necropsia ni signo de alarma en la vigilancia postoperatoria.

En dos casos de los diez restantes no encontramos tumor de páncreas macroscópico ni en la pieza de anatomía patológica. De los diez que sí padecían un tumor pancreático analizamos el volumen medio del tumor con un dato de $14,7 \text{ mm}^3 \pm 15,2$ (0 - 47,4).

La presencia de metástasis hepáticas e implantes peritoneales en seis de los ocho ratones en los que si se confirmó la presencia de tumor pancreático.

Grupo 4: Tratamiento combinado de Gemcitabina y BMP7 en xenotrasplante

En este grupo de once ratones nude con xenotrasplante fallecen tres de los once en el postoperatorio o evolución del desarrollo del tumor como en los demás casos sin causa aparente.

Ocho de los ratones con xenotrasplante los sacrificamos a los 21 días para valorar el tumor pancreático, en este caso seis ratones con tumor pancreático visible y confirmado al microscopio. El volumen medio que analizamos en estos seis ratones ha sido de $10,9 \text{ mm}^3 \pm 17,2$ (0,1 - 41,3).

La presencia de metástasis e implantes peritoneales las obtuvimos en dos de los ocho ratones, esos dos ratones presentaban tumor pancreático.

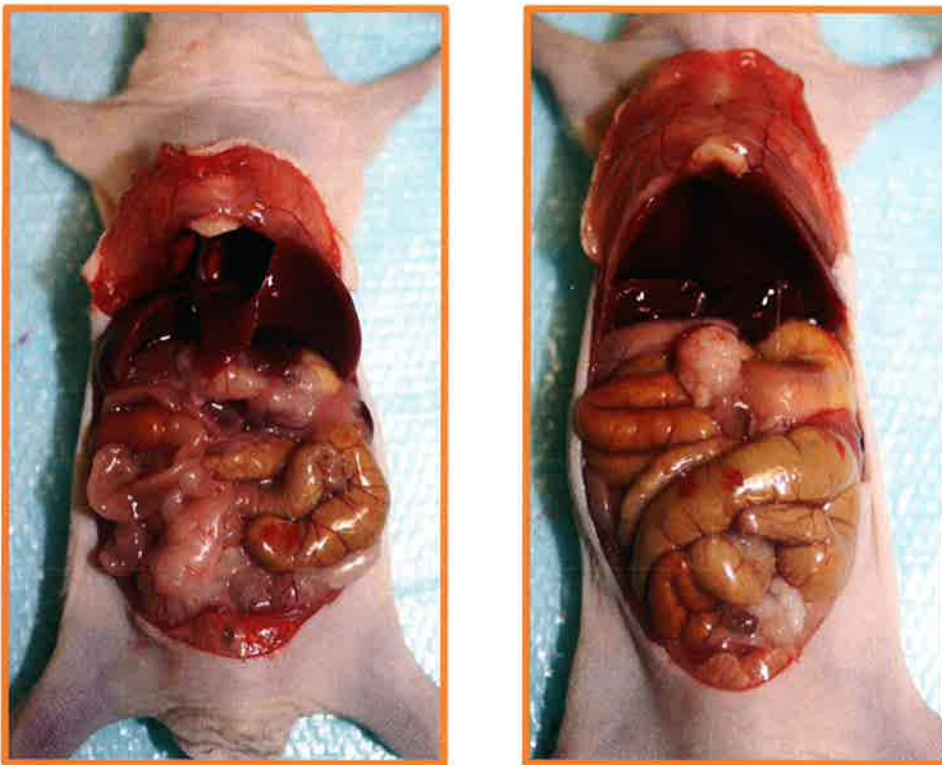


Figura 24. Necropsia de ratones nude. En ambas fotos se muestra la cavidad abdominal del animal con la masa en la cabeza del páncreas, mayor tamaño en la imagen de la derecha.



Figura 25. Gran masa en la cabeza del páncreas con metástasis hepáticas y esplénicas.

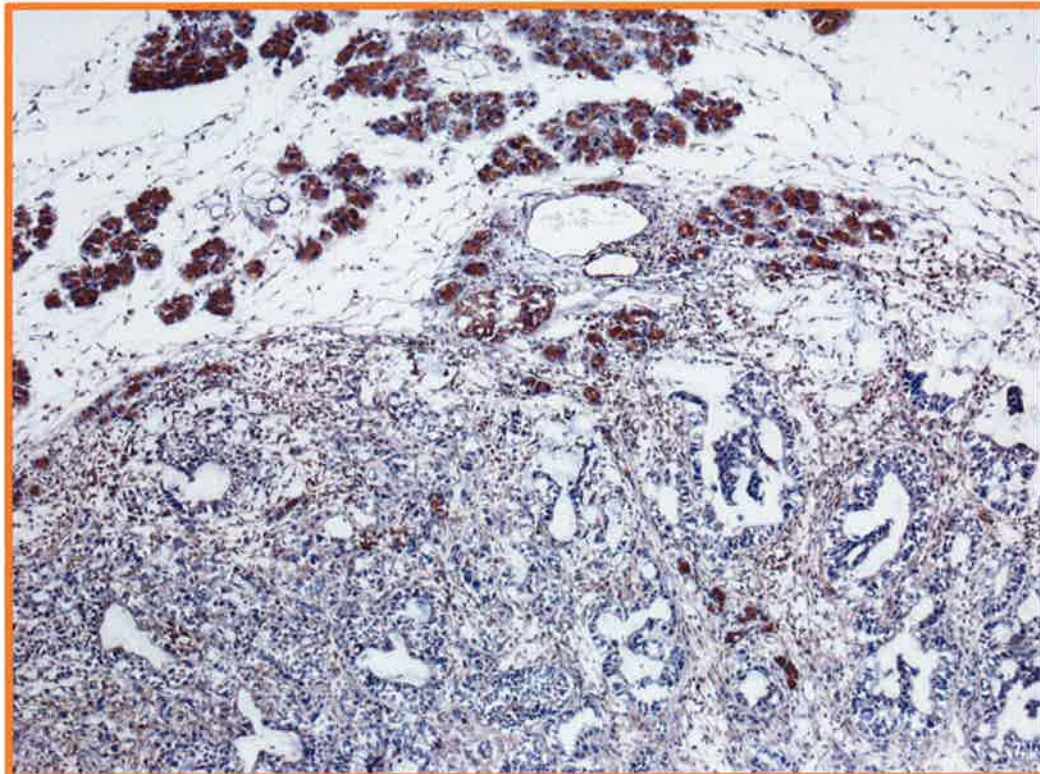


Figura 26. Estudio microscópico de tinción de BMP7 en tejido pancreático normal y tumoral

Se aprecia en el estudio comparativo de los cuatro grupos como varía el tamaño tumoral entre los distintos tratamientos.

Tabla XX. Tamaño tumoral e incidencia de metástasis entre los distintos grupos de estudio

	Vehículo	Gemcitabina	BMP 7	Gemcitabina + BMP 7
Fallecen	2/6	4/11	2/12	3/11
Volumen mm ³	26,3 ± 15,7	4,7 ± 4,2	14,7 ± 15,2	10,9 ± 17,2
Metástasis	2/3	3/4	6/8	2/6

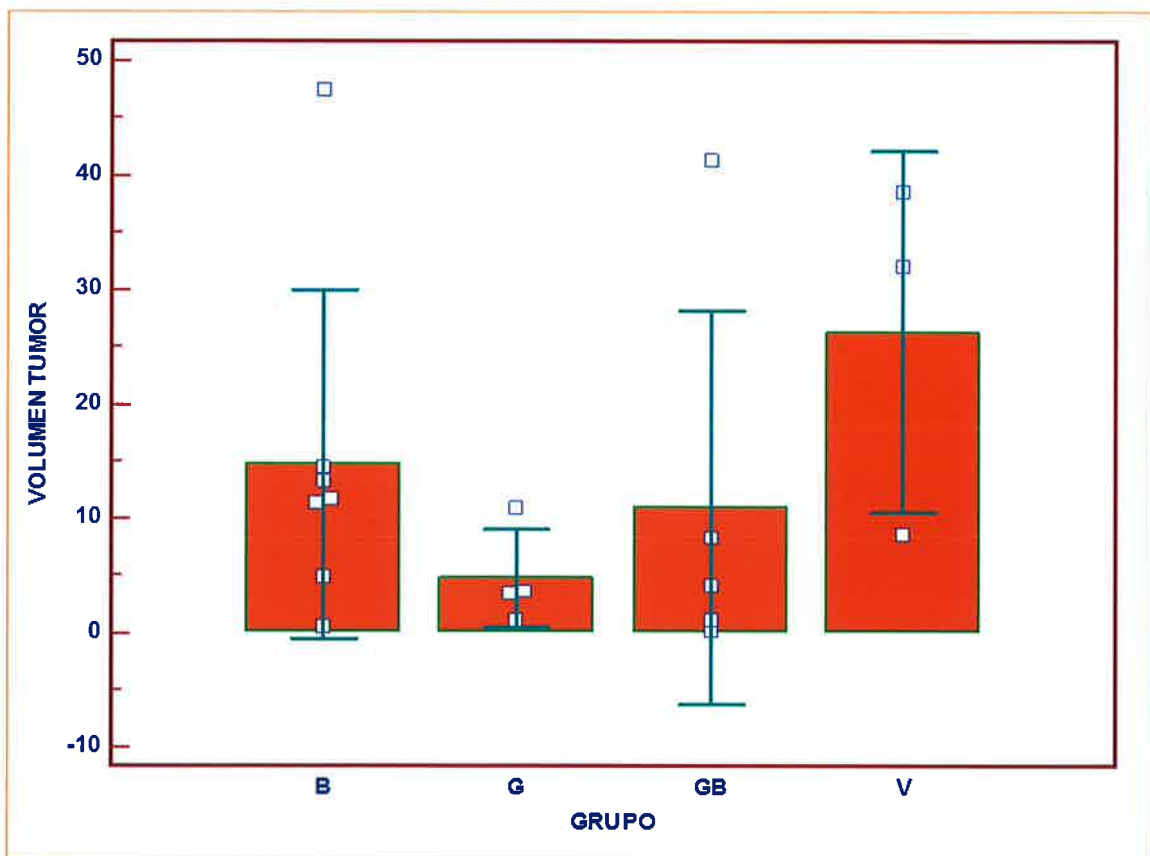


Figura 27. Diagrama de cajas del tamaño tumoral de los distintos grupos de tratamiento en los xenotrasplantes. Estudio ANOVA que no es estadísticamente significativo. Grupo B: tratamiento con BMP-7; Grupo G: tratamiento con Gemcitabina; Grupo GB: tratamiento combinado de Gemcitabina y BMP-7; Grupo V: grupo control.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Esta Tesis es el resultado de uno de los objetivos de la Unidad de Oncología Quirúrgica Hepatobiliopancreática del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA): conocer el papel del estroma peritumoral en la progresión del cáncer. Desde hace años, antes incluso de que se constituyera el Banco de Tumores del Principado de Asturias, el equipo quirúrgico extraía muestras de los cánceres de páncreas, colon y otros tumores, así como de las metástasis ganglionares y hepáticas. Ello permitió analizar la expresión global de genes en el cáncer de páncreas (112) comparándola con páncreas normal y pancreatitis crónica, resaltando la sobreexpresión del COL11A1, gen poco estudiado. Su proteína inmadura, la proCol11A1, se expresa casi exclusivamente en los fibroblastos peritumorales, conocidos en la literatura inglesa con el nombre de “Cancer-Associated Fibroblasts” (CAFs), y no en fibroblastos de tejidos no tumorales, tal como se demostró gracias a la generación de un anticuerpo monoclonal anti-proCol11A1 (112). En una serie de publicaciones, nuestro equipo confirmó que esta característica tintorial de los fibroblastos peritumorales se generaliza a otros cánceres epiteliales como el de colon y el de mama (140, 141, 142,143). Por aquel entonces, empezaron a publicarse trabajos sobre el estroma del cáncer de páncreas y su implicación en el desarrollo del tumor.

El carcinoma de páncreas se caracteriza por una reacción desmoplásica con un componente celular constituido por fibroblastos, pericitos, células estrelladas y leucocitos, y una matriz extracelular con colágenos, citocinas y factores de crecimiento.

A este estroma se le hace responsable del crecimiento tumoral, invasión y resistencia a la quimiorradioterapia (144, 87, 145, 146).

Se ha demostrado que los fibroblastos peritumorales estimulan la progresión del tumor (147, 148, 149, 150, 151), por lo que nos planteamos estudiar las características funcionales diferenciales de estos fibroblastos peritumorales, objetivos de esta Tesis.

Una primera dificultad fue el lograr el crecimiento de los cultivos de fibroblastos no contaminados por gérmenes u otras células. Aproximadamente, de cada diez extracciones de muestras quirúrgicas solamente en un caso conseguíamos que crecieran adecuadamente fibroblastos a través de pases 3-6. Este es el número que se considera adecuado para que las células no pierdan sus características iniciales tisulares. De hecho, pudimos comprobar que si bien los fibroblastos normales en el tejido no se teñían en absoluto con anti-proCol11A1, si lo hacían después de cultivarlos aunque en un porcentaje menor que los peritumorales. Por otro lado, se constató que los fibroblastos peritumorales proliferan más que los normales, con una diferencia estadísticamente significativa. Además, en cocultivos con células de la línea tumoral Capan-1, el crecimiento de éstas es mayor en presencia de los fibroblastos peritumorales, lo que es un argumento a favor del papel de los fibroblastos peritumorales en el crecimiento local del cáncer.

Otro dilema es qué son estos fibroblastos peritumorales ¿Células madre mesenquimales? ¿Células madres originarias de la médula ósea? ¿Células en proceso de transformación epitelio-mesénquima? ¿Simplemente fibroblastos normales que se han activado bajo la acción de la célula epitelial cancerosa? Estudios de nuestro equipo (112) con doble inmunotinción aplicada a muestras de adenocarcinoma de páncreas han demostrado que los fibroblastos peritumorales son una población heterogénea y un 18% de las células ubicadas en el estroma peritumoral tenían co-tinción positiva al proCol11A1 y a la CK7, cifra que se elevaba a 25% aplicando la inmunocitofluorescencia a las células cultivadas. Como las células epiteliales no se tiñen con anti-proCol11A1, estos datos sugieren que la co-expresión de proCol11A1 y CK7 en la misma célula podría significar que la célula es una célula tumoral epitelial en el proceso de transición epitelio-mesénquima.

Apoyando los resultados de los cocultivos, los modelos de xenotrasplantes ortotópicos revelaron que cuando las células tumorales humanas Capan-1 se asocian a fibroblastos se desarrolla un tumor en el animal de mayor tamaño y con más metástasis, tanto en los ratones SCID como en los nude, si bien en éstos el tamaño es menor al ser los nude más inmunocompetentes que los SCID. Además, en los ratones nude, los tumores desarrollados cuando se asociaban las células Capan-1 a fibroblastos normales eran menores y con menos metástasis que cuando se asociaban a fibroblastos peritumorales, dato que también concuerda con la mayor proliferación de las células

Capan-1 cuando se cultivaban en presencia de fibroblastos peritumorales frente a fibroblastos normales. Los fibroblastos inyectados por sí solos no desarrollaban tumores, lo que va a favor de la calidad del proceso de extracción de las muestras y su cultivo.

La utilización del anti-proColl1A1 nos sirvió para detectar en los xenotrasplantes los fibroblastos humanos inyectados, al ser esta tinción específica de los fibroblastos humanos peritumorales y no de los de ratón. Es un método mucho más simple que la hibridación in situ y con resultados morfológicos mucho más claros. Otros autores con otros procedimientos no han sido capaz de localizar los fibroblastos inyectados por lo que especularon que desaparecían.

Podemos afirmar que la presencia de fibroblastos peritumorales favorece el crecimiento y la invasión de las células tumorales inyectadas en el animal. Además, que constituye un modelo agresivo de pocos días de evolución, apto para ensayar nuevas terapias.

El modelo de trasplantar rodajitas de muestras frescas de adenocarcinoma ductal de páncreas de pacientes operados también desarrollaba tumores de mayor crecimiento local que el modelo con Capan-1 sin fibroblastos, pero sin incidencia de metástasis al cabo de las tres semanas del implante. Seguramente alargando el tiempo del sacrificio de los animales se desarrollarían metástasis. El modelo de las rodajitas es más similar al cáncer de páncreas de los pacientes que la utilización de líneas celulares tumorales como el Capan-1, pero por lo escrito más arriba tiene el inconveniente de que es menos agresivo y se tendría que alargar el periodo de observación de los animales, lo que significa un mayor coste económico.

Este trabajo surge de la necesidad de conocer nuevos tratamientos y alternativas terapéuticas al cáncer de páncreas, que actualmente, sigue siendo un tumor con un diagnóstico tardío y un pronóstico muy desfavorable (1). A pesar del mayor conocimiento que se tiene de la fisiopatogenia a nivel molecular, con el papel relevante de los genes implicados en el proceso de crecimiento local y a distancia, el tratamiento sigue siendo frustrante (3, 5).

El cáncer de páncreas sigue teniendo factores ambientales, como el tabaco, la diabetes mellitus, pancreatitis crónica que aumentan el riesgo de padecerlo, y además se buscan factores genéticos que puedan estar implicados. El conocimiento de todos ellos va a favorecer buscar nuevas alternativas terapéuticas (152, 153, 154). Ya existen estudios que demuestran que un registro de cáncer familiar sería un instrumento potente frente a los tumores hereditarios, como la mama, ovario, colon, y seguramente, páncreas (155).

El tratamiento del cáncer de páncreas, aunque todavía con tasas de supervivencia muy bajas, va mejorando con las nuevas oportunidades relacionadas con los regímenes actuales más activos de poliquimioterapia, las terapias dirigidas y los enfoques de inmunoterapia más recientes. Por eso, buscamos nuevas dianas de tratamiento para este tumor (156, 157).

Para la tesis nos apoyamos en la importancia, cada vez mayor, del estroma peritumoral. Sabemos que los fibroblastos peritumorales están involucrados en el comportamiento entre las células de cáncer de páncreas y el estroma del cáncer. Estas interacciones producen progresión tumoral, metástasis, hipoxia tumoral y resistencia a fármacos (158). Esta es la razón por la cual se realizan estudios experimentales preclínicos que actúan sobre el estroma del tejido pancreático (159).

Esta tesis desarrolla la necesidad de crear un modelo de cáncer de páncreas humano en el ratón, como animal de experimentación, y sobre el cual hemos podido estudiar el comportamiento del tumor. Analizar los genes que están implicados en la biología tumoral y las dianas sobre las cuales se podrían conseguir tratamientos dirigidos.

Los aspectos fundamentales a tener en cuenta para un trabajo de experimentación son la elección del modelo animal y los protocolos para conseguir el objeto de investigación (127).

El objetivo principal del estudio ha sido analizar las vías de crecimiento local y diseminación del cáncer de páncreas, e intentar estudiar nuevos fármacos para su tratamiento. El crecimiento local y diseminación apoyada por la capacidad de los fibroblastos peritumorales de facilitar la invasión tumoral. En este sentido hemos conseguido un modelo animal de cáncer de páncreas humano sobre el cual trabajar pero necesitamos más estudios para lograr el fármaco que supere la supervivencia, con respecto a lo ya conocido, de este tumor.

Sin embargo, cuando se investiga con modelos animales y se analiza en profundidad todos los pasos a seguir, se consiguen conclusiones importantes que también hemos estudiado. En nuestro caso, hemos añadido el estudio de la relación directa de los fibroblastos peritumorales, matriz celular, con las células tumorales y la capacidad de favorecer el crecimiento tumoral de estas células.

Existe una relación directa que confirma que los fibroblastos de la reacción desmoplásica peritumoral facilitan la invasión tumoral, en la línea de lo publicado por otros autores (88-92). Los fibroblastos normales de tejido no son iguales que los fibroblastos peritumorales.

En cuanto a los fibroblastos peritumorales, hemos conseguido el crecimiento “in vitro” de los mismos a partir de las muestras quirúrgicas de los pacientes intervenidos en el nuestro hospital, con ello podemos darle capacidad para ser reproducido por otros grupos u otros estudios siempre que sea necesario. Además se demuestra, al igual que la literatura, el crecimiento más rápido de los cocultivos de células tumorales con peritumorales frente a las tumorales. Esto es, en definitiva, demostrar nuestro primer objetivo de la tesis, los fibroblastos peritumorales favorecen el crecimiento de las células tumorales.

La inmunohistoquímica de los cultivos van a favorecer la teoría sobre la diferencia entre los fibroblastos peritumorales y normales como células distintas, ya que como demostró la Dra. García Pravia (112) el proCol11A1 es un marcador específico para los fibroblastos peritumorales y no para los normales, y por lo tanto, anti-proCol11A1 es una nueva herramienta poderosa para la investigación del cáncer y el diagnóstico clínico. Y la expresión del proCol11A1 es un biomarcador notable de carcinoma humano asociado a las células estromales y progresión de carcinoma (140).

Por otro lado, es bien conocida la dificultad en obtener cultivos de células epiteliales por la gran contaminación con fibroblastos en esos cultivos. Pero nuestro fin era otro: obtener fibroblastos normales y peritumorales lo más puros posibles.

El hecho de que nuestras muestras de fibroblastos no estaban contaminadas con células tumorales lo demuestra el que en los trasplantes realizados únicamente con fibroblastos ningún animal desarrolló tumor. Los fibroblastos de tejidos no patológicos no se tiñen con SMA ni con proCO111A1. Sin embargo, bajo las condiciones artificiales del cultivo, algunos fibroblastos obtenidos de aéreas no tumorales adquieren positividad para dichos marcadores por las condiciones artificiales a las que están sometidos.

El modelo animal como base para conseguir nuestro estudio experimental, basándonos con la literatura (160), son ratones SCID y *nude* que nos han sido de gran utilidad para realizar los xenotrasplantes debido al fácil manejo y adaptación al medio de trabajo. Los ratones *nude* tienen una deficiencia de la función tímica. Por una falta de linfocitos T estos ratones no rechazan piel o tumores de otras cepas y especies. Y los ratones SCID que tiene una mutación autosómica recesiva, como explicado en la introducción, por lo que son deficientes en la producción de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, y linfocitos B, productores de inmunoglobulinas y de la inmunidad humoral. Los ratones SCID son todavía más incapaces de diferenciar lo “propio” de lo “no propio” y de una manera más acentuada que los *nude*.

Decidimos realizar xenotrasplante ortotópico (134), en vez de heterotópico, ya que es más real la interacción del tumor-huésped para aparición de enfermedad metastásica, sitio específico de la terapia y expresión de los genes específicos, y nuestro objetivo de trabajo cumplía con estas características. Existen también desventajas como el tiempo de trabajo que es más elaborado y el coste que se eleva sobre el heterotópico, sin embargo, con las células obtenidas en nuestro laboratorio y realizando la intervención sobre el protocolo escrito, es una técnica reproducible.

Debido a la característica de estos ratones de la inmunosupresión, hemos conseguido, en definitiva, demostrar que el ratón inmunodeprimido es el candidato idóneo para realizar un modelo animal de cáncer de páncreas humano y, de forma experimental, buscar más alternativas para el tratamiento tumoral sistémico.

En nuestra tesis podemos concluir que los resultados obtenidos de los modelos de ratón con xenotrasplante para crear un modelo animal de cáncer de páncreas humano, son concordantes con la literatura y demostramos como los cocultivos de células tumorales con fibroblastos peritumorales favorecen la proliferación de las células tumorales frente a cuando son cultivadas solas o asociadas a fibroblastos normales.

Con todo ello, se necesitan muchos estudios para conocer la biología tumoral y se necesitan investigaciones para conocer más genes relacionados con la oncogénesis del cáncer de páncreas, las investigaciones van despacio (161), de este modo, y con un conocimiento más completo se pueden plantear nuevos tratamientos sobre dianas concretas. En este trabajo con un xenotrasplante de células tumorales y peritumorales en la cabeza del páncreas del ratón, hemos podido concluir que existe una influencia clara de los fibroblastos peritumorales en el crecimiento local y diseminación a distancia del tumor.

El porcentaje tan pobre de supervivencia del cáncer de páncreas, en la literatura el porcentaje de supervivencia es un 5 %, en casos de la enfermedad no avanzada tiene una supervivencia media de doce a veinte meses y los pacientes con tumores localmente avanzados o con metástasis no superan los seis meses, nos impulsa a realizar estudios para conseguir terapia diana contra el tumor. Además sabemos que la gemcitabina ha sido la piedra angular del tratamiento en todas las etapas de la enfermedad durante las últimas dos décadas, pero la resistencia a la gemcitabina se desarrolla, y actualmente se tiende a buscar fármacos que actúen contra el estroma y microambiente tumoral (162). La indicación quirúrgica y la técnica empleada son factores fundamentales para tratar la enfermedad pero debemos añadir un tratamiento sistémico más agresivo contra la biología tumoral. Además la expresión de genes es un pilar fundamental, hoy día y en el futuro, para valorar el tratamiento adecuado.

Respecto al segundo objetivo de este estudio, analizar la detección de genes, hay evidencias en la literatura de la importancia del gen erizo como regulador de la diferenciación celular, la proliferación, la polaridad del tejido, el mantenimiento de células madre y la carcinogénesis (98, 99). Así como su papel específico en el cáncer de páncreas. Aún más emocionante es el descubrimiento y la síntesis de antagonistas de señalización específicos para la vía hedgehog, que tienen implicaciones clínicas significativas en la nueva terapéutica del cáncer (163).

El modelo animal basado en el xenotrasplante de células tumorales Capan-1 y fibroblastos peritumorales presenta elevada expresión de los genes SMO y BMP-7. Con esto podemos discutir sobre la sobreexpresión de SMO en los fibroblastos peritumorales. Y apoyándonos en el trabajo de Walter et al. (118) la sobreexpresión de SMO activa la vía de hedgehog y favorece la progresión tumoral. Nuestra tesis puede afirmar que los fibroblastos peritumorales humanos sobreexpresan el gen SMO de la vía Hedgehog, llegando a favorecer su activación y por lo tanto la proliferación celular descontrolada.

El reto es identificar agentes que apuntan a la vía de SMO y desarrollar estrategias para superar la resistencia a los fármacos adquiridos a los inhibidores Smo actuales con una comprensión más profunda de los mecanismos de resistencia. Esto nos daría fármacos eficaces para el tratamiento del cáncer de páncreas (164).

El último objetivo de nuestra tesis, estudiar de forma más específica la proteína BMP-7 en el cáncer de páncreas, basándonos en estudios que demuestran o parece que pueda existir un doble papel de esta proteína en la carcinogénesis (123, 124). En los trabajos publicados sobre este aspecto, parece que la BMP-7 “in vitro” cambia la morfología de los fibroblastos y disminuye la migración de los mismos, por lo que nos interesaba utilizarla en nuestro modelo animal basándonos en nuestro objetivo principal de la tesis. De esta forma y con esta característica, la proteína sería capaz de retener el crecimiento local del tumor y su diseminación metastásica.

Además, inhibe la transición epitelio-mesenquimal, por lo que parece que detiene el paso de las células epiteliales a migratorias y, por lo tanto, su capacidad para diseminarse, pero su papel contradictorio es por inducir la transición mesénquima-epitelial.

En nuestro estudio de investigación realizamos los xenotrasplantes sobre un número no despreciable de ratones, para intentar conseguir resultados y conclusiones significativas. A pesar de conseguir un porcentaje elevado de ratones a tratar con esta proteína, con un porcentaje muy reducido de fallecimientos postoperatorios, las conclusiones no fueron significativas y se necesitan más estudios para lograr unos datos más reales.

Podemos concluir que el tratamiento con BMP-7, en nuestro trabajo, solo o combinado con gemcitabina controla el crecimiento local del tumor, al igual que la gemcitabina que es el tratamiento sistémico utilizado para el cáncer de páncreas, sin embargo, no parece que tenga esa capacidad para las metástasis ya que el número de las mismas en los ratones que hemos trasplantado es mucho mayor.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La obtención de fibroblastos peritumorales “in vitro” en nuestros laboratorios, a partir de muestras quirúrgicas de cáncer de páncreas y colon, es factible pero con un porcentaje bajo de logros.
2. Existen diferencias significativas en cuanto al crecimiento celular entre fibroblastos peritumorales y normales. Con una curva de crecimiento mayor en los fibroblastos peritumorales.
3. Las células Capan-1 tienen mayor proliferación cuando se cultivan en presencia de fibroblastos peritumorales que asociadas a fibroblastos normales o sin ellos.
4. El trasplante de células Capan-1 con fibroblastos peritumorales producen un modelo de cáncer de páncreas muy agresivo, comparado con los otros modelos, con gran crecimiento tumoral y presencia de metástasis a distancia.
5. Los xenotrasplantes en ratones *nude* producen tumores menos agresivos comparados cuando se realizan en ratones SCID.
6. Los fibroblastos peritumorales juegan un papel importante en el cáncer, ya que facilitan la invasión tumoral a nivel local y a distancia.
7. El modelo realizado con la combinación de células Capan-1 y fibroblastos peritumorales nos sirve para el estudio de futuras terapias centradas en la matriz extracelular de los tejidos.
8. En cuanto al tratamiento con el BMP 7 se necesitan más estudios, pero parece inhibir la invasión local del tumor, y sin embargo, favorece las metástasis a distancia por la inducción de la transición mesénquima-epitelial.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Globocan.iarc.fr [Internet]. Lyon, France: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC (International Agency for Research on Cancer); 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7.
3. Parrilla Paricio P, Landa García JL. Adenocarcinoma de páncreas y del área periampular. *Manual de Cirugía de la AEC*. 2ª ed. Madrid: Panamerica; 2010: 765-779.
4. López Serrano A. Risk factors and early diagnosis of pancreatic cancer. *Gastroenterol Hepatol*. 2010; 33: 382-90.
5. Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic cancer: State-of-the-art care. *CA Cancer J Clin*. 2000; 50: 241-68.
6. Yeo TP, Lowenfels AB. Demographics and epidemiology of pancreatic cancer. *Cancer J*. 2012; 18: 477-84.
7. Yeo TP. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol*. 2015; 42(1): 8-18.
8. Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97 (19): 1458- 65.
9. Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM et al. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90 (22): 1710-9.

10. Larsson SC, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer*. 2012; 106 (3): 603-607.
11. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary meat, dairy products, fat, and cholesterol and pancreatic cancer risk in a prospective study. *Am J Epidemiol*. 2003; 157 (12): 1115-25.
12. Rohrmann S, Linseisen J, Nöthlings U, Overvard K, Egeberg R, Tionneland A, et al. Meat and fish consumption and risk of pancreatic cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2013 (3); 132: 617-624.
13. Bosetti C, Bravi F, Turati F, Edefonti V, Polesel J, Decarli A, et al. Nutrient-based dietary patterns and pancreatic cancer risk. *Ann Epidemiol*. 2013; 23 (3): 124-8.
14. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102: 2696-707.
15. Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, et al. Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*. 2012; 23 (2): 374-382.
16. Michaud DS, Vrieling A, Jiao L, Mendelsohn JB, Steplowski E, Lynch SM, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). *Cancer Causes Control*. 2010; 21 (8): 1213-2025.

17. Turati F, Galeone C, Edefonti V, Ferraroni M, Lagiou P, La Vecchia C, et al. A meta-analysis of coffee consumption and pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 2012; 23 (2): 311-8.
18. Dong J, Zou J, Yu XF. Coffee drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol.* 2011; 17 (9): 1204-1210.
19. Nie K, Xing Z, Huang W, Wang W, Liu W. Coffee intake and risk of pancreatic cancer: an updated meta-analysis of prospective studies. *Minerva Med.* 2016; 107 (4): 270-8.
20. Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, et al. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med.* 1996; 156 (19): 2255-2260.
21. Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, Kraft P, Mendelsohn JB, Hartge P, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol.* 2009; 170 (4): 403-13.
22. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol.* 2012; 23 (7): 1880-1888.
23. Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN, et al. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97 (19): 1458-1465.
24. Tranah GJ, Holly EA, Wang F, Bracci PM. Cigarette, cigar and pipe smoking, passive smoke exposure, and risk of pancreatic cancer: a population-based study in the San Francisco Bay Area. *BMC Cancer.* 2011; 11: 138.

25. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA*. 2001; 286 (8): 921-929.
26. Aune D, Greenwood DC, Chan DS, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, et al. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol*. 2012; 23 (4): 843-52.
27. Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Body mass index and physical activity as risk factors for pancreatic cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Causes Control*. 2007; 18 (2): 165-75.
28. Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*. 2009; 301 (24): 2553-62.
29. Yuan C, Bao Y, Wu C, Kraft P, Ogino S, Ng K, et al. Prediagnostic body mass index and pancreatic cancer survival. *J Clin Oncol*. 2013; 31 (33): 4229-34.
30. Batabyal P, Vander Hoorn S, Christophi C, Nikfarjam M. Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of 88 studies. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21 (7): 2453-62.
31. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer associated diabetes mellitus. *Gastroenterology*. 2008; 134 (4): 981-7.
32. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Italian Pancreatic Cancer Study Group. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 1994; 331: 81.
33. Elena JW, Steplowski E, Yu K, Hartge P, Tobias GS, Brotzman MJ. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Cancer Causes Control*. 2013; 24 (1): 13-25.

34. Dugnani E, Gandolfi A, Balzano G, Scavini M, Pasquale V, Aleotti F. et al. Diabetes associated with pancreatic ductal adenocarcinoma is just diabetes: Results of a prospective observational study in surgical patients. *Pancreatology*. 2016; 16 (5): 844-52.
35. Huang J, Zagai U, Hallmans G, Nyren O, Engstrand L, Stolzenberg-Solomon R, et al. Helicobacter pylori infection, chronic corpus atrophic gastritis and pancreatic cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort: a nested case control Study. *Int J Cancer*. 2017; 140 (8): 1727-1735.
36. Duell EJ, Lucenteforte E, Olson H, Bracci PM, Li D, Risch HA, et al. Pancreatitis and pancreatic cancer Risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*. 2012; 23 (11): 2964-2970.
37. Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2001; 7 (3): 738-44.
38. Klein AP1, Hruban RH, Brune KA, Petersen GM, Goggins M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J*. 2001; 7 (4): 266-73.
39. Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grützmann R, Gerdes B, Pilarsky C, et al. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int J Cancer*. 2004; 110 (6): 902-6.
40. James TA, Sheldon DG, Rajput A, Kuvshinoff BW, Javle MM, Nava HR, et al. Risk factors associated with earlier age of onset in familiar pancreatic carcinoma. *Cancer*. 2004; 101 (12): 2722-6.

41. McWilliams RR, Rabe KG, Olswold C, De Andrade M, Petersen GM. Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*. 2005; 104 (2): 388-94.
42. Joergensen MT, Brusgaard K, Crüger DG, Gerdes AM, Schaffalitzky de Muckadell OB. Genetic, epidemiological, and clinical aspects of hereditary pancreatitis: a population-based cohort study in Denmark. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105 (8): 1876-83.
43. Iqbal J, Ragone A, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Ghadirian P, et al. The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer*. 2012; 107(12): 2005-9.
44. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95 (3): 214-21.
45. Holter S, Borgida A, Dodd A, Grant R, Semotiuk K, Hedley D, et al. Germline BRCA mutations in a large clinic-based cohort of patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2015; 33 (28): 3124-9.
46. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996; 14 (2): 141-5.
47. Su GH, Hruban RH, Bansal RK, Bova GS, Tang DJ, Shekher MC, et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz- Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol*. 1999; 154 (6): 1835-40.
48. Roberts NJ, Norris AL, Petersen GM, Bondy ML, Brand R, Gallinger S, et al. Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Discov*. 2016; 6 (2): 166-75.

49. Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE, Goggins M, Kern SE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J*. 2001; 7(4): 251-8.
50. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*. 2008; 3: 157-88.
51. Hamilton SR, Aaltonen L. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press; 2000.
52. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*. 2005; 7(5): 189-97.
53. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol*. 1999; (10 Suppl 4): 82.
54. Kalsner MH, Barkin J, MacIntyre JM. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer*. 1985; 56 (2): 397-402.
55. Furukawa H, Okada S, Saisho H, Ariyama J, Karasawa E, Nakaizumi A, et al. Clinicopathologic features of small pancreatic adenocarcinoma. A collective study. *Cancer*. 1996; 78 (5): 986-90.
56. Tsuchiya R, Noda T, Harada N, Miyamoto T, Tomioka T, Yamamoto K, et al. Collective review of small carcinomas of the pancreas. *Ann Surg*. 1986; 203 (1): 77-81.
57. Xue-Li Bai S, Zhang Q, Masood W, Masood N, Tang Y, Cao CH, et al. Mary Joseph's nodule as a first sign of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 6686-9.
58. Horino K, Takamori H, Ikuta Y, Nakahara O, Chikamoto A, Ishiko T, et al. Cutaneous metastases secondary to pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2012; 4: 176-80.

59. Dumitra S1, Jamal MH, Aboukhalil J, Doi SA, Chaudhury P, Hassanain M, et al. Pancreatic cancer and predictors of survival: comparing the CA 19-9/bilirubin ratio with the McGill Brisbane Symptom Score. *HPB (Oxford)*. 2013; 15(12): 1002-9.
60. Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2006; 73: 485-92.
61. Valls C, Andía E, Sanchez A, Fabregat J, Pozuelo O, Quintero JC, et al. Dual-phase helical CT of pancreatic adenocarcinoma: assessment of resectability before surgery. *AJR Am J Roentgenol*. 2002; 178 (4): 821-6.
62. Ansari NA, Ramalho M, Semelka RC, Buonocore V, Gigli S, Maccioni F. Role of magnetic resonance imaging in the detection and characterization of solid pancreatic nodules: An update. *World J Radiol*. 2015; 7(11): 361-74.
63. Varghese JC, Farrell MA, Courtney G, Osborne H, Murray FE, Lee MJ. Role of MR Cholangiopancreatography in patients with failed or inadequate ERCP. *AJR Am J Roentgenol*. 1999; 173(6): 1527-33.
64. Singer E, Gschwantler M, Plattner D, Kriwanek S, Armbruster C, Schueller J, et al. Differential diagnosis of benign and malignant pancreatic masses with 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography recorded with a dual-head coincidence gamma camera. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 19 (6): 471-8.
65. Edge SB, Byrd DR, Compton CC. Exocrine and endocrine pancreas. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Ed. New York, NY: Springer; 2010: 241-9.
66. Callery MP, Chang KJ, Fishman EK, Talamonti MS, Traverso L, Linehan DC. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16 (7): 1727-33.

67. Carlos Fernández-del Castillo, Ramón E Jiménez, Michael L Steer. Overview of surgery in the treatment of exocrine pancreatic cancer and prognosis [sede Web]. [Enero 2016; 4 febrero 2016]. Waltham, Massachusetts. Disponible en: <http://uptodate.com>.
68. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, et al. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg*. 1995; 221 (6): 721-31.
69. Metreveli RE1, Sahm K, Abdel-Misih R, Petrelli NJ. Major pancreatic resections for suspected cancer in a community-based teaching hospital: lessons learned. *J Surg Oncol*. 2007; 95 (3): 201-6.
70. Kim SC, Kim YH, Park KM, Lee YJ. Pancreatic cancer surgery: the state of the art. *Curr Drug Targets*. 2012; 13(6): 764-71.
71. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012; 23 Suppl 7: 33.
72. Guo XZ, Cui ZM, Liu X. Current developments, problems and solutions in the non-surgical treatment of pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2013; 5 (2): 20-8.
73. David P Ryan, Harvey Mamon. Adjuvant therapy for resected exocrine pancreatic cancer [sede Web]. [Enero 2016; 3 febrero 2016]. Waltham, Massachusetts. Disponible en: <http://uptodate.com>.
74. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007; 297 (3): 267-77.

75. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Lancet*. 2001; 358: 1576-85.
76. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350 (12): 1200-10.
77. Birkmeyer JD, Siewers AE, Finlayson EV, Stukel TA, Lucas FL, Batista I, et al. Hospital volume and surgical mortality in the United States. *N Engl J Med*. 2002; 346 (15): 1128-37.
78. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*. 2013; 310 (14): 1473-81.
79. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010; 304 (10): 1073-81.
80. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg*. 1985; 120: 899.
81. Van den Broeck A, Sergeant G, Ectors N, Van Steenberghe W, Aerts R, Topal B. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2009; 35(6): 600-6.
82. Versteijne E, Van Eijck CH, Punt CJ, Suker M, Zwinderman AH, Dohmen MA, et al. Preoperative radiochemotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer (PREOPANC trial): study protocol for a multicentre randomized controlled trial. *Trials*. 2016; 17 (1): 127.

83. Casadei R, Di Marco M, Ricci C, Santini D, Serra C, Calculli L, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery versus surgery alone in resectable pancreatic cancer: a single-center prospective, randomized, controlled trial which Failed to achieve accrual targets. *J Gastrointest Surg.* 2015; 19 (10): 1802-1812.
84. Golcher H, Brunner TB, Witzigmann H, Marti L, Bechstein WO, Bruns C, et al. Neoadjuvant chemoradiation therapy with gemcitabine/cisplatin and surgery versus immediate surgery in resectable pancreatic cancer: results of the first prospective randomized phase II trial. *Strahlenther Onkol.* 2015; 191 (1): 7-16.
85. Tachezy M, Gebauer F, Petersen C, Arnold D, Trepel M, Wegscheider K, et al. Sequential neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) followed by curative surgery vs. primary surgery alone for resectable, non-metastasized pancreatic adenocarcinoma: NEOPA- a randomized multicenter phase III study. *BMC Cancer.* 2014; 14: 411.
86. David P Ryan. Chemotherapy for advanced exocrine pancreatic cancer. [Sede Web]. [Enero 2016; 3 febrero 2016]. Waltham, Massachusetts. Disponible en: <http://uptodate.com>.
87. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, Fingerle AA, Dobritz M, Kleeff J, Friess H. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 454-467.
88. Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W. & Pandol, S. J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 50-59.
89. Apte MV, Wilson JS. Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27 Suppl. 2: 69-74.

90. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012; 61 (2): 172-178.
91. Pandol S. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2009; 11 Suppl. 7: 44-47.
92. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Shimosegawa T. NADPH oxidase plays a crucial role in the activation of pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2008; 294 (1): 99-108.
93. Drifka CR, Tod J, Loeffler AG, Liu Y, Thomas GJ, Eliceiri KW, et al. Periductal stromal collagen topology of pancreatic ductal adenocarcinoma differs from that of normal and chronic pancreatitis. *Mod Pathol*. 2015; 28 (11): 1470-80.
94. Morse DL, Balagurunathan Y, Hostetter G, Trissal M, Tafreshi NK, Burke N, et al. Identification of novel pancreatic adenocarcinoma cell-surface targets by gene expression profiling and tissue microarray. *Biochem. Pharmacol*. 2010; 80 (5): 748-754.
95. Samkharadze T, Erkan M, Reiser-Erkan C, Demir IE, Kong B, Ceyhan GO et al. Pigment epithelium-derived factor associates with neuropathy and fibrosis in pancreatic cancer. *Am. J. Gastroenterol*. 2011; 106 (5): 968-980.
96. Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I, Kolb A, et al. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2008; 6 (10): 1155-1161.
97. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*. 1980; 287 (5785): 795-801.

98. Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*. 2002; 129 (23): 5323-37.
99. Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*. 2010; 29 (4): 469-81.
100. Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, et al. Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*. 1992; 69 (1): 111-7.
101. Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*. 2008; 15(6): 801-812.
102. Epstein EH. Basal cell carcinomas: Attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(10): 743-754.
103. Liu H, Gu D, Xie J. Clinical implications of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Chin J Cancer*. 2011; 30 (1): 13- 26.
104. Eggenschwiler JT, Anderson KV. Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23: 345-73.
105. Bale AE. Hedgehog signaling and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002; 3: 47-65.
106. Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. 2004; 304 (5678):1755-9.
107. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature*. 2002; 418: 892-7.

108. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3b eta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*. 1997; 124(7): 1313-1322.
109. Feldmann G, Habbe N, Dhara S, Bisht S, Alvarez H, Fendrich V, et al. Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut*. 2008; 57: 1420-1430.
110. Walter K, Omura N, Hong SM, Griffith M, Vincent A, Borges M, et al. Overexpression of smoothed activates the sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Clin Cancer Res*. 2010; 16 (6): 1781-9.
111. Isohata N, Aoyagi K, Mabuchi T, Daiko H, Fukaya M, Ohta H, et al. Hedgehog and epithelial-mesenchymal transition signaling in normal and malignant epithelial cells of the esophagus. *Int J Cancer*. 2009; 125(5): 1212-21.
112. García-Pravia C, Galván JA, Gutiérrez-Corral N, Solar-García L, García-Pérez E, García-Ocaña M, et al. Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2013; 8(10).
113. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008; 22: 2454-72.
114. Inaguma S, Kasai K, Ikeda H. GLI1 facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin. *Oncogene*. 2011; 30 (6): 714-23.
115. Dai J, Ai K, Du Y, Chen G. Sonic hedgehog expression correlates with distant metastasis in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2011; 40 (2): 233-6.
116. Kelleher FC. Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2011; 32: 445-51.

117. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors Chur Switz* 1992; 7 (2):139- 50.
118. Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DDF, et al. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem* 2010; 109 (2):406- 16.
119. Yeh L-CC, Tsai AD, Lee JC. Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. *J Cell Biochem* 2002; 87(3): 292- 304.
120. Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(4): 545-59.
121. Hak DJ, Makino T, Niikura T, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. *J Orthop Res Off. Publ Orthop Res Soc* 2006 Jan; 24 (1):11- 20.
122. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, Verdonk R, Blokhuis TJ, Cherubino P, et al. Application of bone morpho-genetic proteins to femoral non-unions: A 4-year multicentre experience. *Injury* 2009 Dec; 40 (Supplement 3): S54- 61.
123. Alarmo EL, Pärssinen J, Ketolainen JM, Savinainen K, Karhu R, et al. (2009) BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast Cancer cells. *Cancer Lett* 275: 35-43.
124. Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR, Watabe M, et al. (2011) Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med* 208: 2641-2655.

125. Céspedes MV, Casanova I, Parreño M, Manges R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006; 8 (5): 318-29.
126. Huynh AS, Abrahams DF, Torres MS, Baldwin MK, Gillies RJ, Morse DL. Development of an orthotopic human pancreatic cancer xenograft model using ultrasound guided injection of cells. *PLoS One*. 2011; 6.
127. Becher OJ, Holland EC. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res* 2006; 66 (7): 3355-8.
128. Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*. 2007; 2: 247-250.
129. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. *Annual Review of Immunology*. 1991; 9:323-350.
130. Richmond A, Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech*. 2008; 1: 78-82.
131. Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, Tan AC, De Oliveira E, Karikari C, et al. Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 5793-5800.
132. Feldmann G, Mishra A, Bisht S, Karikari C, Garrido-Laguna I, Rasheed Z, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biol Ther*. 2011; 12: 598-609.
133. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Reviews*. 1998; 17 (3): 279-284.

134. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev.* 1998; 17: 279–284.
135. Partecke IL, Kaeding A, Sendler M, Albers N, Kühn JP, Speerforck S, et al. In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model. *BMC Cancer.* 2011; 11.
136. Kerbel RS. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 17(3): 301-4.
137. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1977; 59(1): 221-6.
138. Kyriazis AP, Kyriazis AA, Scarpelli DG, Fogh J, Rao MS, Lepera R. Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics. *Am J Pathol.* 1982; 106 (2): 250-60.
139. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas.* 2010; 39(4): 425-35.
140. Vázquez-Villa F, García-Ocaña M, Galván JA, García-Martínez J, García-Pravia C, Menéndez-Rodríguez P, et al. COL11A1/ (pro) collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biol.* 2015; 36(4): 2213-22.
141. Fuentes-Martínez N, García-Pravia C, García-Ocaña M, Menéndez-Rodríguez P, Del amo J, Suárez-Fernández L, et al. Overexpression of proCOL11A1 as a stromal marker of breast cancer. *Histol Histopathol.* 2015; 30: 87 – 93.

142. Galván JA, García-Martínez J, Vázquez-Villa JF, García-Ocaña M, García-Pravia C, Menéndez-Rodríguez P, et al. Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF-beta1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2014; 14: 867.
143. García-Ocaña M, Vázquez-Villa F, García-Pravia C, Fuentes-Martínez N, Menéndez-Rodríguez P, Fresno-Forcelledo F, et al Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor associated stromal component. *Intl J Oncol*. 2012; 40(5): 1447 - 1454
144. Feig C1, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(16): 4266-76.
145. Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherjee S, Duncan VE, Page GP, et al. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron*. 2009; 2(1): 9-21.
146. Luciani MG, Seok J, Sayeed A, Champion S, Goodson WH, Jeffrey SS, et al. Distinctive responsiveness to stromal signaling accompanies histologic grade programming of cancer cells. *PLoS One*. 2011; 6(5).
147. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999; 59 (19): 5002-11.
148. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6 (4): 1186-97.
149. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(5-6): 509-17.

150. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 2008; 68(3): 918-26.
151. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): 646-74.
152. Yeo TP. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol.* 2015; 42 (1): 8-18.
153. Overbeek KA, Cahon DL, Canto MI, Bruno MJ. Surveillance for neoplasia in the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016; 30 (6): 971-986.
154. Sarnecka AK, Zagozda M, Durlik M. An overview of genetic changes and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer.* 2016; 7 (14): 2045-2051.
155. Catts ZA, Baig MK, Milewski B, Keywan C, Guarino M, Petrelli N, et al. Statewide Retrospective Review of Familial Pancreatic Cancer in Delaware, and Frequency of Genetic Mutations in Pancreatic Cancer Kindreds. *Ann Surg Oncol.* 2016; 23(5): 1729-35.
156. Silvestris N, Brunetti O, Vasile E, Cellini F, Cataldo I, Pusceddu V, et al. Multimodal treatment of resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 111: 152-165.
157. Kim S, Kon M, DeLisi C. Pathway-based classification of cancer subtypes. *Bio Direct.* 2012; 7:21.
158. Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV, et al. Pancreatic stellate cell: Pandora's Box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(3): 382-405.

159. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol.* 2012; 3: 344.
160. Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, Brooks J, Demir IE, Steiger K, Ribback S, et al. Administration of Gemcitabine After Pancreatic Tumor Resection in Mice Induces an Antitumor Immune Response Mediated by Natural Killer Cells. *Gastroenterology.* 2016; 151(2): 338-350.
161. Lerch MM, Mayerle J, Mahajan U, Sendler M, Weiss FU, Aghdassi A, et al. Development of Pancreatic Cancer: Targets for Early Detection and Treatment. *Dig Dis.* 2016; 34(5):525-31.
162. Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat.* 2015; 23: 55-68.
163. Xie J. Hedgehog signaling pathway: development of antagonists for cancer therapy. *Curr Oncol Rep.* 2008; 10(2): 107-13.
164. Khatra H, Bose C, Sinha S. Discovery of hedgehog antagonists for cancer therapy. *Curr Med Chem.* 2017.

ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO I. Protocolos utilizados en la tesis.

PROTOCOLO I: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

1. Identificación del paciente
2. Fecha de la intervención
3. Ubicación del tumor
4. Estadío (TNM) según el cirujano
5. Muestras almacenadas en nitrógeno líquido:
 - Controles normales (nº de crioviales):
 - Peritumoral (nº de crioviales):
 - Tumor (nº de crioviales):
6. Muestras para cultivo
 - Controles normales
 - Peritumoral
 - Tumor
7. Diagnóstico AP
8. Estadío final según AP (adjuntar copia informe AP)
9. Confirmación de los cultivos (creció/contaminación)
 - Controles normales
 - Peritumoral
 - Tumor
10. Los cultivos se emplearon para:
 - Inmunohistoquímica -Expresión genes
 - Xenotrasplantes -Western-blot

PROTOCOLO II: TRASLADO DE LA PIEZA QUIRÚRGICA A ANATOMÍA PATOLÓGICA

1. Todos los viernes, decidir las intervenciones de la semana siguiente para obtener muestras (colon/páncreas). Remitir la información a:

Eva (cultivos): 669*****

García Pravia (AP): 696*****

Patricia (N2 líquido) 679*****

2. En el día de la intervención, si la pieza es extirpable o no, comunicarlo a los anteriores, y en el caso de ser extirpable, llamar para la lechera con nitrógeno líquido a:

Patricia: 679*****

O

Toyos: 626*****

3. En el día de la intervención, colocar en el congelador la cubeta metálica, que alojará la pieza quirúrgica con seis bolsas de 250 ml de suero salino.

4. Obtener suero del paciente en quirófano: dos tubos con tapón rojo.

5. Lo más rápidamente posible, poner la pieza quirúrgica en la cubeta, rodeada de las bolsas de solución salina, y trasladarla a Anatomía Patológica.

PROTOCOLO III: OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA CULTIVO Y CONSERVACIÓN EN N₂ LÍQUIDO

1. De forma aséptica, con la pieza dentro de la cubeta rodeada de hielo, con bisturí fino se escindirá primero el tejido normal, luego el peritumoral, y, finalmente, el tumoral.

2. Primero, rodajitas de 2-3 mm para su conservación en N₂:

-Crioviales 1-3: tejido normal

-Crioviales 4-6: peritumoral

-Crioviales 7-9: tumor

Lo crioviales se introducirán rápidamente en la lechera.

Se llevará también los dos tubos de suero del paciente.

3. Luego, muestras para cultivo en el mismo orden e identificación, pero en tres tubos de ensayo (normal, peritumoral, tumor) con el líquido de conservación.

4. Si se ha decidido realizar xenotrasplantes: otras tres rodajitas de tumor en el líquido conservante.

PROTOCOLO IV: XENOTRASPLANTES EN RATONES INMUNODEPRIMIDOS

1. Dejar que los animales se aclimaten a su nuevo entorno (una semana).
2. Poner en marcha la campana de flujo laminar.
3. Extraer de la caja el animal bajo la campana de flujo laminar.
4. Anestesia: Ketamina (100 mg/kg) + Xylazina (20 mg/kg) ip.
5. Clip de identificación en la oreja del animal.
6. Pesar el animal.
7. Colocación en la tabla operatoria.
8. Limpieza de tórax y abdomen con Betadine.
9. Afeitar el abdomen sin producir heridas.
10. Colocación de gasas estériles en los flancos del animal.
11. Laparotomía con tijeras finas hasta el xifoides.
12. Presionando por los flancos, sacar el paquete intestinal, vertiéndolo hacia la izquierda del animal, cubierto con las gasas estériles.
13. Identificación del bazo, estómago, duodeno y páncreas.
14. Inyectar lentamente, en unos 30 segundos, a través de una aguja de 30 G, la solución de células en la cabeza del páncreas a nivel del píloro.
15. Al extraer la aguja, inmediatamente presionar la zona con suavidad con un bastoncillo de algodón, durante un minuto.
16. Comprobar el aspecto de la zona, y puntuar el procedimiento como: 0, mal ejecutado; 1, dudoso; 2, bien.
17. Recolocar las vísceras en el abdomen.
18. Cierre de la laparotomía con material fino (seda 4-5/0).
19. Observación diaria del animal, y pesarlo cada 7 días.

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS DE XENOTRASPLANTES

PROTOCOLO:

TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO:

TRASPLANTE N°

FECHA TRASPLANTE:

TIPO DE CÉLULAS INYECTADAS Y PROCEDENCIA:

CANTIDAD:

VOLUMEN:

COMENTARIOS DEL TRASPLANTE (mal, dudoso, bien):

	TX														
DIA															
PESO															
TRATAMIENTO															

DIA															
PESO															
TRATAMIENTO															

OBSERVACIONES EVOLUCIÓN DEL ANIMAL

AUTOPSIA

Fecha:

Hallazgos: -Tamaño tumor en mm (l x a)

-Hígado

-Pulmones

-Peritoneo (ascitis/implantes)

Fijación en formol

Foto

PROTOCOLO V: NECROPSIA

1. Eutanasia por dislocación cervical.
2. Incisión amplia en U abdominotorácica. Replegar el colgajo hacia la cabeza del ratón.
3. Localización de bazo/páncreas/duodeno.
4. Primera fotografía general que abarque cavidad peritoneal con hígado y páncreas.
5. Extracción en bloque de duodeno/páncreas/bazo.
6. Fotografía del tumor de páncreas.
7. Medida en escala del tumor primario en dos dimensiones: mayor y menor.
8. Introducir la muestra en formol.
9. Extracción en bloque de paquete intestinal, riñones, hígado, diafragma y pulmones: anotar, medir y fotografiar posibles implantes/metástasis.
10. Introducir en formol.
11. Ir anotando todos los hallazgos e incidencias en la hoja de recogida de datos.

PROTOCOLO TRATAMIENTO BMP7 (B) A RATONES NUDE TRASPLANTADOS CON CAPAN-1/FIBROBLASTOS PT.

FASE 1: Distribución al azar de los 20 animales en los tres grupos.

1. Grapa de identificación en la oreja
2. Pesar
3. Asignación del tratamiento
 - V (vehículo): 2 ratones: 1-2
 - G (gemcitabina): 6 ratones: 3-8
 - B (BMP7): 6 ratones: 9-14
 - GB (Gemcitabina + BMP7): 6 ratones: 15-20

Distribución de los tratamientos al azar:

Número animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Código grapa																				
Número azar	16	11	5	9	6	17	3	14	4	8	13	10	20	15	18	2	7	12	19	1
Tratamiento	GB	B	G	B	G	GB	G	B	4	G	B	B	GB	GB	GB	V	G	B	GB	V

FASE 2: Preparación de los fármacos en jeringas de insulina con agujas 27/29G teniendo en cuenta los pesos de los animales.

Identificar sin error posible las jeringas según el fármaco

-Vehículo: 200 ul de suero salino 8,5% IP a cada ratón.

-Gemcitabina: 200 ul de s. salino con 125 mg/kg peso/2 veces a la semana IP durante TRES semanas.

Si los ratones pesan alrededor de 25 g, la dosis de Gemcitabina será de 3 mg por ratón. Administrar la dosis adecuada si hay desviaciones del peso de ± 5 g sobre los 25 g.

-BMP7: 200 ul de s. salino con 100 ug/kg peso/día IP cada día menos S y D, durante TRES semanas.

Si los ratones pesan 25 g, la dosis será de 2,5 ug por ratón PREPARACIÓN DE CADA INYECCIÓN SEGÚN FERNANDO

Administrar la dosis adecuada si hay desviaciones del peso de ± 5 g sobre los 25 g.

-Gemcitabina + BMP7: en jeringas diferentes (vale una sola inyección)

FASE 3: Operación según protocolo.

1. Llevar escalonadamente las células a trasplantar evitando en lo posible tiempos prolongados de espera.

2. Tener preparado: **-Jeringa con el fármaco perfectamente identificada**

-Anestésico en perfecto estado

-Gasas estériles

-Algodoncitos

-Suero salino

-Material de sutura

-Betadine

3. Afeitar bien al animal, luego aplicar el Betadine.

4. Trasplante según protocolo: un millón de células Capan-1 más 100.000 fibroblastos peritumorales de cáncer de colon.

FASE 4: Aplicación de los tratamientos.

Una vez cerrado el animal, inyectar IP V, G ó S según el orden establecido en la fase 1.

Vehículo: cada día, menos S y D, durante TRES semanas.

Gemcitabina: L y J, durante TRES semanas.

BMPT: cada día, menos S y D, durante TRES semanas.

G + B: Gemcitabina L y J, durante TRES semanas., y BMP7 cada día, menos S y D, durante TRES semanas.

FASE 5: Seguimiento de los animales según protocolo.

Pesarlos una vez a la semana, menos S y D

Anotar anomalías del animal: afectado, no se mueve, mal “pelaje”, diarrea,...

Los fines de semana hay que ir para observar a los animales, sin necesidad de pesarles.

FASE 6: Sacrificio de los animales según protocolo.

Tres días después del último tratamiento (el lunes de la tercera semana).

Añadir al protocolo establecido:

1. Pesar el tumor primario una vez extraído el duodeno páncreas.
2. Medir el tumor en mm a lo largo y ancho.
3. Seccionar el tumor en 3 trozos: $\frac{3}{4}$ para AP en formol, $\frac{1}{4}$ en nitrógeno líquido, $\frac{1}{4}$ en DMSO y en nitrógeno líquido, aproximadamente.

Tener preparado: Crioviales; Frascos con formol; Lechera con el nitrógeno líquido; DMSO; Sistema para anotar e identificar los crioviales; Cámara fotográfica

PROTOCOLO DE TINCIÓN DE MUESTRAS

1. Fijar los cultivos con formol 10% durante 10 minutos.
2. Lavar con buffer.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena con agua oxigenada 5 minutos.
4. Lavar con buffer.
5. Anticuerpo primario según la tabla.
6. Lavar con buffer.
7. Anticuerpo secundario HRP durante 10 minutos.
8. Lavar con buffer.
9. Cromógeno con DAB (diaminobencimina) durante 5 minutos.
10. Lavar con buffer.
11. Tinción de contraste con hematoxilina durante 5 minutos.
12. Lavar con buffer.
13. Deshidratar con alcoholes de graduación creciente.
14. Aclarar con Xilol.
15. Montar con el medio habitual de montaje.

ANEXO II. RESULTADOS DE XENOTRASPLANTES

Ratones recibidos el 02/05/12				
Id	Ratón	Tx	macro	tamaño
1/ 321-1	321	210312 tumor	Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 321-2	321	210312 tumor	Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 321-3	321	210312 tumor	Hígado	no evidencia de tumor
1/ 321-4	321	210312 tumor	Intestino	no evidencia de tumor
1/ 322-1	322	210312 tumor	Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 322-2	322	210312 tumor	Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 322-3	322	210312 tumor	Hígado	no evidencia de tumor
1/ 322-4	322	210312 tumor	Intestino	no evidencia de tumor
1/ 324-1	324	210312 tumor	Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 324-2	324	210312 tumor	Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 324-3	324	210312 tumor	Hígado	no evidencia de tumor
1/ 324-4	324	210312 tumor	Intestino	no evidencia de tumor
1/ 325-1	325	210312 tumor	Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 325-2	325	210312 tumor	Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 325-3	325	210312 tumor	Hígado	no evidencia de tumor
1/ 325-4	325	210312 tumor	Intestino	no evidencia de tumor

Ratones recibidos el 03/05/12				
Id	Ratón	Tx	macro	tamaño
1/ 334-1	334		Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 334-2	334		Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 334-3	334		Hígado	no evidencia de tumor
1/ 334-4	334		Intestino	no evidencia de tumor
1/ 335-1	335		Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 335-2	335		Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 335-3	335		Hígado	no evidencia de tumor
1/ 335-4	335		Intestino	no evidencia de tumor
1/ 336-1	336		Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 336-2	336		Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 336-3	336		Hígado	no evidencia de tumor
1/ 336-4	336		Intestino	no evidencia de tumor
1/ 337-1	337		Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 337-2	337		Corazón, riñón y pulmón	no evidencia de tumor
1/ 337-3	337		Hígado	no evidencia de tumor
1/ 337-4	337		Intestino	no evidencia de tumor
1/ 338-1	338		Duodeno + páncreas + bazo	no evidencia de tumor
1/ 338-2	338		Corazón, riñón y pulmón	Adenoma 0,3 x 0,2
1/ 338-3	338		Hígado	no evidencia de tumor
1/ 338-4	338		Intestino	no evidencia de tumor

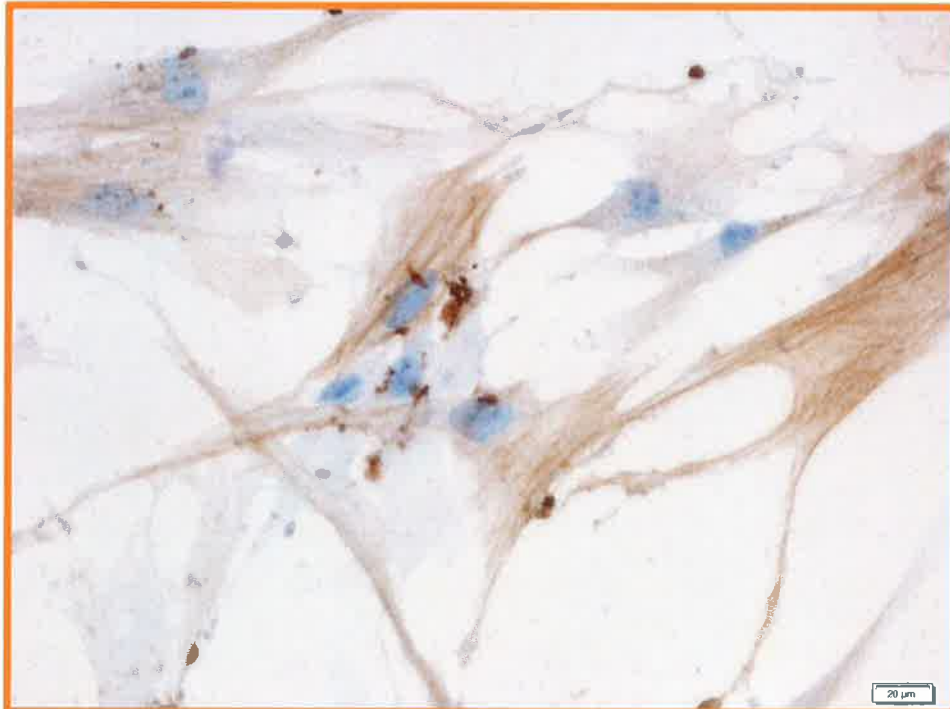
Ratones recibidos el 08/05/12 : RODAJITAS			
Id	Ratón	Tx	macro
SP 326-1	326	Tx270312 SLIDE páncreas	Duodeno + páncreas + bazo
SP 326-2	326	Tx270312 SLIDE páncreas	Corazón, riñón y pulmón
SP 326-3	326	Tx270312 SLIDE páncreas	Hígado
SP 326-4	326	Tx270312 SLIDE páncreas	Intestino
SP 327-1	327	Tx270312 SLIDE páncreas	Duodeno + páncreas + bazo
SP 327-2	327	Tx270312 SLIDE páncreas	Corazón, riñón y pulmón
SP 327-3	327	Tx270312 SLIDE páncreas	Hígado
SP 327-4	327	Tx270312 SLIDE páncreas	Intestino
SP 328-1	328	Tx270312 SLIDE páncreas	Duodeno + páncreas + bazo
SP 328-2	328	Tx270312 SLIDE páncreas	Corazón, riñón y pulmón
SP 328-3	328	Tx270312 SLIDE páncreas	Hígado
SP 328-4	328	Tx270312 SLIDE páncreas	Intestino
SP 329-1	329	Tx270312 SLIDE páncreas	Duodeno + páncreas + bazo
SP 329-2	329	Tx270312 SLIDE páncreas	Corazón, riñón y pulmón
SP 329-3	329	Tx270312 SLIDE páncreas	Hígado
SP 329-4	329	Tx270312 SLIDE páncreas	Intestino
SP 331-1	331	Tx270312 SLIDE páncreas	Duodeno + páncreas + bazo
SP 331-2	331	Tx270312 SLIDE páncreas	Corazón, riñón y pulmón
SP 331-3	331	Tx270312 SLIDE páncreas	Hígado
SP 331-4	331	Tx270312 SLIDE páncreas	Intestino
SP 332-1	332	Tx270312 SLIDE páncreas	Duodeno + páncreas + bazo
SP 332-2	332	Tx270312 SLIDE páncreas	Corazón, riñón y pulmón
SP 332-3	332	Tx270312 SLIDE páncreas	Hígado
SP 332-4	332	Tx270312 SLIDE páncreas	Intestino

º TX	FECHA DE TX	CELS INYECTADAS	TRATAMIENTO	PESO INICIAL	PESO SEM 1	PESO SEM 2	PESO SEM 3	AUTOPSIA	MACRO
16	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	23,87	23,61	23,27	23,70	18.02.13	NO
11	23.01.13	CAPAN + FPT	B	21,80				18.02.13	NO
5	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	23,78	23,98	24,25	23,60	18.02.13	NO
9	23.01.13	CAPAN + FPT	B	20,73	21,27	21,66	21,50	18.02.13	MTX H
6	23.01.13	CAPAN + FPT	G	23,78	23,68	22,89	23,44	18.02.13	NO
17	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	23,65	23,79	22,34	23,31	18.02.13	NO
3	23.01.13	CAPAN + FPT	G	22,60				18.02.13	NO
14	23.01.13	CAPAN + FPT	B	23,80	24,05	24,63	24,46	18.02.13	NO
4	23.01.13	CAPAN + FPT	G	21,32				18.02.13	NO
8	23.01.13	CAPAN + FPT	G	24,00	23,80	23,96	24,39	18.02.13	MTX H
13	23.01.13	CAPAN + FPT	B	23,62	23,70	22,90	22,63	18.02.13	NO
10	23.01.13	CAPAN + FPT	B	21,89	22,25	22,32	22,35	18.02.13	NO
20	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	23,74	22,25	22,40	23,25	18.02.13	NO
15	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	22,96	22,87	22,31	21,84	18.02.13	NO
18	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	22,00	20,71	16,95	17,19	18.02.13	NO
2	23.01.13	CAPAN + FPT	V	22,66	22,98	21,99	22,79	18.02.13	NO
7	23.01.13	CAPAN + FPT	G	22,98	21,65	21,58	22,37	18.02.13	NO
12	23.01.13	CAPAN + FPT	B	22,19	22,70	22,69	22,12	18.02.13	NO
19	23.01.13	CAPAN + FPT	GB	21,27	21,16	20,63	20,44	18.02.13	NO
1	23.01.13	CAPAN + FPT	V	22,68	22,70	22,60	23,37	18.02.13	NO

ANEXO III. FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON DISTINTAS TINCIONES.



Fibroblastos normales teñidos con prpCOL11A1



Fibroblastos normales teñidos con SMA



Fibroblastos normales teñidos con Vimentina



Fibroblastos peritumorales teñidos con proCOL1A1



Fibroblastos peritumorales teñidos con SMA



Fibroblastos peritumorales teñidos con Vimentina