



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE LOS
XENOINJERTOS DE ADENOCARCINOMAS Y
TUMORES PERIAMPULARES DE PÁNCREAS**

MERCEDES RUBIO-MANZANARES DORADO

SEVILLA, 2017

Mercedes Rubio-Manzanares Dorado

Dedicada a mi padre

AGRADECIMIENTOS

Es para mí un privilegio el presentarles esta tesis doctoral que tras tanto esfuerzo ve la luz. No sería fiel a la realidad si me atribuyera todo el mérito de este trabajo. Tras el mismo han colaborado en su realización múltiples profesionales sin los cuales, este trabajo no sería posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores toda la ayuda brindada. Gracias al Dr. Jordi Muntané Relat por supervisarme y poner a mi disposición todos los recursos del IBiS. Al Dr. Francisco Javier Padillo Ruíz artífice de esta investigación. Gracias por creer en mí y darme la oportunidad de embarcarme en este proyecto apasionante. Mi especial agradecimiento al Dr. Luis Miguel Marín Gómez siempre presente cuando más lo he necesitado. Sin él no hubiera alcanzado la meta.

También quiero agradecer la infinita paciencia del Dr. Ángel de la Rosa (antiguo investigador del servicio de del IBiS) al enseñarme a procesar las muestras de inmunohistoquímica y a interpretarlas, así como a la Dr. Sheila Pereira por colaborar conmigo en el procesado de las muestras inmunohistoquímicas y al ofrecerme su ayuda. A Juan Manuel Praena Fernández (Servicio de apoyo estadístico y Metodológico del HUVR) por supervisar la estadística.

No quiero olvidar la imprescindible ayuda prestada por el Servicio de Anatomía Patológica dirigido por el Dr. Juan José Borrego, y a los dos anatomopatólogos encargados de revisar las muestras obtenidas (Francisco Farfán López y José Ramírez Santos).

Y por su puesto a mi compañero de fatigas el Dr. Daniel Aparicio Sánchez que codo con codo con el Dr. Marín y conmigo ha implantado, sacrificado y realizado el seguimiento de los ratones desnudos.

Finalmente, agradecer a Alejandro Moral Laguna la edición y supervisión de la maquetación y a Alejandra Moral Rubio-Manzanares por todo el tiempo robado.

**“Donde quiera que el arte de la medicina es amado,
tambien hay un amor por la humanidad”**

Hipócrates

ÍNDICE

I.	<u>RESUMEN</u>	1
II.	<u>INTRODUCCIÓN</u>	11
1.	EPIDEMIOLOGÍA, FACTORES DE RIESGO Y MORTALIDAD	12
1.1.	Epidemiología	12
1.2.	Factores de riesgo	13
1.2.1.	Tabaquismo	13
1.2.2.	Aminas aromáticas	14
1.2.3.	Dieta	14
1.2.4.	Lesiones premalignas y pancreatitis crónicas	14
1.2.5.	Diabetes	15
1.2.6.	Lugar de nacimiento	15
1.2.7.	Genética	15
1.2.8.	Síndromes hereditarios	16
1.3.	Mortalidad	17
2.	HISTOLOGÍA, PATRONES DE DISEMINACIÓN Y MARCADORES TUMORALES	19
2.1.	Histología del cáncer de páncreas	19
2.2.	Histología de los tumores periampulares	22
2.3.	Patrones de diseminación	22
2.4.	Marcadores tumorales	24
3.	BIOLOGÍA MOLECULAR: GENES, ONCOGENES, FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES.	26
3.1.	Oncogenes	27
3.2.	Genes supresores	27
3.3.	Genes mantenedores del genoma	29
3.4.	Otros genes favorecedores de tumorigénesis	29
3.5.	Factores de crecimiento y sus receptores	30
4.	LA IMPORTANCIA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES	32

5. TIPOS DE MODELOS ANIMALES	35
5.1. Tumores inducidos con sustancias carcinógenas	35
5.2. Ratones genéticamente modificados: GEMM	37
5.3. Injertos tumorales	38
5.3.1. Aloinjertos	38
5.3.2. Xenoinjertos	38
5.3.2.1. <i>Dependiendo del lugar de implante</i>	39
5.3.2.1.1. <i>Xenoinjertos heterotópicos</i>	39
5.3.2.1.2. <i>Xenoinjertos ortotópicos</i>	40
5.3.2.2. <i>Dependiendo del origen de las células implantadas</i>	41
5.3.2.2.1. <i>Implante de tumores cultivados in vitro</i>	41
5.3.2.2.2. <i>Implantes de tumores primarios humanos</i>	41
6. ÉTICA Y MODELOS ANIMALES.	43
III. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	44
IV. <u>HIPÓTESIS</u>	46
V. <u>OBJETIVOS</u>	48
VI. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	50
1. TIPO DE ESTUDIO	51
2. PACIENTES	51
3. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	54
3.1. Origen	54
3.2. Taxonomía y características	55
4. IMPLANTES DEL XENOINJERTO	57
4.1. Pase 0	59
4.2. Pase 1	60
4.3. Pase 2	60
4.4. Técnica quirúrgica y anestésica	61
4.4.1. Lista de materiales empleados	61
4.4.2. Anestesia	61

4.4.3. Técnica quirúrgica	62
4.5. Seguimiento y sacrificio	64
5. VARIABLES DEL ESTUDIO	66
6. PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS	67
6.1. Preservación del tejido tumoral	67
6.2. Preparación del tejido estudiado	68
6.3. Tinción con hematoxilina-eosina	69
6.4. Tinción con tricrómico de masson	69
6.5. Valoración histológica de las muestras	70
6.6. Inmuhistoquímica	71
6.7. Valoración inmunohistoquímica de las muestras	74
6.7.1. Ki67	78
6.7.2. α -SMA	79
6.7.3. CD31	80
6.7.4. TUNEL	80
7. SOPORTE BIBLIOGRÁFICO	81
8. TRATAMIENTO INFORMÁTICO	82
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	82
10. ETICA Y LEGISLACIÓN	84
VII. <u>RESULTADOS</u>	85
1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS IMPLANTES EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES	86
1.1. Resultados globales del implante del xenoinjerto	86
1.2. Mortalidad	92
1.2.1. Análisis de la Mortalidad por pases	92
1.3. Tiempo libre de enfermedad	94
1.3.1. Tiempo libre de enfermedad en los Pases	94
1.4. Impacto del porcentaje de ganancia de peso en el murino	96
1.5. Factores relacionados con el desarrollo tumoral	97

1.5.1. Impacto de las características clínicas y epidemiológicas del humano en el desarrollo tumoral	97
1.5.2. Impacto de la anatomía patológica y de la inmunohistoquímica de las muestras humanas en el desarrollo tumoral.	99
1.6. Resultados según el modelo experimental	100
1.6.1. Resultados en el modelo subcutáneo	100
1.6.2. Resultados en el modelo intraabdominal	101
1.6.3. Resultados en el modelo pancreático	102
1.7. Análisis comparativo del desarrollo tumoral en los modelos experimentales	103
1.7.1. Análisis comparativo del desarrollo tumoral por pase y modelo	103
1.7.2. Mortalidad por modelo animal	105
1.7.3. Morbilidad	107
1.7.4. Tiempo libre de enfermedad en los modelos animales	111
1.7.5. Evolución del peso	112
2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS IMPLANTES EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES Y EN LOS PASES.	114
2.1. Hematoxilina & eosina: grado de diferenciación	114
2.1.1. Grado de diferenciación a lo largo de los modelos	114
2.1.2. Grado de diferenciación a lo largo de los pases	115
2.1.2.1. <i>Análisis de la diferenciación de los modelos a lo largo de los pases</i>	116
2.2. Número de mitosis por campo	118
2.2.1. Número de mitosis y los modelos animales	118
2.2.2. Número de mitosis a lo largo de los pases	119
2.3. Tricrómico de masson: grado de fibrosis	120
2.3.1. Masson a lo largo de los modelos	120
2.3.2. Masson a lo largo de los pases	121
2.3.2.1. <i>Análisis del grado de fibrosis de los modelos a lo largo de los pases</i>	122
3. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS IMPLANTES EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES Y EN LOS PASES	125

3.1. KI67: Proliferación celular	125
3.1.1. Ki67 y modelos animales	125
3.1.2. Ki67 a lo largo de los pases	126
3.2. ALFASMA: Fibrogénesis	127
3.2.1. AlfaSMA y los modelos animales	127
3.2.2. AlfaSMA a lo largo de los pases	128
3.2.2.1. <i>Análisis de la fibrogénesis de los modelos a lo largo de los pases</i>	130
3.3. CD31: Angiogénesis	132
3.3.1. CD31 y los modelos animales	132
3.3.2. CD31 a lo largo de los pases	134
3.3.2.1. <i>Análisis de la angiogénesis de los modelos a lo largo de los pases</i>	135
3.4. TUNEL: Apoptosis	137
3.4.1. TUNEL y los modelos animales.	137
3.4.2. TUNEL a lo largo de los pases	139
3.4.2.1. <i>Análisis de la apoptosis en los modelos experimentales a lo largo de los pases</i>	140
VIII. <u>DISCUSIÓN</u>	143
1. MOTIVO POR EL QUE REALIZAMOS ESTE TRABAJO	145
2. DISCUSIÓN SOBRE EL MODELO ANIMAL UTILIZADO: EL ROEDOR.	145
3. DISCUSIÓN SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA	147
3.1. Elección del murino: <i>ratón hsd athymic nude-foxn1^{mut}</i>	147
3.2. Elección del modelo experimental: <i>xenoinjertos</i>	148
3.3. Elección de la vía de implante: <i>subcutánea, intraabdominal y pancreática</i>	149
4. DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	151
4.1. Desarrollo de los xenoinjertos	152
4.1.1. Desarrollo tumoral a lo largo de los pases	153
4.1.2. Desarrollo tumoral en los modelos experimentales	153
4.2. Tiempo libre de enfermedad	154

4.2.1. Análisis del tiempo libre de tumor a lo largo de los pases	154
4.2.2. Análisis del tiempo libre de tumor en los modelos experimentales	154
4.3. Morbimortalidad	155
4.3.1. Mortalidad por pase	155
4.3.2. Morbimortalidad por modelo	155
4.4. Peso	156
4.4.1. Correlación del porcentaje de peso en la semana 10 con el desarrollo tumoral	156
4.5. Características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas de los xenoinjertos	157
4.5.1. Hematoxilina y Eosina: Diferenciación celular	157
4.5.1.1. <i>Diferenciación celular a lo largo de los pases</i>	157
4.5.1.2. <i>Diferenciación celular y modelos animales</i>	157
4.5.2. Número de mitosis por campo y expresión de Ki67: Proliferación celular.	157
4.5.2.1. <i>Proliferación celular a lo largo de los pases</i>	158
4.5.2.2. <i>Proliferación celular a lo largo de los modelos</i>	158
4.5.3. Masson y expresión de Alfa-SMA: Índice de fibrosis y fibrogénesis.	158
4.5.3.1. <i>Fibrosis y fibrogénesis a lo largo de los pases.</i>	159
4.5.3.2. <i>Fibrosis y fibrogénesis en los modelos experimentales.</i>	160
4.5.4. CD31:Angiogénesis	161
4.5.4.1. <i>Angiogénesis a lo largo de los pases</i>	161
4.5.4.2. <i>Angiogénesis en los modelos experimentales</i>	162
4.5.5. TUNEL: Apoptosis	162
4.5.5.1. <i>Análisis de la apoptosis a lo largo de los pases</i>	162
4.5.5.2. <i>Análisis de la apoptosis en los modelos animales</i>	163
4.6. RESUMEN DE LO EXPUESTO	163
IX. <u>CONCLUSIONES</u>	165
X. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	167
XI. <u>ANEXOS</u>	182

ABREVIATURAS

ADCP: Adenocarcinoma de páncreas

EEUU: Estados Unidos

K-ras: Kirsten rat sarcoma viral oncogene (Oncogén del sarcoma viral de la rata de Kirsten).

p53: Proteína supresora de tumores. Su nombre hace referencia a su masa molecular aparente: corre como una proteína de 53 KDa.

APC: Gen Adenomatous polyposis coli

DCC: Gen Deleted in colorectal cancer (gen suprimido en el cáncer colorrectal)

FAMMM: Familial atypical multiple mole melanoma. (Melanoma múltiple familiar atípico)

P16/CKN2A: Gen inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, también llamado gen p16

BRCA 1: Breast Cancer 1 (gen relacionado con el cáncer de mama 1)

BRCA 2: Breast Cancer 2 (gen del Cáncer de mama 2)

UE: Unión Europea

MUC1: Mucina 1 asociada a la superficie celular

MUC4: Mucina 4 asociada a la superficie celular

MUC5A: Mucina 5A asociada a la superficie celular

CEA: Carcinoembryonic antigen (Antígeno carcinoembrionario)

B72.3: Complejo glicoproteico B72.3 (también conocido como TAG 72)

CA 125: Antígeno del cáncer 125

CA 19.9: Antígeno del cáncer 19.9

S100A4: Proteína miembro de la familia de proteínas de unión a calcio S100 secretada por el tumor y las células del estroma

SMAD4/DPC4: Gen SMAD4 o también conocido como DPC4. Implicado en la transducción de la TGF- β

EMA. Antígeno de membrana epitelial.

PanNI: Neoplasia intraductal de páncreas

α -SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin (Alpha-Actina del Músculo liso)

1 α /CXCL12/CXCR4: Factor de derivado del estroma 1 α CXC/ ligando 12 (CXCL12)/CXC receptor 4 (CXCR4)

SLe: antígenos Sialil-Lewis

SPARC: Secreted protein acid and rich in cysteine (proteína ácida secretada rica en cisteína), osteonectina o BM-40

MMP-2 y MMP-9: Matrix metalloproteinase-2 y -9 (Metaloproteasa 2 y 9 de la matriz)

FAK: Focal adhesion kinase (proteína Kinasa de adhesión focal)

Src: Proto-oncogen tirosina quinasa

Akt: Phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/Akt (PI3K-PKB/Akt) (Proteína fosfoinositol Kinasa 3-Kinasa B o también llamada “Akt”).

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases (Proteínas quinasas activadas por mitógenos).

PDGF: Platelet derived growth factor (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas).

VEGF: Vascular endothelial growth factor (Factor de crecimiento endotelial vascular).

CA15-3: Antígeno del cáncer 15-3

CA27: Antígeno del cáncer 27

CA 29: Antígeno del cáncer 29

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico). También conocido como HER1 o ErbB-1

AKT2: Oncogén de codificación de una proteína que pertenece a una subfamilia de quinasas de serina/treonina que contiene SH2-como dominios.

MYB: Proto-oncogen de la familia mieloblastosis

MKK4: Mitogen-activated protein kinase 4 (Proteína quinasa-quinasa 4 activada por mitógenos)

TGF- α : Transformation growth factor alpha (Factor de crecimiento transformante alpha)

ARF: Alternative Reading frame

ADN: Ácido desoxirribonucleico

SKT11/LKB1: Serine Threonine Kinase 11 (STK11) también conocida como Liver Kinase B1 (LKB1) (Serina treonina quinasa 11 (STK11) / quinasa de hígado B1 (LKB1)

ATM: gen Ataxia Telangiectasia Mutado

ATR: gen de la Ataxia Telangiectasia y la proteína relacionada con Rad3

ATDC: Proteína asociada al grupo D de ataxia-telangiectasia

TOP2A: Topoisomerasa II alpha

TG2: Transglutaminasa II

HGF: Hepatocyte Growth Factor (Factor de Crecimiento Hepatocitario)

c-MET: Proteína tirosina quinasa Met o también conocida como receptor del factor de crecimiento hepatocitario (hepatocyte growth factor receptor (HGFR)).

TGF- β : Transformation growth factor beta (Factor de crecimiento transformante beta)

VEGF: Vascular Endothelial Growth factor (Factor de crecimiento del endotelio vascular)

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-enhancer of activated B cells (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

FGF: Fibroblast Growth Factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)

BOP: N-nitrosobis-(2-oxoprolol)-amina

GEMM: Genetic Engineered Mouse Model (Modelos Murinos modificados genéticamente)

SV40: Simian vacuolating virus 40

Hh: Hedgehog

BOE: Boletín Oficial del Estado

CEEA: Comité de Ética de Experimentación Animal

DPC: Duodenopancreatectomía cefálica

DPT: Duodenopancreatectomía total

AP: Anatomía patológica

Células NK: Células Natural Killers o citotóxicas.

g: Gramos.

Dr.: Doctor

BOJA: Boletín Oficial de la Junta de Andalucía

IBiS: Instituto de Biomedicina de Sevilla

USA: United States of America (Estados Unidos de América)

Hx: Pacientes Humanos

mm: Milímetros

T1: Injerto desarrollado en el ratón procedente de Hx

T2: Injerto desarrollado en el ratón procedente de T1

T3: Injerto desarrollado en el ratón procedente de T2

cm: Centímetros

μ l: microlitros

mg/kg: miligramos por kilogramos

cc: centímetros cúbicos

TUNEL: Terminal dUTP Nick End Labeling (Marcado del extremo libre por dUTP)

CD31: Cluster de diferenciación 31. También conocido como Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) (Molécula de adhesión endotelial plaquetaria)

DMSO: Dimetil sulfóxido

MEM: Minimum Essential Medium

μ : Micras

IgG: Inmunoglobulina G

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Debido al mal pronóstico de los tumores del área periampular y especialmente de adenocarcinoma de páncreas (ADCP), resulta fundamental la búsqueda de biomarcadores para su detección precoz y de moléculas que permitan el desarrollo urgente de nuevas estrategias terapéuticas. Para ello, los modelos animales han demostrado ser muy útiles en la evolución de los avances en el cáncer de páncreas. Han contribuido al estudio de nuevos quimioterápicos que posteriormente han sido trasladados a ensayos clínicos con humanos que han demostrado un aumento en la supervivencia.

El desarrollo de los quimioterápicos y otras moléculas antitumorales se encuentra íntimamente relacionado con los modelos experimentales. Durante los últimos 50 años, los xenoinjertos subcutáneos derivados de líneas celulares cultivadas *in vitro* han sido ampliamente utilizados. Multitud de quimioterápicos han sido testados utilizando estos modelos. Sin embargo, fármacos que funcionan bien en el ratón no son necesariamente efectivos en el ser humano.

Desde los años 70, se han utilizado muestras de cánceres humanos tomados mediante biopsia o mediante cirugía que posteriormente han sido implantados directamente en ratones. Estos xenoinjertos, también conocidos como “tumorgraft” mantienen la morfología tumoral inicial, así como las mutaciones genéticas que le acompañan. Sin embargo, estos modelos fueron inicialmente desechados debido a su alto índice de rechazos. Recientemente, se ha retomado esta línea de investigación gracias al desarrollo de nuevas cepas de ratones inmunodeprimidos modificadas genéticamente que han minimizado las tasas rechazo.

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

Siguiendo esta línea de trabajo hemos desarrollado tres modelos experimentales mediante el uso de xenoinjertos: subcutáneo, intraabdominal y pancreático. El objetivo principal de este estudio es valorar la viabilidad de los xenoinjertos ortotópicos (intrapancreático) y heterotópicos (intraabdominal y subcutáneo) de cánceres de páncreas humanos implantados en ratones desnudos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo analítico experimental con muestras humanas obtenidas quirúrgicamente de pacientes con diagnóstico de ADCP o tumores periampulares que se implantaron como xenoinjertos en tres modelos experimentales.

Pacientes

Se incluyeron pacientes diagnosticados de carcinoma periampular o ADCP que fueron sometidos a una laparotomía exploradora desde el 17 de mayo de 2012 hasta 13 de febrero de 2014 en el Hospital Universitario “Virgen del Rocío” (Sevilla).

Se han excluido del estudio los pacientes menores de edad, neoplasias no identificadas como ADCP o carcinomas periampulares, y no dar su consentimiento por escrito para la utilización de la muestra.

Se obtuvieron 11 muestras tumorales en fresco de un total de 10 pacientes. Éstas fueron extraídas de la pieza quirúrgica por un anatomopatólogo inmediatamente después de su exéresis. La mayoría de las muestras se obtuvieron mediante duodenopancreatectomía cefálica (n=8). Dos muestras fueron obtenidas de un mismo paciente (*Humano 4*) que correspondieron a una metástasis ganglionar interaortocava y una muestra extraída del tumor pancreático.

El diagnóstico anatomopatológico más frecuente fue ADCP (n=8). También se registraron dos adenocarcinomas ampulares.

Animales de Experimentación

Se han utilizado animales de experimentación de la cepa Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}. Esta cepa es un tipo de ratón atímico e inmunodeprimido que permite el crecimiento de los injertos sin rechazo inmunitario.

La muestra obtenida de cada paciente (Hx), se dividió en cinco porciones de 3x3x3 mm. De éstas, tres fueron destinadas a los xenoinjertos implantadas a nivel subcutáneo, pancreático e intraperitoneal, y las otras dos restantes se destinaron para estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico.

El implante del tumor humano al ratón o del ratón a un nuevo murino se llama "Pase". En nuestro estudio hemos realizado tres pases: Pase 0, Pase 1, Pase 2.

Variable principal del estudio:

- Desarrollo tumoral (%): Evidencia durante la vida del ratón o en la autopsia de un crecimiento tumoral mayor de 1-1,5 cm o presencia de metástasis.

Variables secundarias:

❖ *Determinadas en los animales de experimentación*

- Tiempo libre de enfermedad (semanas): Tiempo desde el implante del tumor hasta el desarrollo tumoral o hasta la evidencia de ausencia de tumor en la autopsia.

- Mortalidad (%): Ratones fallecidos de manera espontánea sin intervención de los investigadores.

- Mortalidad postoperatoria (%): Muerte durante las primeras 24 horas tras la cirugía o en los días consecutivos como consecuencia de un fallo directo de la técnica quirúrgica.

- Morbilidad (%): Aparición de complicaciones derivadas de la cirugía.

- Peso (gr): Peso en gramos de los ratones implantados.

❖ *Histología e inmunohistoquímica de las muestras*

- Grado de diferenciación (%): Determinado con las muestras de hematoxilina-Eosina mediante la observación de la morfología de las glándulas, núcleos celulares tumorales y el número de mitosis. Se dividen en bien diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2), poco diferenciados (G3).

- Grado de fibrosis (%): Espesor del estroma tumoral determinado mediante la tinción de Tricrómico de Masson, correspondiendo 1 a la mínima fibrosis alrededor de las glándulas tumorales y 4, al grado máximo de fibrosis entre las glándulas tumorales.

- Grado de proliferación celular (%): Determinado mediante el número de mitosis y la expresión de Ki67 en los ribosomas de los núcleos celulares, clasificada como baja/alta en función del punto de corte 2,97%.

- Fibrogénesis (%): Expresión de alfaSMA en fibroblastos y miofibroblasto. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 1,84%.

- Angiogénesis (%): Expresión de CD31 en las células endoteliales del tumor. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 0,2%.

- Apoptosis (%): Expresión de TUNEL en las células con ADN fragmentado o degradado. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 27,11%.

Análisis estadístico

Se ha empleado el test de ji-cuadrado (χ^2) o el test exacto de χ^2 cuadrado/Test exacto de Fisher para la valoración del desarrollo tumoral, la anatomía patológica y la inmunohistoquímica mediante el programa SPSS® versión 21.0. Una $p < 0,05$ ha sido considerada significativa. Para el análisis postHoc se ha aplicado la corrección de Bonferroni. Para el análisis del tiempo libre de enfermedad se ha utilizado la prueba de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

Hemos observado que 58 de los 95 xenoinjertos se han desarrollado a lo largo de los tres pases. Lo que supone una tasa de desarrollo tumoral global del 61,1 %.

Analizamos el desarrollo de los xenoinjertos a lo largo del pase 0, pase 1 y pase 2. El desarrollo en el pase 0 (desde el humano al ratón) fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en los pases consecutivos en los que se realizó el reimplante desde ratón a ratón (pase 1 y pase 2).

A pesar de que no existe significación estadística para el desarrollo de un modelo a lo largo de los distintos pases, existe una mayor tendencia en el desarrollo del xenoinjerto tumoral en el modelo subcutáneo.

Tiempo libre de enfermedad

Cuando analizamos el tiempo libre de tumor en los *tres modelos* (subcutáneo, intraabdominal y páncreas) observamos que el tiempo de libre de tumor es menor en el

modelo subcutáneo. Aunque no existe diferencias estadísticamente significativas, la “p” se encuentra muy próxima a 0,05 ($p=0,063$).

Cuando analizamos el tiempo libre de enfermedad en los 3 *pases* se observa un menor tiempo libre de tumor en el pase 1 y en el pase 2 respecto al pase 0. Se observa un desarrollo tumoral más rápido y mayor número de casos en los pases entre ratón-ratón, respecto al pase entre humano-ratón con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000004$).

Mortalidad

La *mortalidad global* en la serie de los 95 ratones a los que se les implantó un xenoinjerto ha sido del 13,6% (13/95). La *mortalidad postoperatoria* ha sido del 4,2% (4/95).

Analizamos la mortalidad por pases y observamos que, aunque no existen diferencias significativas la “p” se encuentra muy cercana a 0,05 ($p=0,069$).

Hemos apreciado una mortalidad global para los modelos subcutáneos del 3,16% (3/95), del 5,26% en modelos intraabdominales (5/95) y del 5,26% en los xenoinjertos pancreáticos (5/95). No hemos apreciado diferencias estadísticamente significativas en favor de ningún modelo.

Evolución del peso

Tras aplicar la prueba no paramétrica del *test de Friedman*, observamos que existe un aumento progresivo del peso en los tres modelos siendo en todos los modelos un aumento estadísticamente significativo.

Analizamos el % de ganancia de peso de los ratones a las 10 semanas y se correlacionó con el desarrollo del tumor. En la semana 10 los ratones que desarrollan tumor presentaron una ganancia media de peso del $20,38 \pm 3,51$ % (IC al 95%=13,2-27,56) respecto a los ratones que no desarrollan tumor que presentaron una ganancia media de peso del $11,51 \pm 2,38$ % (IC al 95%=6,63-11,51). Observamos una mayor ganancia de peso a favor de los ratones con desarrollo de tumor existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,021$).

Análisis anatomopatológico***Hematoxilina y Eosina***

Se ha analizado el grado de diferenciación de los tumores mediante la tinción de hematoxilina y eosina en los tres modelos. Tras aplicar el Test exacto de χ^2 no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grado de diferenciación de las muestras humanas y los modelos experimentales ($p=0,20$). Tampoco apreciamos diferencias estadísticamente significativas en el grado de diferenciación a lo largo de los países ($p=0,25$).

Tricómico de Masson

Apreciamos que las muestras humanas presentan una fibrosis más elevada que las muestras de los roedores. El 36,3% de las muestras humanas presentaban una fibrosis muy elevada. Tras aplicar el test exacto de χ^2 hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre el grado de fibrosis de las muestras humanas y los modelos experimentales ($p=0,044$). Cuando se analiza de forma individual cada uno de los modelos desarrollados no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, aunque el modelo intraabdominal parece tender hacia un menor grado de fibrosis.

Finalmente, tras comparar las muestras a lo largo de los países, no apreciamos diferencias estadísticamente significativas en el grado de fibrosis ($p=0,26$). Observamos que la mayoría de las muestras presentan un grado de fibrosis leve o moderada y que este se mantiene a lo largo de los países. Se aprecia una disminución a lo largo de los países de las muestras con una fibrosis muy elevada.

Inmunohistoquímica***Expresión de Ki67***

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Ki67 ($p=0,59$) a lo largo de los países. Tampoco hemos apreciado diferencias en el grado de expresión de Ki67 celular en ninguno de los 3 modelos. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,65$).

Expresión de α -SMA

A medida que avanzan los pases se aprecia un descenso significativo de la fibrogénesis. Las diferencias encontradas son estadísticamente significativas ($p=0,00001$).

Analizamos el grado de fibrogénesis en los modelos experimentales. Hemos apreciado diferencias estadísticamente significativas entre el grado de fibrogénesis en el humano y el resto de modelos animales ($p=0,000045$). Todas las muestras humanas presentaron una fibrogénesis alta ($n=11$) lo que contrasta con los modelos experimentales en los que la mayoría de las muestras presentaron una fibrogénesis baja. Además, destaca el modelo pancreático en el que hasta el 87,5% de las muestras presentaron una expresión de alfa-SMA baja.

Finalmente, hemos analizado la evolución de la fibrogénesis de cada modelo a lo largo de los tres pases de manera individual. Se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de AlfaSMA a medida que avanzan los pases en todos los modelos siendo especialmente llamativa en el modelo pancreático.

Expresión de CD31

Se aprecia un descenso de la angiogénesis en los tres pases siendo más acusado en el Pase 1 ($p=0,008$). También se aprecia un descenso de la angiogénesis en todos los modelos siendo más acusado en el modelo pancreático ($p=0,003$).

En el análisis de cada modelo a lo largo de los pases, se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de CD31 a medida que avanzan los pases en todos los modelos. Pero tan sólo en el modelo pancreático se aprecia una disminución significativa de las muestras con alta expresión de CD31 a lo largo de los pases, es decir, se aprecia una disminución significativa de la angiogénesis.

Expresión de TUNEL

A medida que avanzan los pases se aprecia un descenso significativo de la apoptosis. Las diferencias encontradas son estadísticamente significativas ($p=0,0042$). También hemos apreciado diferencias estadísticamente significativas entre el grado de apoptosis en el humano y el resto de modelos animales ($p=0,0018$). La mayoría de las muestras humanas

presentaron una apoptosis elevada (n=8; 72,7%) lo que contrasta con los modelos experimentales en los que la mayoría de las muestras presentaron una apoptosis leve. Además, destaca el modelo pancreático en el que hasta el 93,8% de las muestras presentaron un a apoptosis leve.

En el análisis de cada modelo a lo largo de los pases, se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de TUNEL a medida que avanzan los pases en todos los modelos. Pero es en el modelo intraabdominal y pancreático donde se aprecia una disminución significativa de las muestras con alta expresión de TUNEL a lo largo de los pases.

DISCUSIÓN

A medida que avanzan los pases se aprecia un aumento progresivo de la tasa de implantes exitosos en los tres modelos experimentales y un desarrollo más precoz de los xenoinjertos. De esta forma, queda patente la viabilidad de los xenoinjertos de los tumores periamplares en los modelos experimentales con ratones inmunodeprimidos.

Análisis por modelos

El modelo subcutáneo es el que mayor número de xenoinjertos viables presenta a lo largo de los tres pases y el que ofrece una detección más precoz del desarrollo del implante. Aunque no existen diferencias significativas, la mayor morbimortalidad del modelo intraabdominal y pancreático junto con la detección más tardía debido al implante del xenoinjerto en una cavidad distensible, podrían justificar la menor tasa de desarrollo tumoral en estos dos modelos.

Aunque todos los modelos (subcutáneo, intraabdominal y páncreas) presentan características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas similares. En contra de lo esperado al inicio del estudio el modelo pancreático presenta una mayor tendencia hacia la disminución de la fibrogénesis, la vascularización y de la apoptosis.

¿En qué modelo se observan los mejores resultados?

La detección del desarrollo tumoral es más precoz en el modelo subcutáneo lo que supone un coste inferior respecto a los otros modelos. Además el modelo subcutáneo es el que mayor número de xenoinjertos viables desarrolla a lo largo de los tres pases. De esta forma, teniendo en cuenta que los tres modelos presentan características similares en cuanto a diferenciación, fibrosis, proliferación celular, fibrogénesis, angiogénesis y apoptosis, el modelo subcutáneo puede ser la mejor opción para la investigación de fármacos anticancerosos con xenoinjertos.

Análisis por Pases

A medida que avanzan los pases se aprecia un aumento progresivo de la tasa de implantes exitosos en los tres modelos murinos que resulta especialmente llamativa en el Pase 1 (T1 → T2).

Cuando analizamos las muestras de los xenoinjertos por pases no se aprecian diferencias en la diferenciación, la proliferación celular ni la fibrosis entre pases, sin embargo si se aprecia una disminución progresiva de la fibrogénesis, de la vascularización tumoral y de la apoptosis. Todas estas características explican el mayor desarrollo tumoral en los últimos pases.

¿En qué momento se observan los mejores resultados?

Por ello, debemos buscar el pase que presente mayor desarrollo tumoral y con las características inmunohistoquímicas más parecido al humano que en nuestra serie se correspondería al Pase 1

II. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA, FACTORES DE RIESGO Y MORTALIDAD

Los mecanismos moleculares involucrados en el cáncer de páncreas siguen siendo desconocidos a pesar de los avances realizados en los últimos años. Esto supone un desafío para el investigador y deja abierto el camino para el desarrollo de nuevas líneas de trabajo que permitan guiarnos hacia un tratamiento más eficaz que el existente actualmente. La supervivencia de los pacientes a los 5 años es menor del 5%, lo que hace que los valores de la incidencia sean muy próxima a su mortalidad. Esto convierte la investigación del cáncer de páncreas en una prioridad para la comunidad científica (1).

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

En el siglo XXI, el adenocarcinoma páncreas (ADCP) y de los carcinomas periampulares continúan siendo un grave problema de salud sin resolver.

Los tumores originados en el tejido exocrino del páncreas, en el colédoco terminal, en la ampolla de Vater y en el duodeno periampular afectan a un área común cuyo origen, en ocasiones (incluso tras la resección quirúrgica) puede ser difícil de determinar incluso para el patólogo. Precisan para su tratamiento quirúrgico del mismo procedimiento. De ellos, el más frecuente es el ADCP que representa una proporción del 60-85%, seguido de los adenocarcinomas ampulares, que suponen el 10-36%; los colangiocarcinomas distales (el 5-14%) y con menor frecuencia los adenocarcinomas duodenales (2).

Debido a su diagnóstico tardío, la agresividad de la enfermedad y la ausencia de un tratamiento efectivo, se estima que la supervivencia de los ADCP a los 5 años es menor del 5 % (1,3). Esto convierte al cáncer de páncreas en una de las formas de cáncer gastrointestinal más agresivas, con una supervivencia media de un año tras el diagnóstico (4).

Las neoplasias periampulares de origen extrapancreático tienen un pronóstico más favorable. En parte este hecho es debido a un diagnóstico más precoz, motivado por un diagnóstico con tamaños tumorales relativamente más pequeños y un comportamiento biológico tumoral menos agresivo (2).

El ADCP es la neoplasia maligna más frecuente en el páncreas (5). En España constituye la tercera neoplasia más frecuente del tubo digestivo tras el cáncer de colon y estómago. Su incidencia en los países occidentales es del 10 por 100.000, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer tras el cáncer de colon, próstata y mama. El 80% de los casos se producen entre los 60 y los 80 años de edad, siendo la edad media al diagnóstico de unos 65 años (5).

La resección quirúrgica tanto en el ADCP como en el resto de tumores periampulares continúa siendo el único tratamiento potencialmente curativo. Sin embargo la mayor parte de los pacientes manifiestan la enfermedad diseminada al diagnóstico, lo que supone que hasta el 80% no serán candidatos a una cirugía con intención curativa. La resecabilidad del tumor viene determinada por la ausencia de afectación de las estructuras vasculares vecinas y/o metástasis a distancia. La extensión de la enfermedad está bien categorizada en resecable, localmente avanzado sin metástasis, y metastásica (5). El 40% de los cánceres son localmente avanzados al diagnóstico, pudiendo en ocasiones beneficiarse de esquemas de tratamiento neoadyuvante que los convierten en resecables. El agente quimioterápico más activo en el cáncer de páncreas diseminado es la gemcitabina, siendo el primer agente que ha demostrado una mejoría en la supervivencia y en la calidad de vida, gracias a la mejoría de los síntomas del estado del paciente (reducción del dolor y de la necesidad de analgesia) (6).

1.2. FACTORES DE RIESGO

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

1.2.1. Tabaquismo

Aunque algunos estudios relacionan la mayor incidencia de cáncer de páncreas en el varón, en los no fumadores no hay predominio sexual (7). El tabaquismo parece ser uno de los pocos factores de riesgo conocidos en el cáncer de páncreas y es probablemente el principal responsable de la caída de la incidencia de cáncer de páncreas en el varón en el

Reino Unido desde finales de los años 70 hasta la década de los 90 (8). El efecto nocivo del tabaco se debe principalmente a las aminas aromáticas presentes en el humo. De la misma forma es más frecuente entre los trabajadores de la industria petroquímica, en relación con una mayor exposición a estas sustancias (9). El tabaquismo explica al menos la tercera parte del cáncer pancreático y supone un 40% de las causas conocidas (9). De cualquier manera, llama la atención que a pesar de la caída del consumo del tabaco en los hombres en la última década no existe un descenso claro en la mortalidad en los países occidentales. Probablemente se deba al aumento de la obesidad en los EEUU y la Unión Europea (1).

1.2.2. Aminas aromáticas

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

1.2.3. Dieta

Otros factores relacionados con la aparición de cáncer de páncreas son una dieta rica en grasas, pescado y carnes fritas, pobre en frutas y vegetales y la obesidad. Howe y Burch (12) en su estudio sobre micronutrientes y el cáncer de páncreas concluyeron un aumento del riesgo de cáncer de páncreas asociado a una dieta rica en hidratos de carbono y colesterol junto con un descenso del consumo de fibra y de vitamina C (13).

1.2.4. Lesiones premalignas y pancreatitis crónicas

Existen lesiones premalignas como el cistoadenoma mucinoso o reconstrucciones como la gastrectomía parcial que parecen condicionar una predisposición al cáncer de páncreas. La pancreatitis crónica aumenta el riesgo de padecer cáncer de páncreas con un riesgo acumulado de 4% a los 20 años (14).

1.2.5. Diabetes

Múltiples estudios epidemiológicos han mostrado que cerca del 15% de los pacientes presentan antecedentes de Diabetes Mellitus. El inicio clínico de la diabetes tan solo precede en tres meses al diagnóstico de cáncer, en la mitad de los pacientes con diabetes y cáncer de páncreas. Esto puede indicar que el cáncer de páncreas puede resultar en una insuficiencia pancreática endocrina. La diabetes Mellitus puede establecer una correlación etiológica del cáncer de páncreas avanzado (14).

1.2.6. Lugar de nacimiento

El lugar de nacimiento también ha sido estudiado en el cáncer de páncreas en numerosos estudios. La incidencia muestra similares fluctuaciones a lo largo de distintos países Europeos. Se estima que en Francia existe una incidencia de 6 nuevos casos por 100.000 habitantes y año. En Italia es de 10/100.000 casos y en España de 7/100.000 habitantes (15). Sin embargo, en Canadá se aprecia variaciones de 11/100.000 habitantes en Ontario hasta 3,7/100.00 habitantes en las regiones del Noroeste. La incidencia del cáncer de páncreas también varía entre las diferentes comunidades y grupos étnicos: la incidencia es de 11,7/100.000 habitantes entre la población latina de Los Ángeles, EE.UU versus 2,0/100.000 habitantes entre la población asiática de la misma ciudad (15).

1.2.7. Genética

La existencia de una mayor incidencia en ciertos grupos étnicos (16) hace pensar en la existencia de un componente genético. Se estima que un 3-5 % de los cánceres de páncreas son hereditarios y se relacionan con enfermedades como la pancreatitis crónica hereditaria, el Síndrome de Lynch tipo II, la ataxia telangiectasia y el melanoma familiar atípico. A pesar de los avances conseguidos, en la actualidad continuamos estando lejos de conocer la patogénesis del cáncer de páncreas. Se sabe que en la mayoría de los adenocarcinomas de páncreas existen alteraciones genéticas y/o cromosómicas. En el 70% de los casos se hallan mutaciones del oncogén K-ras. Otras alteraciones genéticas que se han descrito son deleciones o mutaciones de los genes supresor p53, APC o DCC, así como las alteraciones cromosómicas entre las que destacan las deleciones del 9p, 17p y 18q (17).

1.2.8. Síndromes hereditarios

El cáncer de páncreas es raro en personas menores de 45 años, excepto en aquellos cánceres de tipo hereditario (5-10% de todos los cánceres de páncreas). La mutación germinal responsable de esta predisposición no ha sido identificada en la mayoría de los síndromes con asociación familiar.

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

1. Tumores de ovario y de mama hereditario, asociados a mutaciones BRCA1 y BRCA 2. Estos pacientes presentan un riesgo entre tres y cuatro veces mayor de desarrollar ADCP (18).
2. Pancreatitis hereditarias con mutaciones en el gen del tripsinógeno catiónico. Presentan un riesgo 54 veces mayor de desarrollar ADCP (18).
3. Síndrome de Peutz-Jheguers. Asociado a un riesgo 100 veces mayor de desarrollar ADCP (18).
4. El síndrome “familiar atypical multiple mole melanoma” también conocido como FAMMM, que se debe a una mutación en el gen CDKN2A (p16) y que se ha relacionado con un riesgo 13-52 veces mayor de desarrollar cáncer de páncreas (18).

1.3. MORTALIDAD

Tanto en EEUU como en la UE, si observamos los últimos datos de World Health Organization database y Eurostat, el cáncer de páncreas es la única neoplasia que no muestra una tendencia hacia la mejoría en las tasas de mortalidad en ambos sexos.

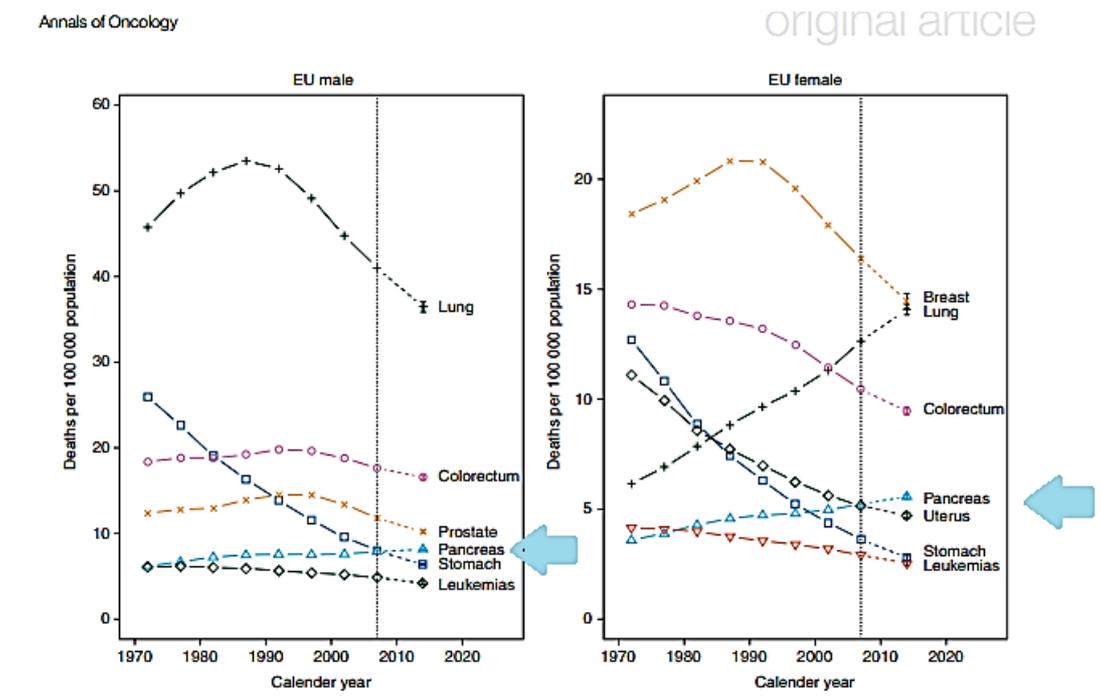


Figura 1. Tendencia de la mortalidad para el cáncer en hombres y mujeres de la UE en quinquenios desde 1970-1975 hasta 2005-2009. Las flechas señalan la tendencia ascendente del cáncer de páncreas (Curva azul con triángulos) (1)

En el 2014 la tasa de mortalidad fue de 8,13/100.000 habitantes para los varones y 5,56/100.000 habitantes en las mujeres. Según la American Cancer Society se estima que para el 2015 se diagnosticaran 48.960 casos nuevos de cáncer de páncreas en EEUU y aproximadamente unas 40.560 personas fallecerán como consecuencia del mismo (16)

A pesar de que en los grupos de edad más jóvenes (25-45 años) parece existir una mejor supervivencia en los varones, en el género femenino no ocurre esto (1). El cáncer de páncreas en las mujeres y a cualquier edad presenta una mayor tendencia hacia el ascenso de la mortalidad desde los años 70, mientras que en los hombres, parece haber alcanzado una fase de estabilización desde finales de la década de los 80. Estos datos probablemente reflejan las tendencias de las últimas generaciones de mujeres y hombre europeos en el

hábito tabáquico (1). Por otro lado, a pesar de las mejoras en las pruebas de imagen que permiten diagnosticar la presencia del cáncer de páncreas a lo largo de los distintos países, la ausencia de síntomas de la enfermedad y de un test de cribaje que permita una detección precoz hace que el diagnóstico continúe siendo tardío. Esta situación dificultaría la tendencia hacia la mejoría en la curva de supervivencia de estos pacientes.

Incluso en el escenario más favorable la supervivencia media no supera los 6-10 meses (17). En caso del cáncer de páncreas metastásico la supervivencia es aún menor estimándose en 3-6 meses desde el diagnóstico, aunque el uso de la quimioterapia ha demostrado un beneficio en la supervivencia y en la calidad de vida de estos pacientes en comparación con el tratamiento paliativo (19,20).

En la actualidad, la supervivencia actuarial para el adenocarcinoma de páncreas intervenido en centros con experiencia es de aproximadamente el 20%. De todos los factores que influyen en la supervivencia, la resecabilidad es el que más afecta. Sin embargo, la realización de intervenciones quirúrgicas con mayor agresividad no aporta un mayor beneficio, y sí un aumento de complicaciones (2).

En cuanto a los adenocarcinomas del cuerpo y la cola el pronóstico es francamente peor. En estos se produce un retraso en el diagnóstico, debido a lo inespecífico de los síntomas. Generalmente el tumor ya presenta un gran tamaño tumoral, o su crecimiento ha provocado dolor por extensión perineural. El resultado es que la mayoría de estos pacientes presentan tumores irresecables. La supervivencia a los 5 años es rara y la media es inferior al año (2).

En el resto de tumores del área ampular, las expectativas son afortunadamente diferentes. En los adenocarcinomas de la ampolla de Vater, las posibilidades de curación tras la duodenopancreatectomía cefálica se aproximan al 50% con una supervivencia media en casos de R0 de 45 meses (2).

Los colangiocarcinomas distales presentan una supervivencia actuarial a los 5 años algo inferior al 28%. En cuanto a los adenocarcinomas de duodeno, son poco frecuentes, y su comportamiento biológico se asemeja más al del adenocarcinoma gástrico que al pancreático (2).

2. HISTOLOGÍA, PATRONES DE DISEMINACIÓN Y MARCADORES TUMORALES

2.1. HISTOLOGÍA DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

Las lesiones tumorales que se desarrollan en el páncreas se pueden dividir tomando como referencia múltiples características (21,22,23,24,25).

Los tumores pancreáticos se pueden dividir en dos grandes grupos: *endocrinos* y *exocrinos*. Los tumores exocrinos se dividen a su vez en *tumores sólidos* y *tumores quísticos*. Cada uno de estos grupos tiene a su vez varios tipos diferentes. Los tumores sólidos exocrinos comprenden el adenocarcinoma ductal infiltrante, el carcinoma de células acinares y el pancreatoblastoma (Figura 2). El primero representa el 90% de los tumores sólidos exocrinos y se caracteriza por un patrón de crecimiento agresivo, con infiltración precoz retroperitoneal, vascular y perineural, y tendencia a la diseminación por vía ganglionar, intraperitoneal (carcinomatosis) y venosa (metástasis hepáticas).

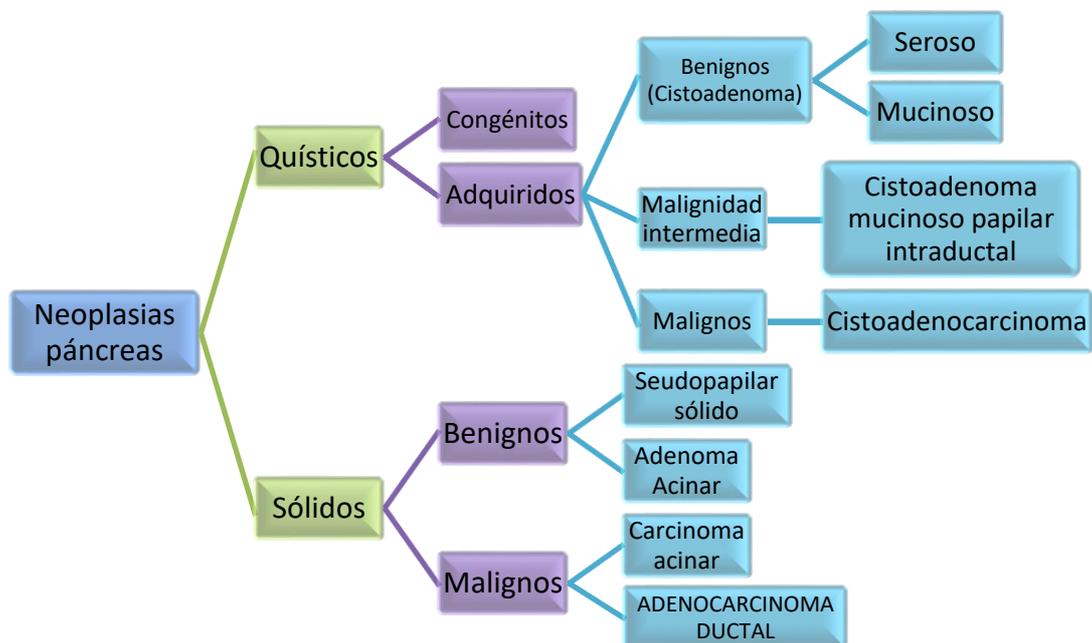


Figura 2. Clasificación histopatológica de los tumores de páncreas

Los **Tumores quísticos** son raros (3% de los tumores pancreáticos y 10% de los malignos). Los adquiridos que pueden ser benignos como los cistoadenomas (seroso y

mucinoso), de malignidad intermedia (Cistoadenoma mucinoso papilar intraductal) y malignos como el cistoadenocarcinoma que es muy infrecuente.

El **Adenocarcinoma ductal** que es el más frecuente de los tumores sólidos exocrinos fue descrito en 1760 por Morgagni en sus estudios histológicos (26). Es el tumor sólido maligno de páncreas más frecuente. Este tipo de tumor y sus variantes suponen el 80-90% de las neoplasias pancreáticas y una proporción mayor de las neoplasias malignas. El 70% se desarrolla en la cabeza de páncreas. A nivel macroscópico los tumores suelen ser grandes (tamaño medio de 3 cm) irregulares y mal delimitados. Una elevada proporción de casos se diagnostican cuando tienen metástasis a distancia (ganglionares y hematológicas). Los que aparecen en cuerpo y cola alcanzan diámetros mayores porque son asintomáticos durante mucho tiempo. En la microscopía óptica existen dos características fundamentales: la intensa reacción desmoplásica (compuesta de fibras de colágeno, fibroblastos y células inflamatorias) y células neoplásicas muy bien diferenciadas que no se corresponden con la alta letalidad de este tumor. En la inmunohistoquímica expresan citoqueratinas (7, 8, 18, 19 y de forma variable 20), mucina (MUC1, MUC4 y MUC5A), marcadores oncológicos (CEA, B72.3, CA 125 y CA 19.9) y marcadores específicos de cáncer de páncreas (mesotelina, S100A4, etc.). En cuanto a la secuenciación genética de los tumores, se incluye el oncogén KRAS y tres genes supresores de tumores (p53, p16/CDKN2A y SMAD4) (26).

Existen variantes que suelen ser tumores degenerados:

- ***Carcinoma coloidal:*** Degeneración de neoplasias quísticas mucinosas.
- ***Carcinoma adenoescamoso:*** Subtipo de peor pronóstico del adenocarcinoma ductal.
- ***Carcinoma de células en anillo de sello:*** Derivado de los ampulomas.
- ***Carcinoma anaplásico:*** Subtipo del adenocarcinoma ductal, más infrecuente y de peor pronóstico.
- ***Carcinoma de células gigantes:*** La existencia de células con marcadores epiteliales o mesenquimales, y de otras con expresión de ambos tipos (Vimentina y EMA), hacen pensar que es un tumor de origen epitelial con diferenciación mesenquimal.

- ***Carcinoma sarcomatoide***: Carcinoma anaplásico que simula un sarcoma a nivel histológico.

La historia natural de los ADCP comienza con un epitelio ductal sano que sufre una displasia para transformarse en una Neoplasia Intraductal de Páncreas (PanNI). A su vez, ésta se desarrolla en tres etapas: displasia leve (PanNI-1), moderada (PanNI-2) y severa (PanNI-3). Histológicamente son pequeñas (<0.5cm), papilares y que crecen dentro de los ductos pancreáticos. En cada una de estas etapas se activan una serie de oncogenes y factores de crecimiento que desarrollaremos con más detalle en el punto 3 de esta introducción. Solo un 1% de los PanNI desarrollarán un cáncer invasivo (26).

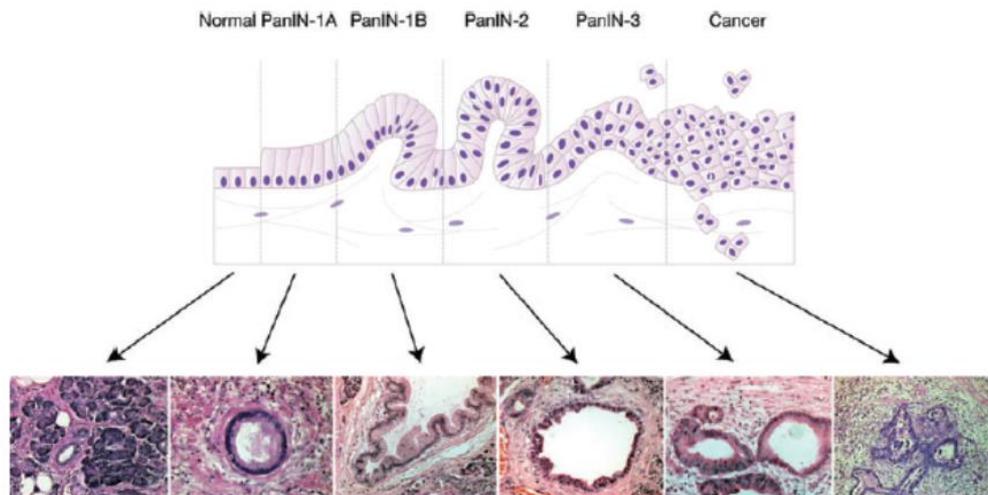


Figura 3. Desarrollo evolutivo del adenocarcinoma de páncreas (26)

Posteriormente desarrollan una reacción desmoplásica intensa del estroma y fibrosis. La "desmoplasia tumoral" se forma por un incremento en el tejido conectivo que infiltra y envuelve el tumor. Las células estrelladas pancreáticas que participan en la desmoplasia tumoral se caracterizan por expresar α -SMA (actina de músculo liso) y por la síntesis de procolágeno α -1T que son los principales componentes de la matriz extracelular que constituyen la desmoplasia. Las células estromales de estos tumores evidencian un aspecto morfológico dendrítico, expresan citofilamentos y una capacidad de síntesis de sustancias de matriz extracelular idénticos a los hallados en casos de pancreatitis crónica inducida por alcohol, lo cual sugiere unos mecanismos similares subyacentes al desarrollo de la fibrosis en la pancreatitis crónica y de la desmoplasia en el adenocarcinoma pancreático. Existe además evidencia creciente de la relación que existe entre las células

estrelladas pancreáticas y las células tumorales; por mecanismos parcialmente entendidos las células estrelladas pueden estimular el crecimiento tumoral, además pueden promover la invasión tumoral y posiblemente la angiogénesis (27). Esta zona de pancreatitis crónica que rodea el tumor se debe teóricamente a la obstrucción de esos conductos adyacentes por las células tumorales (21,22,23,24,25).

2.2. HISTOLOGÍA DE LOS TUMORES PERIAMPULARES

Los tumores que asientan en esta zona pueden originarse de cualquiera de los tres epitelios pancreático, biliar o duodenal, pero a veces es muy difícil distinguirlos histológicamente y se conocen como “tumores periampulares” o “ampulomas”. La mayoría son adenomas, pero un 25% son carcinomas. El tratamiento de estos tumores va desde la resección endoscópica a la duodenopancreatectomía cefálica, dependiendo tanto del tipo de tumor como de las características del paciente (2).

2.3. PATRONES DE DISEMINACIÓN

- ***Invasión local:*** Es la primera fase de la diseminación del tumor. Depende de la localización del mismo, ya que se van a ver afectadas las estructuras anatómicas adyacentes. Los que afectan a la cabeza del páncreas pueden infiltrar el antro gástrico y el duodeno produciendo obstrucciones altas del tránsito o hematemesis. Los de cuerpo y cola de páncreas afectan al cuerpo gástrico, bazo, primer asa yeyunal, hígado y peritoneo principalmente.
- ***Diseminación linfática:*** Es la que realiza el tumor a través de los conductos y ganglios linfáticos locorregionales que drenan la zona pancreática donde se localiza. Esta diseminación afecta al pronóstico. Si las lesiones son cercanas al páncreas (primera estación, adenopatías del hilio hepático e incluso del tronco celíaco) el tumor se considerará resecable, pero con una afectación negativa en la supervivencia del paciente. Si las adenopatías afectas se encuentran lejos del tumor, como los ganglios interaortocavos se considerará igual que si tuviese metástasis

hepáticas. Sin embargo, la diseminación linfática no contraindica “per se” la resección del tumor.

- **Diseminación perineural:** Este tipo de diseminación es característica del adenocarcinoma de páncreas. Los estudios muestran una incidencia del 51-100% y se encuentra presente en los estadios incipientes y es posible que se disemine a través de la longitud del nervio. En algunos casos es causa de dolor intratable y de recidiva tumoral por lo que se considera un factor pronóstico independiente. El mecanismo molecular se desconoce y no se han creado dianas terapéuticas para este tipo de diseminación (28). Los mecanismos moleculares no están bien definidos. Parece ser que el factor derivado del estroma 1α /CXCL12/CXCR4 está relacionado con un mayor neurotropismo de las células tumorales en los nervios periféricos (29).
- **Diseminación hemática:** Consiste en la liberación de células tumorales al torrente sanguíneo y su crecimiento a distancia del tumor primario. La glicosilación alterada es una de las características del adenocarcinoma ductal de páncreas. La expresión de los antígenos sialil-Lewis (SLe) se encuentra incrementada en la superficie de glicoproteínas o glicoesfingolípidos de las células del ADCP y la expresión de estos ligandos presenta una correlación negativa con la supervivencia del paciente. Estos antígenos glucídicos, ligandos de interacción específicos para la molécula de adhesión E-Selectina, se encuentran involucrados en la extravasación de las células tumorales (30). Los órganos que más frecuentemente se afectan por este tipo de lesiones son:
 - **Hígado:** Sobre todo en tumores de cuerpo y cola.
 - **Plexo celiaco:** Son causa de dolor de espalda severo en estos pacientes.
 - **Vena porta y vasos mesentéricos superiores:** Una obstrucción de estas estructuras vasculares produciría defectos de perfusión o retorno venoso a nivel de las asas intestinales y/o hepático.
 - **Ligamento de Treitz:** La afectación de este ligamento puede llevar a una obstrucción intestinal.

2.4. MARCADORES TUMORALES

No hay marcadores tumorales específicos para valorar la evolución del adenocarcinoma de páncreas. Los marcadores como el CA 19-9 sérico tienen una especificidad baja porque también lo producen otros tumores como el cáncer colorrectal, cáncer del pulmón, y cáncer de la vesícula biliar. Niveles altos de CA 19-9 también pueden ser causados por otras afecciones no cancerosas como cálculos biliares, pancreatitis, fibrosis quística y enfermedad del hígado. Durante la radioterapia, los niveles de CA 19-9 se pueden elevar debido a que las células cancerosas secretan el CA 19-9.

La mayoría de los pacientes de cáncer de páncreas tienen un CA 19-9 elevado en el momento del diagnóstico. Después del tratamiento definitivo o durante este, el aumento de las concentraciones de CA 19-9 puede identificar a los pacientes con crecimiento tumoral evolutivo. Sin embargo, la presencia de CA 19-9 normal no previene la recidiva (31).

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

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



Figura 4. Dianas potenciales de la actividad de la SPARC (32)

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

Existen otros marcadores tumorales menos frecuentes pero que se pueden encontrar elevados como: CA15-3, CA27-29, CA125 y CEA.

Hay marcadores tumorales que se encuentran en la misma pieza tumoral, como los miembros de la familia del “Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico” (EGFR) también conocido como HER1 o ErbB-1, que ejercen como receptores localizados en la célula y fomentan su crecimiento. Las pruebas realizadas en una muestra de tejido tumoral pueden cuantificar la cantidad de este receptor. En el caso de estar aumentada, puede indicar que el cáncer sea de rápido crecimiento y propagación, al igual que más difícil de tratar. Los pacientes con un nivel elevado de EGFR puede que tengan resultados menos favorables y requieran de un tratamiento más agresivo, especialmente con medicamentos que bloqueen (o inhiban) los receptores de EGFR. (34).

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

La mayoría de los tumores del tracto digestivo se originan por la acumulación de mutaciones: adquiridas o heredadas. Los mecanismos oncogénicos se dividen en tres grupos:

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

Esta serie de cambios son acompañados de un proceso conocido como inestabilidad cromosómica global, el cual persiste a lo largo de la vida del tumor. La identificación de las alteraciones genéticas ha aumentado el conocimiento de la naturaleza fundamental del cáncer de páncreas, con implicaciones en la precoz detección y tratamiento, pero su extrapolación a la práctica clínica es todavía incierta (35,36). (Tabla 1).

Tabla 1. Genes más frecuentemente mutados en el carcinoma ductal pancreático

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

La revolución tecnológica nos ha permitido comprender el adenocarcinoma pancreático en tres importantes vías (35):

- Identificación de más de 100 genes expresados en el carcinoma pancreático pero no en el tejido normal lo cual lleva al desarrollo de test diagnósticos o nuevas terapias.

- Identificación de genes relacionados con los acontecimientos clínico-patológicos los cual nos permite comprender la biología del carcinoma ductal.
- La expresión genética ha desenmascarado procesos relacionados con la invasión tisular.

3.1. ONCOGENES

- ***K-ras***: Afecta a la GTP-asa resultando una proteína activa en la señal de transducción. Son los primeros cambios genéticos detectados en las series de progresión tumoral (28). La mayoría de las mutaciones tienen lugar en el codón 12 de la proteína que consiste en la sustitución de la glicina por aspartato o valina. El K-ras de estirpe nativa se encuentra en la variante medular del carcinoma ductal (28). Tanto la mutación de k-ras como la sobreexpresión del HER2/Neu son marcadores tempranos de progresión del carcinoma ductal relacionados con la señal autocrina, siendo éstos, estimulados por ligandos como el factor de crecimiento de epidérmico (EGF) así como del factor de transformación del crecimiento (TGF- α). Es esta señal autocrina en bucle la que promueve la tumorigénesis (37,38).
- ***α -Catenina***: La mutación en genes de células presentadoras de antígenos (APC) produce la degradación de la α -catenina que a su vez inhibe del Tcf 4 (regulador de la transcripción), lo cual se expresa como en tumores pseudopapilares de páncreas.
- ***AKT2* y *MYB***: 10-20% de los cánceres de páncreas.

3.2. GENES SUPRESORES

- ***p53***: Se localiza en el cromosoma 17. La mutación que produce su inactivación ocurre en fases avanzadas del proceso de tumorigénesis. Tiene la misión fundamental de regular el ciclo celular y apoptosis. La pérdida del p53 lleva a una inestabilidad genética que caracteriza al cáncer de páncreas invasivo (37,38). Donehower y cols. (39) encontraron en sus estudios experimentales que la inactivación exclusiva del gen p53 no

producía cáncer de páncreas en el ratón, sin embargo cuando se asociaba a la activación k-ras se producía tumor y mayor incidencia de metástasis.

- **p16/CDKN2A:** Localizado en el cromosoma 9 es inactivado en un 80-95% de los cánceres de páncreas pudiendo ser detectada en fases iniciales. Aumenta en 13 veces el riesgo de cáncer de páncreas. Se relaciona con una atipia más severa tanto citológicamente como estructuralmente. Este gen codifica dos genes supresores INK4 y ARF que intervienen de forma crucial en la correcta transcripción del ADN (controla el daño al ADN en situaciones de estrés ambiental y proliferaciones anómalas) siendo por tanto un gen supresor tumoral. La ausencia de éste o su mutación conducen a una proliferación incontrolada, y además se ha relacionado con la quimiorresistencia (36,37,38). (Tabla 2).

Tabla 2. Codificación de genes supresores por p16/CDKN2

Genes codificados	Proteínas expresadas
<i>ARF</i>	<i>p14</i>
<i>ink4a</i>	<i>p16</i>
<i>INK4b</i>	<i>p15</i>
<i>INK4c</i>	<i>p18</i>

- **SMAD4/DPC4 y TGF-β:** Su inactivación se produce en un 55% de los cánceres de páncreas en fases tardías de la tumorigénesis (36,37). Es un gen supresor que puede tener utilidad diagnóstica. La proteína DPC4 es un factor de transcripción importante implicado en la patogenia de la señal del TGF-β (factor de transformación del crecimiento-β). La detección inmunohistoquímica de la proteína DPC 4 es un marcador muy sensible y específico de alteraciones genéticas en dicha proteína. No se expresa en lesiones pancreáticas benignas lo cual podría contribuir al diagnóstico de lesiones precursoras de alto grado o un cáncer invasivo. Se ha observado que la pérdida de expresión de la proteína DPC 4 conlleva una supervivencia más corta (36,37,40).

- ***MKK4***: Situado en el cromosoma 7. Se ha demostrado su implicación en el cáncer de mama y en el de páncreas (4%).
- ***STK 11/LKB1***: Su mutación es el origen del síndrome de Peutz-Jeghers que cursa con pólipos gastrointestinales y máculas melanocíticas. Estos pacientes presentan un alto riesgo de desarrollar cáncer ductal de páncreas (36,37).

3.3. GENES MANTENEDORES DEL GENOMA

Son los genes implicados en la detección de alteraciones y de reparación del genoma.

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

3.4. OTROS GENES FAVORECEDORES DE TUMOROGÉNESIS

Todos los genes que codifican proteínas involucradas en la adhesión intercelular tienen una función importante en la inducción y/o progresión del cáncer de páncreas. La expresión de estos genes podría indicar puntos clave en la supervivencia de las células malignas, por lo que utilizarlos como dianas terapéuticas podría llevar a la muerte de las células cancerosas (26,28).

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

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

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

3.5. FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES

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

- ***Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR):*** Presenta actividad tirosina quinasa tipo 1 y se expresa normalmente en la superficie de las células ductales. Uno de sus ligandos, EGF, se expresa en cantidades muy pequeñas en el páncreas normal. Sin embargo en las células tumorales se expresan grandes cantidades del ligando y su receptor en el estroma tumoral por lo que se produce una retroalimentación positiva a favor del crecimiento tumoral (34,41).
- ***Factor de crecimiento hepatocitario (HGF):*** Es un ligando cuyo receptor c-MET está codificado por el oncogén MET y localizado en la superficie de las células epiteliales (35). En el cáncer de páncreas, aumenta su concentración unas 10 veces, procedente de las células estromales o de los islotes, pero no de las células malignas. La sobreexpresión de receptor c-MET y HGF en las células ductales hiperplásicas, displásicas y

malignas, sugiere que se trata de un mecanismo molecular precoz en el desarrollo tumoral (42).

- **Factor transformador del crecimiento- β (TGF- β):** Inhibidor del crecimiento en casi todas las células epiteliales pero que en el cáncer promueve la dediferenciación celular. En el cáncer de páncreas se encuentran incrementadas las tres isoformas de este factor, especialmente el TGF- β_1 . La isoforma TGF- β_2 se relaciona con un estadio tumoral avanzado. Las células cancerosas presentan una falta de respuesta a las acciones inhibitorias de las isoformas del TGF- β (37,43).
- **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF):** Es el mediador de la angiogénesis mejor conocido y se asocia con mal pronóstico en el cáncer de páncreas. Se expresa tanto en células endoteliales como en células tumorales (44).
- **MMP-2:** Factor que favorece la invasión neoplásica y esta aumentado en el estroma tumoral. El nivel de expresión se correlaciona con un aumento de la reacción desmoplásica en el seno tumoral y su invasividad. Esta se puede ver incrementada por la inflamación como ocurre en la pancreatitis crónica donde se produce una elevación del NF- κ B, el cual aumenta la MMP-2, por lo que la inflamación puede promover la tumorogénesis (45).
- **Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF):** Las isoformas FGF₁ y FGF₂ están estrechamente relacionadas y se expresan en el páncreas tumoral (46).

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

4. LA IMPORTANCIA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

Dado el mal pronóstico del ADCP y los tumores periampulares de páncreas, resulta fundamental la búsqueda de biomarcadores para su detección precoz y de moléculas que permitan el desarrollo urgente de nuevas estrategias terapéuticas. Para ello, los modelos animales han demostrado ser muy útiles en la evolución de los avances en el ADCP. Han contribuido al estudio de nuevos quimioterápicos o combinaciones de los mismos que posteriormente han sido trasladados a ensayos clínicos con humanos que han demostrado un aumento en la supervivencia (19).

Los modelos animales nos permiten estudiar la evolución de estos tumores así como los cambios genéticos y de los marcadores tumorales que se producen durante su crecimiento. La búsqueda de dianas terapéuticas en la biología molecular del tumor también se apoya en el uso de modelos experimentales.

La definición y el uso de modelos animales en investigación es una temática de difícil abordaje, tanto en lo semántico como en lo ético.

Podemos convenir que el término Modelo Animal conlleva la detección de una especie o grupo animal que permita abordar la resolución de un problema científico biomédico particular (47).

Esta postura implica la búsqueda de un ejemplar que admita estudiar de la manera más aproximada, la condición, proceso o evento que interesa investigar y las modificaciones que se producen por el suceso en estudio (47).

La búsqueda de una definición que abarque el término “Modelo Experimental” tiene sus limitaciones y es un sendero abierto, sobre todo teniendo en cuenta una definición de un experto en el tema: “*El mejor modelo de un gato es un gato, y preferiblemente el mismo gato*” (48). Tenemos que tener en cuenta que los modelos animales, aunque intentan parecerse lo más posible al sujeto final del estudio, son diferentes y por tanto al extrapolar los datos debemos ser cautos y realizar ensayos clínicos en humanos que confirmen estos hallazgos.

Dado que cada especie animal tiene su dotación genética (que es, precisamente, la que hace que un individuo pertenezca a una especie determinada y no a otra), podría parecer contradictorio intentar reproducir en un animal de experimentación una enfermedad provocada por las alteraciones de los genes de un ser humano. Sucede, sin embargo, que aunque nuestros cromosomas sean distintos a los de los animales, tenemos infinidad de genes idénticos, muchos de los cuales, además, realizan funciones bioquímicas parecidas a las que realizan en la especie humana. Bien es verdad que pueden estar situados y repartidos por el conjunto de cromosomas de una manera completamente diferente. Y, por supuesto, la función conjunta que desarrollan es diferente en cada especie: por eso el gato es gato y no es perro, y la mosca es mosca y no es un ratón. Es muy frecuente, en la investigación con animales, intentar trabajar con especies de reproducción rápida (como el ratón), cuyos individuos sean bien manejables, y cuyas variables genéticas y ambientales puedan ser estrictamente controlables. En este sentido el ratón es un animal ideal (49).

Recordemos que, para la medicina experimental, el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como la mosca *Drosophila*, el nematodo *Caenorhabditis Elegans* e inclusive la rata. Estas ventajas son: (50)

- Al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre, aunque no hay que perder de vista que no se trata de un humano en miniatura.
- Tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en cautividad (biotérios), lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.
- Comparte con el hombre el privilegio de ser las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético.
- Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénitas, además de cientos de mutaciones y un gran número de reordenamientos cromosómicos disponibles.

- Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas.
- Finalmente, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en una inmensa cantidad de documentación sobre los fenotipos mutantes, las características de las líneas, los mapas genéticos y la secuencia completa del genoma.

El desarrollo de los quimioterápicos y otras moléculas antitumorales se encuentra íntimamente relacionado con los modelos experimentales. Multitud de quimioterápicos han sido testados utilizando estos modelos. Sin embargo, fármacos que funcionan bien en el ratón no son necesariamente efectivos en el ser humano. Durante los últimos 50 años, los xenoinjertos subcutáneos derivados de líneas celulares han sido ampliamente utilizados (51,52).

Desde los años 70, se han utilizado muestras de cánceres humanos tomados mediante biopsia o mediante cirugía que posteriormente han sido implantados directamente en ratones. Estos xenoinjertos mantienen la morfología tumoral inicial así como las mutaciones genéticas que le acompañan. Sin embargo, estos modelos fueron inicialmente desechados debido a su alto índice de rechazos. Recientemente, se ha retomado esta línea de investigación gracias al desarrollo de nuevas cepas de ratones inmunodeprimidos modificadas genéticamente que han minimizado las tasas de rechazo.

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

5. TIPOS DE MODELOS ANIMALES

Los modelos experimentales existentes en la actualidad son:

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

5.1. TUMORES INDUCIDOS CON SUSTANCIAS CARCINÓGENAS

Múltiples sustancias cancerígenas han sido estudiadas, comprobándose que inducían desde lesiones focales proliferativas y cambios degenerativos hasta carcinomas en el páncreas de distintas especies animales. La mayoría de estas sustancias son también mutagénicas. Suelen alcanzar el páncreas a través del torrente sanguíneo tras absorción digestiva. Estos agentes químicos pueden iniciar la aparición de lesiones preneoplásicas como la metaplasia ductal o acinar. Sin embargo, una mutación genética es necesaria para

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

Pocas sustancias carcinogénicas han sido estudiadas para la inducción de ADCP en el ratón, pero se ha comprobado que con las mismas se producía el desarrollo tanto de carcinomas acinares como ductales (53,54).

El modelo más extendido y estudiado es el Hámster Sirio Dorado con inyección intraperitoneal con N-nitrosobis-(2-oxoprolol)-amina (BOP) (55,56,57).

Desde el año 2010 este modelo ha sido utilizado por el grupo de Padillo-Ruiz et al (58,59,60) para estudiar de forma experimental la etiopatología del ADCP así como la identificación de moléculas con actividad antitumoral en monoterapia o en tratamientos combinados con algunas sustancias como Capacitabina, Celecoxib y Melatonina, encontrándose en esta última una mejoría en la supervivencia de los hámster tratados.

Estudios más recientes emplean la azaserina en ratas (61,62) y el 7,12-dimertilbenzaraceno en ratones (63). Algunos de estos modelos parecen asemejarse a la histología del ADCP humano.

Sin embargo el perfil genético del ADCP inducido por estas sustancias en el ratón no se encuentra bien definido, limitando la aplicación de estos modelos en estudios que abarquen la genética molecular y el estudio de las vías de señalización tumoral. Además, los carcinógenos producen a menudo efectos colaterales en otros tejidos, lo que reduce su valor como modelo animal en los estudios preclínicos. Por esta razón nuestro grupo de investigación se ha inclinado en los últimos tiempos hacia el empleo de xenoinjertos procedentes del humano.

En cualquier caso, la tumorogénesis inducida químicamente puede simular el proceso de la carcinogénesis espontánea en humanos iniciando el daño celular y culminando con la

producción de mutaciones genéticas que permiten el desarrollo de un tumor. Así, este modelo puede ser una herramienta valiosa para evaluar el impacto de los factores de riesgo ambientales incluyendo la dieta y sustancias químicas en la tumorigénesis del páncreas (64).

5.2. RATONES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS: GEMM

Recientemente, varios modelos de ratones genéticamente modificados (GEMM) han sido validados para recapitular sobre todo el espectro de la tumorigénesis pancreática en humanos (19,65,66).

Los tumores pancreáticos invasores de estos modelos de ratón pueden ser una buena fuente para la generación de modelos experimentales de ADCP ortotópico y tumores periampulares en un ratón inmunocompetente. Alternativamente, ofrecen varias ventajas sobre la línea celular establecida a base de modelos de xenoinjertos (67).

Los modelos GEMM son establecidos por la introducción de sustituciones de aminoácidos en oncogenes, lo que se traduce en la producción de tumores sólidos específicos. Las mutaciones en KRAS, p53, p16, o SMAD4 producen un espectro de lesiones premalignas pancreáticas hasta adenocarcinomas totalmente invasivos (68,69,70).

En el estudio de Yamaguchi et al, se empleó una oncoproteína viral conocida como SV40 (tsTAg) para determinar si dicha oncoproteína promovía la carcinogénesis del conducto pancreático iniciado por KRAS. De esta forma generaron ratones que expresaban tsTAg en las células epiteliales pancreáticas. Los ratones con expresión tsTAg-páncreas específica desarrollaron displasia acinar en 22 semanas sin neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN). Mientras que los ratones que presentaban ambas mutaciones tsTAg y KRAS desarrollaban adenocarcinomas ductales infiltrantes y morían en un periodo de 3 semanas (70).

Estos modelos son útiles para el estudio de la progresión de la enfermedad, así como la relación del desarrollo de tumores de páncreas dentro de su microambiente. Sin embargo, una desventaja importante de los modelos GEMM, es que los tumores producidos en estos

modelos son de origen murino; y es difícil determinar cómo se asemejan estos tumores a los de origen humano. Tampoco se conoce si estos modelos reflejan la heterogeneidad celular de los tumores primarios de páncreas, así como la heterogeneidad del estroma asociado al tumor pancreático visto en humanos. Además, los tumores GEMM resultan de una mutación específica introducida en el genoma del ratón, a diferencia de los tumores humanos que son el resultado de múltiples alteraciones genéticas (70).

5.3. INJERTOS TUMORALES

5.3.1. Aloinjertos

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

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

5.3.2. Xenoinjertos

Se entiende como xenoinjerto al implante de líneas celulares o muestras humanas implantadas en un ratón para el estudio del cáncer. Dependiendo de la localización del tumor o de las células tumorales los xenoinjertos en modelos experimentales son clasificados en dos tipos: heterotópicos u ortotópicos según la localización del implante en el ratón reproduzca anatómicamente la de su origen en el humano. Ambos modelos son comúnmente usados en el campo de la investigación.

5.3.2.1. *Dependiendo del lugar de implante*

5.3.2.1.1. *Xenoinjertos heterotópicos*

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

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

- *Xenoinjertos subcutáneos*

Los modelos experimentales con xenoinjerto subcutáneo son rápidos, con un coste bajo y requieren técnica asequibles y de fácil manejo. Es una de las mejores formas para expandir especímenes de tumores humanos, lo que permite convertir especímenes de tumores humanos en líneas celulares o facilitar estudios sobre angiogénesis (52).



Figura 5. Xenoinjerto subcutáneo de cáncer de páncreas en ratón inmunodeprimido

A pesar de los resultados prometedores demostrados por los distintos regímenes terapéuticos en los modelos experimentales con injerto subcutáneo a menudo estas líneas de tratamiento tienen poco efecto en pacientes humanos. Por ello, los estudios preclínicos con drogas se inclinan hacia el empleo de la ingeniería genética o el uso de modelos experimentales con injerto ortotópico (52,71).

5.3.2.1.2. *Xenoinjertos ortotópicos*

En los modelos con xenoinjertos ortotópicos, los tumores o las células tumorales son implantados o inyectados en el órgano en el que se origina el cáncer. Los xenoinjertos ortotópicos presentan el mismo microambiente que los tumores originales, por lo que son considerados más próximos al proceso de tumorigénesis en humanos. Además, parecen ser más adecuados para el estudio de las metástasis ya que los modelos de xenoinjerto subcutáneo rara vez las desarrollan (52,71). Sin embargo a pesar de las ventajas, la generación de modelos experimentales supone una labor intensa y técnicamente exigente. Además, la implantación de células tumorales o de masas en el páncreas mediante cirugía puede generar un trauma importante al animal receptor que requiera un periodo de convalecencia largo.

Otra modalidad es la inyección directa de células tumorales diseminadas en el páncreas tras la exposición quirúrgica del mismo. Ésta se ha asociado a un aumento local de la presión en la zona del páncreas donde se realizó la inyección. Debido a que el parénquima pancreático es muy fino, las células infundidas pueden extravasar con facilidad resultando en una reducción de la formación tumoral y en una mayor diseminación intraabdominal. Por esta razón algunos autores han utilizado Matrigel, que es una matriz biológica con factores de crecimiento que a bajas temperaturas permanece líquida, y que cuando supera los 22°C se transforma en un gel semisólido. Actúa como una matriz en tres dimensiones que contiene células cancerígenas pancreáticas para la inyección directa previniendo fugas de células neoplásicas y mejorando las tasa de formación tumoral. Sin embargo, esto también puede ser una desventaja ya que la matriz que se forma alrededor del tumor puede evitar la diseminación metastásica de las células así como la correcta llegada de los antineoplásicos estudiados (33,72). Para reducir la morbimortalidad intrínseca al procedimiento, algunos autores han desarrollado otros métodos menos invasivos como la inyección en el páncreas de células tumorales guiadas por ultrasonidos (33).

Los ratones inmunodeprimidos con xenoinjertos ortotópicos no replican exactamente igual el proceso natural de la tumorigénesis humana debido a la falta de un microambiente tumoral parecido. Se piensa que las células inmunes en el microambiente del tumor juegan un papel fundamental en la progresión y en las metástasis del cáncer de páncreas.

5.3.2.2. Dependiendo del origen de las células implantadas

5.3.2.2.1. Implante de tumores cultivados in vitro

La mayoría de los trabajos focalizados en mejorar el entendimiento del cáncer de páncreas se basan en líneas celulares y xenoinjertos derivados de líneas celulares cultivados “in vitro”. Estos sistemas de modelos tienen múltiples deficiencias, en gran medida resultado de haber sido cultivadas in vitro durante muchas generaciones. Prácticamente todas estas líneas celulares establecidas acumulan cambios genotípicos o fenotípicos que les confieren una ventaja de supervivencia in vitro, presentan expansión clonal, y sufren alteraciones en las características que dependen de la interacción de las células tumorales con el tejido del estroma adyacente en vivo. En consecuencia, el grado en el que estas líneas celulares y los xenoinjertos derivados de los mismos reflejan características de los tumores primarios de los que se derivaron es controvertido (52).

5.3.2.2.2. Implantes de tumores primarios humanos

Como alternativa algunos grupos plantean el implante de muestras heterogéneas de tumores primarios humanos de ADCP con una limitación de pases en ratones inmunodeprimidos que pueden retener el genotipo y fenotipo de los tumores de origen. Estos modelos podrían utilizarse para caracterizar tumores individuales del ADCP, identificar las características comunes a los tumores de páncreas, y evaluar nuevos agentes quimioterapéuticos. Aunque este tipo de xenoinjerto derivado del paciente se encuentra descrito en la literatura ya en las décadas de los 60 y 70 (22,52), las ventajas de estos modelos y su uso en medicamentos han sido recientemente reconocido e implementados (46,71).

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

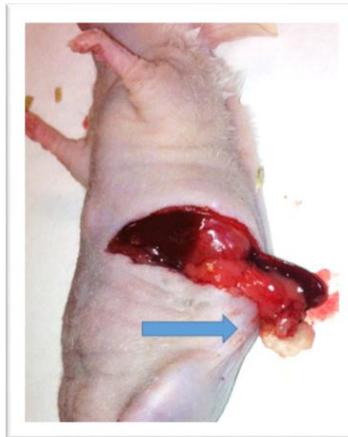


Figura 6. Injerto de cáncer de páncreas humano extraído tras resección pancreática implantado en la cola del páncreas de un ratón inmunodeprimido.

El xenoinjerto consiste en el implante de especímenes heterogéneos de tumores primarios humanos por vía subcutánea u ortotópica en ratones inmunocomprometidos inmediatamente después de la cirugía de resección de los tumores humanos (52). Múltiples laboratorios han establecido modelos de xenoimplantes procedentes cáncer de mama, renal, cabeza y cuello, y los tumores hepatocelulares. Algunos de estos modelos han predicho la respuesta clínica de un tipo específico de tumor a distintos agentes quimioterapéuticos (33,45,71,73,74,75,76). Sin embargo, el grado en que los implantes de ADCP y de tumores periampulares reflejan la histología o el comportamiento del tumor han sido escasamente estudiados. Algunos autores como García et al. (77) describen que este tipo de modelos experimentales mantienen las características histopatológicas y los rasgos genéticos de los tumores primarios de los que derivan con un máximo de dos pases en dos generaciones de ratones. El hecho de que sean capaces de mantener las características histopatológicas del tumor humano puede ser usado para predecir el crecimiento tumoral en el ratón.

En cualquier caso, el grado en el que los implantes de ADCP refleja las características morfológicas e histológicas de sus tumores de origen ha sido escasamente estudiado y existen pocas publicaciones al respecto. Por esta razón, nuestro grupo que cuenta con una amplia experiencia en el campo de los modelos experimentales inducidos por medio de sustancias químicas como el BOP, ha iniciado los estudios en base a los implantes de ADPC, con el fin de poder alcanzar modelos más similares al humano con el que poder experimentar con nuevos fármacos quimioterápico.

6. ÉTICA Y MODELOS ANIMALES.

Los modelos experimentales deben cumplir los siguientes principios de experimentación animal basadas en *las Reglas de las 3 Erres* formuladas a principios de los años sesenta por los científicos ingleses Russell y Burch (78).

1. **REEMPLAZO:** Alude a la búsqueda de métodos que eviten o sustituyan el uso de animales. Esto incluye métodos de reemplazo absolutos como pueden ser los cultivos in vitro o parciales sustituyendo los vertebrados por animales invertebrados con menor percepción del dolor.
2. **REDUCCIÓN:** Alude a cualquier estrategia que implique el uso del menor número posible de animales para obtener datos suficientes que respondan a la pregunta investigada, o la maximización de la información obtenida por un animal para así limitar o evitar el uso posterior de otros animales, sin comprometer el bienestar animal.
3. **REFINAMIENTO:** Alude a la modificación de la cría de animales o de los procedimientos para minimizar el dolor y la angustia, así como para mejorar el bienestar de los animales utilizados en la ciencia desde su nacimiento hasta su muerte.

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

Basándonos en la legislación vigente, este estudio cumple el *Real Decreto 53/2013 del 1 Febrero de 2013, para la protección de los animales en las instituciones biomédicas (BOE 34.8 Febrero del 2013)* por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

III. JUSTIFICACIÓN

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

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

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

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

Las características morfológicas e histológicas derivadas de los xenoinjertos de cáncer de páncreas en los modelos experimentales han sido escasamente estudiadas. Para poder alcanzar modelos animales más parecidos al cáncer en el humano hemos desarrollado este estudio. Este trabajo forma parte de una línea de investigación más ambiciosa que en un futuro pretende identificar moléculas o combinaciones de éstas con la ayuda de dichos modelos que permitan rescatar pacientes para cirugía.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H_0):

Los modelos experimentales desarrollados mediante xenoinjertos procedentes de carcinoma periampular y del ADCP humano, no conservan las características fenotípicas e inmunohistoquímicas del tumor primario del que derivan. (Tumor primario humano \neq Tumor injertado en el ratón)

Hipótesis alternativa (H_1):

Los modelos experimentales desarrollados mediante xenoinjertos procedentes de carcinoma periampular y del ADCP humano, conservan las características fenotípicas e inmunohistoquímicas del tumor primario del que derivan (Tumor primario humano = Tumor injertado en el ratón)

V. OBJETIVOS

1. GENERAL

Valorar la viabilidad de los xenoinjertos de los tumores periampulares humanos implantados en ratones desnudos.

2. ESPECÍFICOS

1. Evaluar la viabilidad de los xenoinjertos de los ADCP y tumores periampulares humanos implantados en tres modelos experimentales:
 - a. Subcutáneo
 - b. Intraabdominal
 - c. Pancreático
2. Caracterizar los implantes de cáncer de páncreas derivados de tumores humanos (anatomía patológica e inmunohistoquímica) en los 3 modelos experimentales generados.
3. Comparar los rasgos histopatológicos e inmunohistoquímicos de los modelos experimentales.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo analítico experimental con muestras humanas obtenidas quirúrgicamente de pacientes con diagnóstico de ADCP o tumores periampulares que se implantaron como xenoinjertos en tres modelos experimentales.

2. PACIENTES

Se incluyeron pacientes diagnosticados de carcinoma periampular y ADCP que fueron sometidos a una laparotomía exploradora desde el 17 de Mayo de 2012 hasta 13 de Febrero de 2014 en el Hospital Universitario “Virgen del Rocío” (Sevilla) intervenidos por la Unidad de Cirugía Hepatobiliar y de Trasplante Hepático.

La utilización de las muestras humanas fue aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Sevilla de acuerdo con los principios éticos de esta Institución. (CEEAA-US2014-013/5). (Anexo 1)

Se han excluido del estudio los pacientes menores de edad, neoplasias no identificadas como adenocarcinomas de páncreas o carcinomas periampulares, y no dar su consentimiento por escrito para la utilización de la muestra. (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión del estudio

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Criterios de exclusión</i>
Laparotomía exploradora, DPC*, DPT* o pancreatectomía distal (con o sin esplenectomía)	Laparoscopia exploradora
>18 años	<18 años
ADCP o tumores periampulares (Colangiocarcinoma, adenocarcinoma duodenal, ampuloma)	Tumores benignos, tumores quísticos (cistoadenocarcinoma seroso, tumores mucinosos, tumor mucinoso papilar intraductal, tumor papilar intraductal, tumor quístico de los islotes), tumores neuroendocrinos, pancreatoblastoma, carcinoma sólido pseudopapilar
Consentimiento informado firmado por escrito	Ausencia de consentimiento

DPC: Duodenopancreatectomía Cefálica; DPT: Duodenopancreatectomía Total

En todos los casos, se obtuvo el consentimiento informado escrito de los pacientes para la obtención de muestras de tejido tumoral y su utilización en el marco del presente proyecto de investigación. (Anexo 2).

Aplicando los criterios mencionados, se obtuvieron 11 muestras tumorales en fresco de un total de 10 pacientes. Éstas fueron extraídas de la pieza quirúrgica por un anatomopatólogo inmediatamente después de su exéresis. Las muestras obtenidas en la mayoría de los casos se obtuvieron mediante duodenopancreatectomía cefálica (n=8), excepto en una paciente que correspondió a una laparotomía exploradora por carcinomatosis peritoneal y otro obtenido mediante pancreatectomía distal. Además, se debe de tener en cuenta que uno de los humanos generó dos muestras (*Humano 4*): la metástasis ganglionar interaortocava y la muestra extraída del tumor pancreático.

La **edad media** de los pacientes fue de 70 años (50–81 años). El 80% de los pacientes eran pacientes >70 años. La mitad de los pacientes incluidos en la serie eran varones (n=5) y la otra mitad mujeres (n=5).

La **localización del tumor** más frecuente en nuestra serie fue la cabeza del páncreas (n=8). Hemos apreciado un caso en la cola del páncreas y otro derivado de una metástasis ganglionar.

El **diagnóstico anatomopatológico** más frecuente fue ADCP (n=8). También se registraron dos adenocarcinomas ampulares. Todos los pacientes presentaron un grado histológico G2 en el análisis de la pieza quirúrgica. Las muestras fueron nuevamente revisadas por 2 patólogos observando discrepancias con la primera revisión del grado histológico. Se evidenció un 72,7% de tumores moderadamente diferenciados, un 18,2% de tumores bien diferenciados y un 9% de tumores indiferenciados.

Para **clasificar el estadio tumoral** hemos empleado la clasificación TNM del Comité Americano para el Cáncer del 2010 (Anexo 3) (79). De los 10 pacientes, 7 tenían un estadio II (4 fueron estadio IIA y 3 estadios IIB), 1 estadio III y 2 estadios IV. De estos dos últimos pacientes, uno se correspondió con una laparotomía exploradora. La otra paciente (*Humano 4*) recibió quimioterapia y radioterapia preoperatoria consiguiendo la práctica desaparición del tumor primario pero persistiendo una adenopatía interaortocava infiltrada por ADCP de la que se tomó muestra para un xenoinjerto.

Un 30 % de los pacientes presentaron invasión perineural y en un 60% se evidenció afectación ganglionar. En 3 pacientes se evidenció metástasis a distancia.

Las características epidemiológicas y el diagnóstico anatomoclínico de los 10 pacientes se encuentran reflejadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Características epidemiológicas y diagnóstico anatomoclínico

Humano	Edad	Sexo	AP	T	N	M	Estadio	Grado histológicos	Metástasis ganglionares	Invasión perineural	Neoadyuvancia
H1	75	M	ADCP	T4	NX	M1	IV	G2	NO	NO	NO
H2	77	M	Adenocarcinoma ampular	T4	N0	M0	III	G2	NO	SI	NO
H3	57	H	ADCP	T3	N0	M0	IIA	G2	NO	NO	NO
H4	71	M	ADCP	TX	N1	M1	IV	G2	SI	NO	SI (nab+placitaxel+ gemcitabina)
H5	71	H	ADCP	T3	N1	M0	IIB	G2	SI	NO	NO
H6	73	M	ADCP	T3	N1	M0	IIB	G2	SI	SI	NO
H7	50	H	ADCP	T3	N0	M0	IIA	G2	SI	SI	NO
H8	70	H	Adenocarcinoma ampular	T3	N1	M0	IIB	G2	SI	NO	NO
H9	81	H	ADCP	T3	N0	M0	IIA	G2	NO	NO	NO
H10	78	M	ADCP	T3	N1	M0	IIB	G2	SI	NO	NO

3. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado animales de experimentación de la especie *Mus musculus* y la cepa Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}. Esta cepa es un tipo de ratón atímico e inmunodeprimido por lo cual permite el crecimiento de los injertos sin rechazo inmunitario.

El ratón presenta actividad de células linfocíticas B y células NK pero no de células linfocíticas T.

Todos los animales eran machos para evitar las interferencias de las hormonas femeninas con el tumor y en fase adulta de la vida (6 semanas de edad). El peso medio inicial era de 20-25g.



Figura 7. Ratón desnudo

3.1. ORIGEN

La mutación “nu” fue descubierta en 1962 por el Dr. N. R. Grist en una población exogámica cerrada de ratones albinos en el laboratorio de Virus del Hospital Ruchill, (Glasgow, Reino Unido). Este modelo de ratones desnudos atímicos se mantiene como una colonia aislada y dada sus características especiales son adecuados para su uso en oncología, inmunología, y otros campos de la investigación biomédica.

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

- La formación de anticuerpos que requiere de células T helper CD4+
- Las respuestas inmunes mediadas por células, que requieren las células T CD4 + y / o CD8 +

- Respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (requieren células T CD4 +)
- Destrucción de células infectadas por virus o células malignas (requiere linfocitos T CD8 + citotóxicos)
- Rechazo de injerto (requiere tanto las células T CD4 + y CD8 +)

Es por ello que los ratones desnudos han servido en el laboratorio para obtener información sobre el sistema inmunológico, leucemias, tumores sólidos, el SIDA y otras formas de deficiencia inmune, así como la lepra. Por otra parte, la ausencia de funcionamiento de las células T impide a los ratones desnudos rechazar aloinjertos y xenoinjertos.

3.2. TAXONOMIA Y CARACTERÍSTICAS

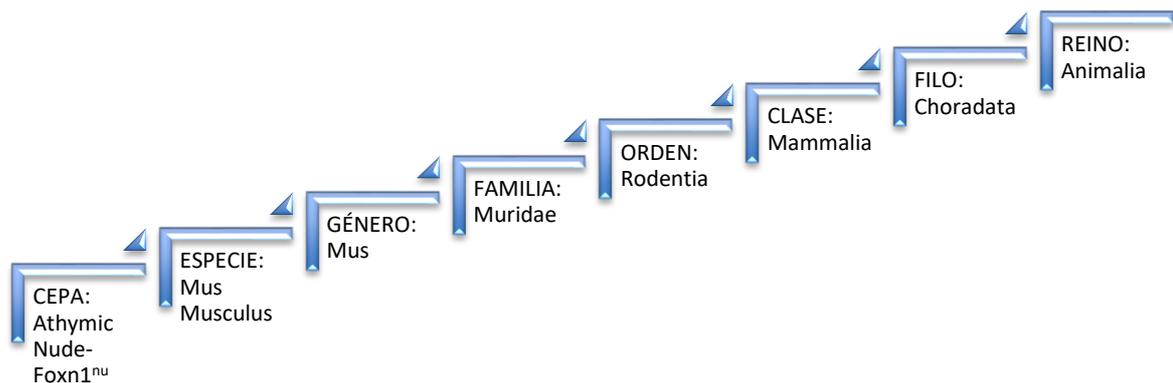


Figura 8. Taxonomía

- **Nombre común:** Ratón desnudo o atímico o knock-out (Nude mice o Athymic mice)
- **Fenotipo:** Albino. Fenotípicamente sin pelo. Es posible el crecimiento intermitente y escaso del cabello.
- **Camada media:** 7 ratones.
- El alelo nu en el cromosoma 11 es una mutación autosómica recesiva
- Presenta un timo rudimentario disfuncional o ausencia del mismo.
- Deficiencia de los linfocitos T
- Los linfocitos B presentan una función normal

- No pueden generar células efectoras citotóxicas
- Sin respuesta de injerto contra huésped
- Foxn1^{nu}/Foxn1 + heterocigoto; no muestran expresión parcial del fenotipo nu
- **Peso:**
 - **Macho:** 24,2-28,9 g.
 - **Hembra:** 21-28,1 g.
- **Esperanza de vida:** Normalmente es de 6 meses a un año. En ambientes libres de gérmenes y controlados con los tratamientos con antibióticos que se encuentran en muchos laboratorios pueden vivir casi tanto tiempo como los ratones normales (18 meses a dos años).
- **Número de cromosomas:** 40 (22500 a 30000 genes).
- **Consumo de agua:** 15 ml/día.
- **Consumo de alimento:** 5-10 g/día (adulto).
- **Temperatura corporal:** 36.2-37.5 C (rectal).
- **Frecuencia cardíaca:** 280-412 latidos/min.
- **Frecuencia respiratoria:** 74 (33-127) respiraciones/min.

Los ratones atímicos fueron adquiridos a Laboratorios Harlan (Barcelona, España) y se mantuvieron en condiciones de estabulación en el servicio de experimentación del IBiS que está registrado según los estándares del *Decreto 142/2002, BOJA de 7 de Mayo*. La descripción de sus instalaciones queda recogida en la *Resolución 151/2008, BOJA de 30 de Julio*. Permiten estabular en jaulas individuales aisladas con microambiente controlado, entre otros animales de experimentación, ratones desnudos bajo las condiciones ambientales que determina la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (Anexo 4).

Los animales de experimentación fueron mantenidos en condiciones estandarizadas de estabulación (Temperatura: 21+/- 5 ° C y humedad: 70%). con un ciclo estable de luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), acceso a una dieta estándar y a reservorios de agua a los que pudieron acceder libremente y que fueron renovados diariamente (Figura 9). Los animales fueron evaluados semanalmente controlándose tanto el peso como la situación

de salud de los mismos. En este sentido, el proyecto cumple la legislación actual en esta materia, en particular, el *Real Decreto 53/2013 (1 de febrero 2013)*, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Estos procedimientos han sido revisados, y corregidos en su caso, por el Comité de Investigación Biomédica del Centro. (ES410910008015; SE15/CS/U)

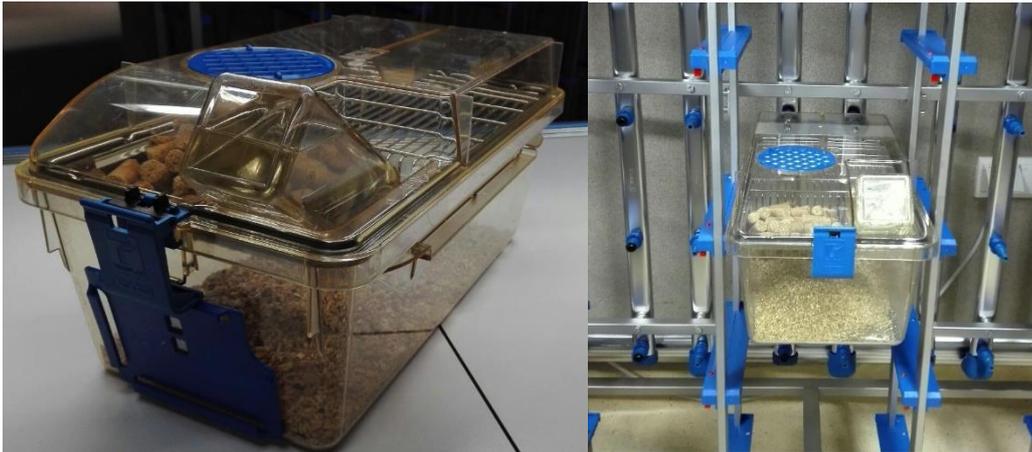


Figura 9. Animalario. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

4. IMPLANTES DEL XENOINJERTO

Las muestras fueron obtenidas en condiciones estériles, evitando tejido necrótico tumoral y áreas de tejido pancreático sano. Las muestras fueron cortadas en fragmentos de 2x2x2 cm y conservadas en medio de cultivo a temperatura ambiente hasta su implante. El periodo de latencia para el implante osciló entre 15 minutos y 2 horas. El medio de cultivo referido fue SIGMA-Life Science NUTRIENT MIXTURE F-10 HAM (SIGMA-ALDRICH. St Louis, MO. USA), con un 20% de suero bovino fetal y previamente almacenada entre 2 y 8 ° C.

La muestra obtenida de cada paciente (Hx), se dividió en cinco porciones de 3x3x3 mm. De éstas, tres fueron destinadas a los xenoinjertos implantadas a nivel subcutáneo, pancreático e intraperitoneal según la técnica descrita a continuación en el apartado 4.5. y las otras 2 restantes se destinaron para estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico.

El implante del tumor humano al ratón o del ratón a un nuevo murino se llama *Pase*. En nuestro estudio hemos realizado *tres pases*: Pase 0, Pase 1, Pase 2. (Figura 10).

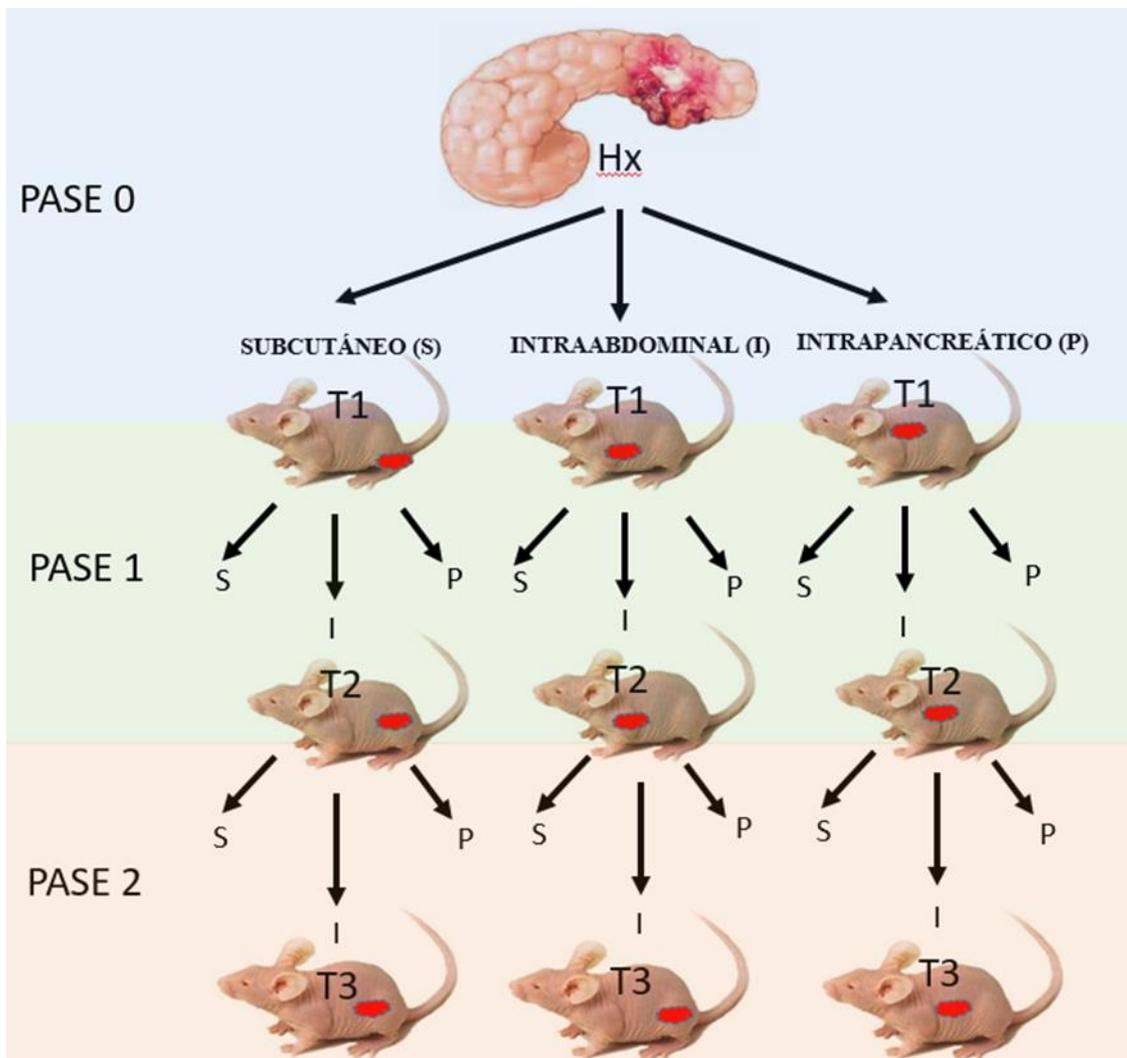
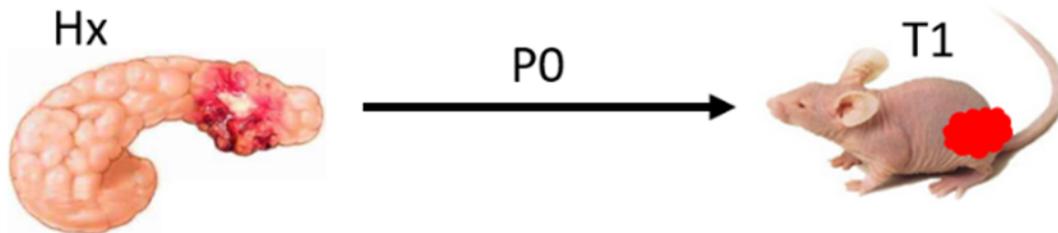


Figura 10. Desarrollo del proceso del implante tumoral en el modelo animal

Pase 0: El color azul marca el desarrollo de esta fase; (**Hx**): Muestra humana; (**T1**): Injerto desarrollado en el ratón procedente de Hx; **Pase 1:** El color verde muestra el desarrollo de esta fase; (**T2**): Injerto desarrollado en ratón procedente de T1; **Pase 2:** El color naranja muestra el desarrollo de esta fase; (**T3**): Injerto desarrollado en ratón procedente de T2.

4.1. PASE 0

Llamamos Pase 0 (P0) al implante del xenoinjerto procedente del cáncer de páncreas humano (Hx) en el ratón



*Figura 11. **Pase 0 (P0)**: Desarrollo del implante tumoral humano en el ratón T1; **(Hx)**: Muestra humana; **(T1)**: Injerto desarrollado en el ratón procedente de Hx*

Al xenoinjerto de tejido tumoral que crece en el ratón durante esta fase lo llamamos T1. Una vez transcurridas 20 semanas o cuando el ratón desarrolló un tumor T1 visible de aproximadamente 1,5 cm se procedió a su sacrificio.

Las muestras de cáncer de páncreas procedentes de T1, se dividieron nuevamente en cinco porciones. Tres destinadas al implante en un nuevo ratón según el modelo correspondiente y las dos restantes para ser sometidas a estudio del nuevo tejido tumoral tras fijarlo con paraformaldehído y congelación para determinar los valores histológicos e inmunohistoquímicos y comparar los hallazgos con las muestras originales Hx.

La intervención se realizó en la campana de flujo laminar del animalario del IBiS bajo condiciones de esterilidad quirúrgica.

4.2. PASE 1

Se define el Pase 1 (P1) como el implante del xenoinjerto T1 procedente del ratón sacrificado en un nuevo murino. El tumor desarrollado en este ratón se denominará T2. En este nuevo implante se repiten los mismos pasos descritos en el Pase 0.

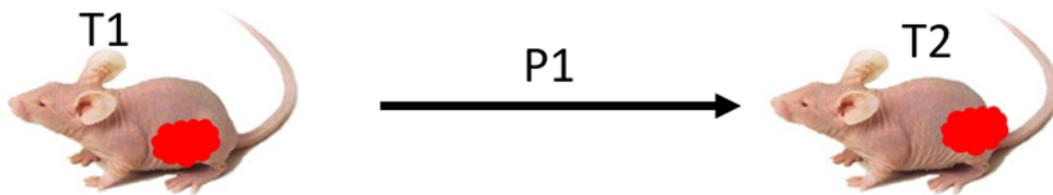


Figura 12. Pase 1 (P1). Desarrollo del implante tumoral T1 en el ratón T2; (T1): Injerto desarrollado en el ratón procedente de Hx; (T2): Injerto desarrollado en el ratón procedente de T1.

4.3. PASE 2

Se define el Pase 2 (P2) como el implante del xenoinjerto T2 procedente del ratón sacrificado en un nuevo murino. El tumor desarrollado en este ratón se denominará T3. En este nuevo implante se repiten los mismos pasos descritos en el Pase 0 y en el Pase 1.

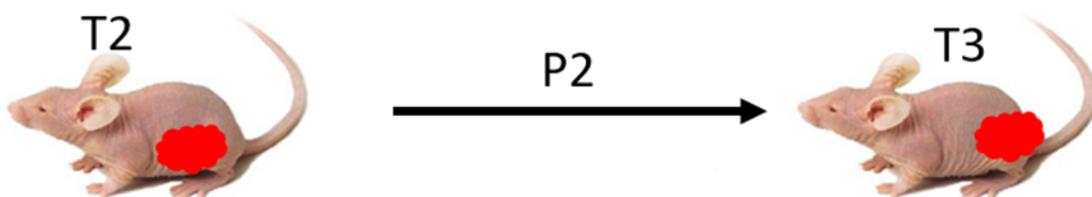


Figura 13. Pase 2 (P2): Desarrollo del implante tumoral T2 en el ratón T3; (T2): Injerto desarrollado en el ratón procedente de T1. (T3): Injerto desarrollado en el ratón procedente de T2.

4.4. TÉCNICA QUIRÚRGICA Y ANESTÉSICA

4.4.1. Lista de materiales empleados

- *Campo estéril rectangular.*
- *Placa de Petri. Platos de 10 cm*
- *Tubos de Eppendorf de 1,5 mm*
- *Betadine (10% povidona yodada)*
- *Bastoncillos*
- *Guantes estériles.*
- *Jeringa de Hamilton 100 µl (Hamilton Syringe Co., Nevada, USA).*
- *Aguja intradérmica de 30G (0,3 x12 mm)*
- *Anestesia: ketamina (80 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y droperidol (100 mg/kg).*
- *Sutura de seda del 3/0 con aguja curva cilíndrica.*
- *Polisorb 4/0 con aguja cilíndrica.*
- *Porta agujas.*
- *Microtijeras.*
- *Pinzas de disección sin dientes.*
- *Mosquitos*
- *Gasas estériles 10 x 10 cm*
- *Bisturí (Hoja nº 15 y mango)*
- *Campana de flujo laminar.*

4.4.2. Anestesia

En la campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, el operador inicia el procedimiento mediante la administración de anestesia al ratón. Para ello utiliza una aguja intradérmica y 5cc de anestésico. La anestesia se compone de Ketamina, xilacina y droperidol (neuroleptico) administrada por vía intraperitoneal. Las dosis de los fármacos que mantendrán la analgesia y sedación durante la intervención quirúrgica son: ketamina (80 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y droperidol (100 mg/kg). La acción sedante e hipnótica del droperidol es débil, pero como neuroleptico suprime los movimientos anormales

manteniendo los reflejos medulares. El efecto anestésico suele durar 1 hora aproximadamente durante el cual se realiza el implante.



Figura 14. Anestesia intraperitoneal

Esperamos unos 10-15 minutos hasta que el ratón este anestesiado. Para asegurarnos que el ratón ha perdido completamente la conciencia, apretamos entre nuestros dedos las extremidades inferiores evidenciando la falta de reflejos periféricos.

4.4.3. Técnica quirúrgica

Debemos pintar la zona donde se va a realizar la incisión con una gasa estéril empapada en povidona yodada. Se debe extender desde el cuello hasta la base de la cola.

Se desarrollaron tres modelos distintos:

- **Modelo subcutáneo**

Se coloca al ratón en decúbito prono. Se realiza una incisión con el bisturí frío en el dorso del ratón de unos 2-3 mm situado a unos 10 mm de la base de la cola. Se disecciona con la tijera un colgajo subcutáneo. Con la pinza introducimos la porción tumoral que corresponde. Se cierra el colgajo utilizando el porta agujas mediante puntos simples de seda 3/0.

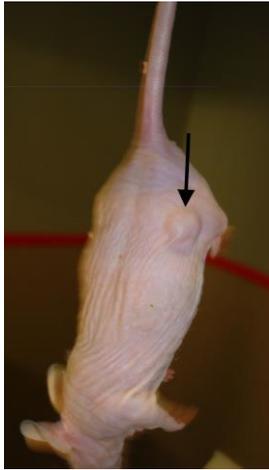


Figura 15. Implante subcutáneo

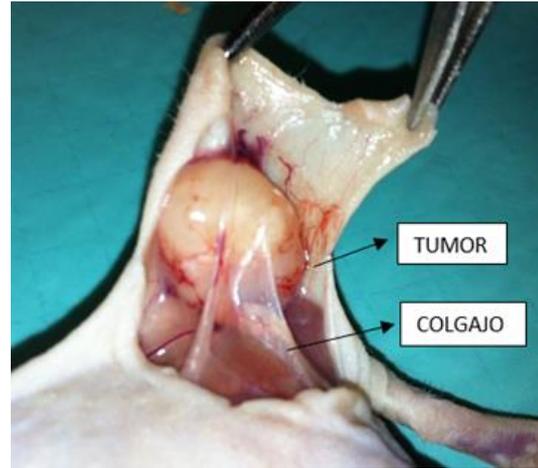


Figura 16. Colgajo con xenoinjerto subcutáneo

- **Modelo pancreático**

Colocado el animal en decúbito lateral derecho, se realiza una incisión subcostal izquierda de unos 3 mm, situada a 1 mm de la parrilla costal. Se debe traccionar de la musculatura abdominal para evitar lesiones de los órganos subyacentes, se realiza la incisión en el plano muscular.

Para evitar lesionar el bazo y el páncreas, se procede a la luxación del bazo. Para ello empleamos un bastoncillo con la punta de algodón. A continuación, la cola del páncreas queda completamente expuesta.

Utilizado una sutura reabsorbible del 4/0 se fija el tejido tumoral a la cola del páncreas del ratón. Debemos asegurarnos de la ausencia de hemorragias o de fugas intestinales tanto del páncreas como el bazo antes de reintroducir los órganos en su posición anatómica. Finalmente se realiza un cierre por planos con una sutura reabsorbible del 3/0 con puntos sueltos.

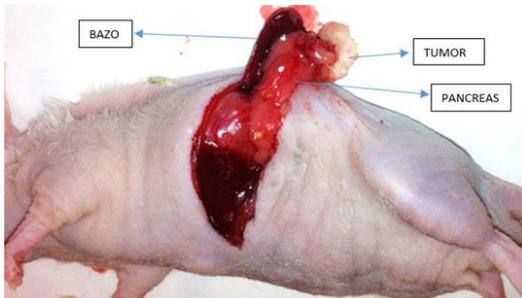


Figura 17. Implante tumoral pancreático



Figura 18. Desarrollo del tumor pancreático a las 8 semanas

- **Modelo intraperitoneal o intraabdominal**

En posición de decúbito supino se realiza una laparotomía a unos 10 mm del pubis de 3 cm de longitud. Se debe tener la precaución de traccionar de la musculatura con la pinza de disección para evitar la realización accidental de una enterotomía. Posteriormente se introduce la porción de tumor correspondiente y se realiza un cierre por planos.



Figura 19. Implante intraabdominal

4.5. SEGUIMIENTO Y SACRIFICIO

Después del implante todos los ratones fueron monitorizados al menos dos veces en semana para valorar el crecimiento tumoral y la presencia de signos que pudieran hacer pensar en una complicación de la cirugía como la agitación, la postura encorvada o la

inmovilidad. En caso de que el animal requiriera analgesia postoperatoria se procedió a la administración de 0,1 ml de Ketoprofeno (Ketofeno al 1%, Merial, Francia) cada 12 horas hasta reducción de los signos de sufrimiento. Así, se ha valorado la *morbilidad* de cada modelo experimental. Hemos analizado la infección del sitio quirúrgico, la infección intraabdominal o peritonitis, la hemorragia, la sepsis, la aparición de ascitis o úlceras, la sobredosis y la dehiscencia de la laparotomía media o subcostal.

Los ratones se han pesado una vez por semana hasta su sacrificio para observar si existe una disminución o un aumento del peso relacionado con el desarrollo tumoral. Para valorar la *evolución del peso* del ratón a lo largo del tiempo hemos tomado como punto de corte la *semana 10*. En esta semana los ratones ya han alcanzado la madurez y la mayoría continúan vivos, además de que un porcentaje importante de los mismos todavía no presentan signos de tumor visible, sin embargo es probable que ya lo hayan desarrollado.

A la 20 semanas del implante o cuando se evidencia un crecimiento rápido del tumor mayor de 1,5 cm se sacrifica al ratón para determinar el volumen tumoral y obtener las diferentes piezas para el estudio. De esta forma, analizamos el *tiempo libre de enfermedad*, es decir, el tiempo que tarda en desarrollarse el xenoinjerto desde el implante hasta la aparición manifiesta de tumor.

Para valorar los casos que no desarrollaron tumor hemos empleado como fecha de fin de seguimiento el día de sacrificio o en su caso la fecha del éxitus (si la muerte fue fortuita). En los casos que desarrollaron tumor pero su crecimiento no era evidente debido a su localización en el abdomen, se ha tomado como fecha de detección del tumor el día del sacrificio.

Por últimos hemos evaluado la *mortalidad* de cada modelo experimental. Hemos considerado éxitus todos aquellos ratones que murieron sin ser sacrificados bien por morbilidad de la técnica o por un desarrollo tumoral desapercibido. Hemos considerado *mortalidad postoperatoria* aquellos murinos que murieron en las primeras 24 horas tras el implante o que murieron semanas después como consecuencia directa de un fallo en la técnica quirúrgica (ej.: perforación encubierta).

5. VARIABLES DEL ESTUDIO

- **Variable principal:**

- Desarrollo tumoral (%): Evidencia durante la vida del ratón o en la autopsia de un crecimiento tumoral mayor de 1-1,5 cm o presencia de metástasis.

- **Variables secundarias:**

- ❖ *Determinadas en los animales de experimentación*

- Tiempo libre de enfermedad (semanas): Tiempo desde el implante del tumor hasta el desarrollo tumoral o hasta la evidencia de ausencia de tumor en la autopsia.

- Mortalidad (%): Ratones fallecidos de manera espontánea sin intervención de los investigadores.

- Mortalidad postoperatoria (%): Muerte durante las primeras 24 horas tras la cirugía o en los días consecutivos como consecuencia de un fallo directo de la técnica quirúrgica.

- Morbilidad (%): Aparición de complicaciones derivadas de la cirugía. Se han incluido infección del sitio quirúrgico, infección intraabdominal o peritonitis, hemorragia, la sepsis, aparición de ascitis o úlceras, la sobredosis y la dehiscencia de la laparotomía media o subcostal.

- Peso (gr): Peso en gramos de los ratones implantados.

- ❖ *Histología e inmunohistoquímica de las muestras*

- Grado de diferenciación (%): Determinado con las muestras de hematoxilina-Eosina mediante la observación de la morfología de las glándulas, núcleos celulares tumorales y el número de mitosis (Apartado 6.5). Se dividen en bien diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2), poco diferenciados (G3).

- Grado de fibrosis (%): Espesor del estroma tumoral determinado mediante la tinción de Tricrómico de Masson (Apartado 6.5), correspondiendo el *grado 1* a la mínima fibrosis alrededor de las glándulas tumorales y *4*, al grado máximo de fibrosis entre las glándulas tumorales.

- Grado de proliferación celular (%): Determinado mediante el número de mitosis y la expresión de Ki67 en los ribosomas de los núcleos celulares, clasificada como baja/alta en función del punto de corte 2,97% (Apartado 6.7).

- Fibrogénesis (%): Expresión de alfaSMA en fibroblastos y mioblasto. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 1,84%.

- Angiogénesis (%): Expresión de CD31 en las células endoteliales del tumor. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 0,2%.

- Apoptosis (%): Expresión de TUNEL en las células con ADN fragmentado o degradado. Se clasificó como baja/alta en función del punto de corte 27,11%.

- **Variables complementarias**

- ❖ *Determinadas en los pacientes*

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

6. PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS

6.1. PRESERVACIÓN DEL TEJIDO TUMORAL

El tejido recogido a partir del tumor primario (Hx) o posteriores generaciones de especímenes tumorales (T1 y T2) que no eran necesarias para la implantación, se conservó en el Biobanco para su uso futuro en otros proyectos de investigación, así como los análisis incluidos en el presente proyecto de investigación. Las muestras se preservaron mediante los siguientes métodos:

- **Criopreservación**

Se fraccionó cada tumor colocando 5 fragmentos/vial con 1 ml de medio MEM conteniendo DMSO (10%) y suero bovino fetal (10%) en un contenedor en contacto

indirecto con una solución de isopropanol puro que es mantenido a -80°C durante 24 horas, para ser los criotubos transferidos posteriormente a un contenedor de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

- **Fijación en una solución de Paraformaldehído**

El tejido tumoral se fija con una solución de formalina al 10% para su posterior inclusión en parafina. Posteriormente, son cortados en muestras de $5\ \mu$, útiles para los estudios de histología y medición de las variables por procedimiento de inmunohistoquímica.

6.2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO ESTUDIADO

Los cortes realizados en los bloques de parafina se colocaron de forma seriada en portas con base de poli-lisina adecuado para los estudios histológicos. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas siguiendo el procedimiento de rutina.

- **Desparafinado**

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

- **Hidratación**

- Bañamos las muestras tres veces en Xileno durante 5 minutos. El xileno ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$) es un benceno que disuelve los restos de parafina.
- Hidratamos las muestras en orden decreciente de concentración de alcohol. Desde alcohol absoluto (100%) hasta agua destilada. Se meten las muestras 2 minutos en cada uno.



Figura 20. Cubetas con alcohol en orden creciente de concentración

6.3. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

Tras la rehidratación de los cortes histológicos, el tejido se tiñó con Hematoxilina de Harris (Fischer-Científico, Suwanee, GA). Las muestras fueron luego procesados en alcohol ácido al 0,25%, pavonado de litio carbonato, y se contratiñeron con una solución de eosina (Acros Organics-Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, Nueva Jersey). Finalmente, el tejido fue deshidratado en dos baños de etanol al 95% y etanol absoluto y se fijó en xileno.

La hematoxilina al ser una sustancia básica o catiónica tiñe los núcleos, mientras que la eosina al ser un componente ácido facilita la tinción del citoplasma.

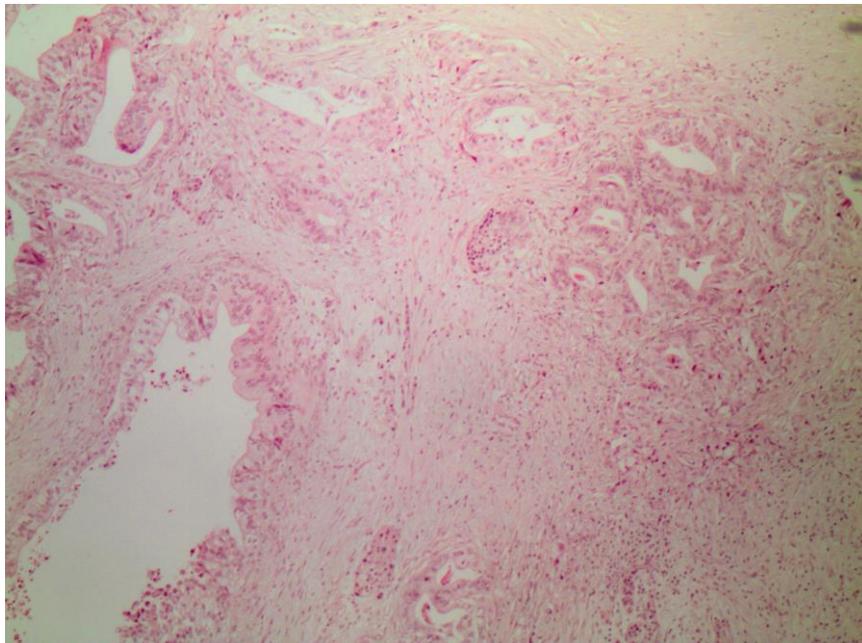


Figura 21. Hematoxilina y Eosina del Humano 2. Ampuloma

6.4. TINCIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON

La tinción tricrómica de Masson se emplea para teñir fibras de Colágeno tipo I y algunas fibras reticulares. Permite el estudio del estroma tumoral.

Para ello, las muestras se tiñeron con hematoxilina férrica durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron sucesivamente con agua corriente y con agua destilada, y se procedió a la tinción con la escarlata-fucsina ácida. Tras un nuevo lavado con agua

destilada, la muestra se trató con una solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 15 minutos y se coloreó la pieza con azul de anilina. Se realiza un último lavado en agua destilada y se diferencia la muestra en la solución de ácido acético al 1%. Finalmente, la muestra se deshidrata y se aclara.

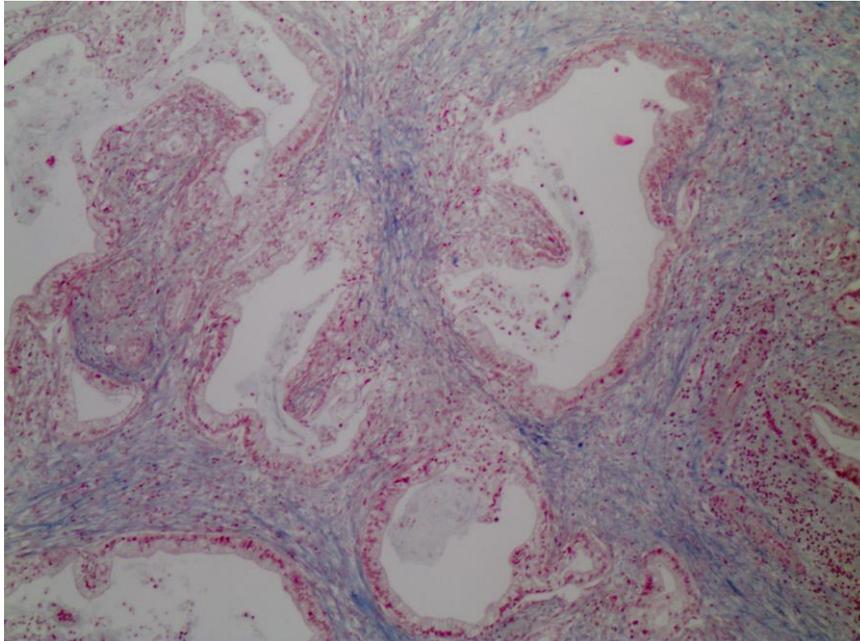


Figura 22. Tricrómico de Masson. Humano 10. Adenocarcinoma

6.5. VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS

Para la valoración de las muestras tanto de hematoxilina-eosina como Tricrómico de Masson, se han valorado 2 veces todas las muestras, con una semana de tiempo entre ambas mediciones. Siempre al inicio de la mañana, de cada muestra, primero la hematoxilina-eosina y posteriormente el tricrómico.

El **grado de diferenciación** se ha clasificado en *bien diferenciado* (glándulas tumorales bien formadas con núcleo pequeño en comparación con el citoplasma), *moderadamente diferenciado* (glándulas tumorales irregulares, con mayor atipia celular y núcleos pleomórficos). *Poco diferenciado* (glándulas tumorales muy mal definidas, que a veces adquieren un patrón sólido, mayor atipia arquitectural y celular, núcleos pleomórficos y grandes en relación al citoplasma y nucléolo visible).

La WHO establece que en los tumores bien diferenciados hay menos de 5 mitosis en 10 campos de gran aumento, entre 5 y 10 mitosis para los tumores moderadamente diferenciados y más de 10 para los poco diferenciados.

El **número de mitosis** se ha calculado contando mitosis en 10 campos de gran aumento con 40x. Realizando previamente un examen de la muestra a 10x, empezando a contar en la zona donde se concentran más mitosis. De las 2 mediciones de mitosis en cada muestra se ha tomado el resultado mayor.

El **grado de fibrosis** se ha valorado en las zonas intra y peritumorales, con tinción tricrómico de Masson en grados de 1 a 4, correspondiendo 1 a la mínima fibrosis alrededor de las glándulas tumorales y 4, al grado máximo de fibrosis entre las glándulas tumorales. No existe ninguna clasificación objetiva para valorar grado de fibrosis en tumores pancreáticos. En el caso de la cirrosis hepática sí hay una clasificación, también de 1 a 4, bien establecida y objetivable, pero hay unas estructuras de referencia en la arquitectura hepática. En los casos a valorar se aprecian glándulas tumorales al azar y desmoplasia (reacción del estroma ante el tumor) distribuidas de forma caótica. En otras palabras, al no haber unos criterios objetivos para valorar fibrosis en el estroma desmoplásico, hay un cierto componente de subjetividad en la valoración que podría dar lugar a un grado de variabilidad interobservador (80).

6.6. INMUISTOQUÍMICA

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

Los cortes de las muestras previamente desparafinadas y rehidratadas según se ha descrito previamente, se sometieron al procedimiento denominado de “*Exposición antigénica*”

que persigue facilitar la exposición de los antígenos de la muestra a los anticuerpos primarios. Para ello, las muestras fueron colocadas dentro del recipiente de plástico de color blanco (Figura 23) que contiene Citrato Sódico a 10 mM con pH 6. Las muestras fueron calentadas al baño maría en el microondas durante 15 minutos a máxima potencia.



Figura 23. Citrato de sodio al baño maría durante 15 minutos

La unión inespecífica del anticuerpo primario a las proteínas se previno, con la incubación durante 1 hora con un volumen (80 ml) de una solución de bloqueo o tampón TBSA-BSAT (0.12 g Tris-hidroximetil-aminometano, 0,9 g NaCl, 1 ml de azida sódica al 2%, 2 g albúmina bovina, 0,1 ml de Tritón X-100) (Figura 24).



Figura 24. Muestras bañadas en TBSA-BSAT

Tras el bloqueo de la muestra, se procedió a su incubación con el anticuerpo primario en una cámara húmeda que se prepara mediante la colocación de un papel secante mojado en un contenedor de plástico de dimensiones adecuadas (Figura 25).



Figura 25. Cámara húmeda

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

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



Figura 26. Muestras listas para incubación con el anticuerpo

Tras la incubación de la muestra con el anticuerpo primario, este se retiró y se procedió a realizar dos lavado con TBSA-BSAT de 5 minutos, tras lo cual se procedió a la incubación durante 1:30 minutos con el anticuerpos secundario marcado con un fluoróforo (Alexa 488 Anti-rabbit/goat/mouse IgG) y a la concentración de 1/500 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Se evitó exponer el anticuerpo secundario a la luz solar o debajo de un fluorescente. Se trabajó en un sitio en penumbra para conservar la fluorescencia de anticuerpo secundario. Tras la incubación de la muestra

con el anticuerpo secundario, este se retiró y se procedió a realizar tres lavados con TBSA-BSAT de 5 minutos.

Tras las incubaciones se procedió al montaje de las muestras que consiste en su preservación mediante la colocación de un cubre de cristal entre los que se dispone una gota de solución adhesiva que contiene un marcador de DNA para localizar los núcleos celulares (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI).

6.7. VALORACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS MUESTRAS

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

La captación de fluorescencia de la imagen entendida como la expresión de la proteína estudiada (Ki67, α -SMA, CD31 y TUNEL) se realiza en una habitación en penumbra para evitar pérdida de la fluorescencia. Los pasos a realizar para la captación de la imagen en el rango de la luz verde por utilización de un anticuerpo secundario (Alexa 488 Anti-rabbit/goat/mouse IgG) común a todas las proteínas en estudio fueron los siguientes:

- Seleccionamos el modo **FITC** en el ordenador que hace que el microscopio emita una luz verde. que marca los núcleos en división.
- Seleccionar el objetivo x4 que nos permite buscar la muestra. Una vez encontrada cambiamos al objetivo x 20.
- Enfocamos.
- Aumentamos el tiempo de exposición. Todas las fotos de FITC tienen el mismo tiempo de exposición: 50,9 milisegundos.
- Seleccionamos AUTOFOCUS. Enfoca automáticamente la imagen
- Se toma la foto (Figura 27)

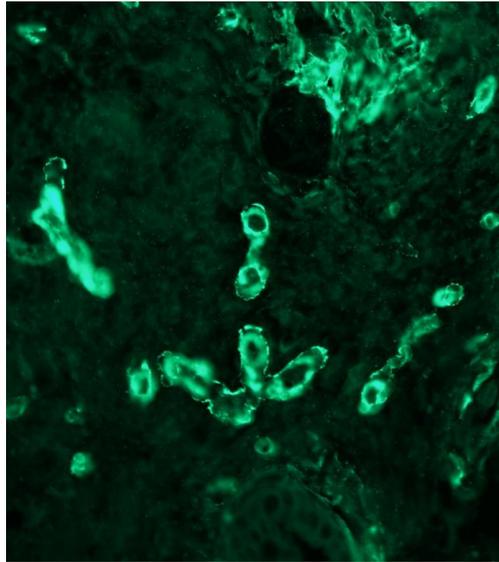


Figura 27. Modo FICT. Núcleos en división

- Cambiamos a modo **DAPI** emite una luz azul que marca todos los núcleos (tanto aquellos que están en división como aquellos que no).
- Bajamos el tiempo de exposición.
- Seleccionamos nuevamente AUTOFOCUS.
- Se toma la foto (Figura 28)

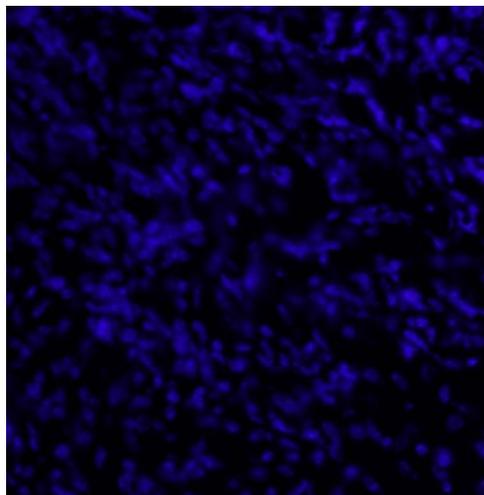


Figura 28. Núcleos de la muestra modo DAPI

- Por último combinamos las imágenes para ser analizadas posteriormente y poder correlacionar la distribución de la expresión en las distintas células de la muestra (Figura 29).

- Guardamos las imágenes en versión *TIFF*.
- La cuantificación de la expresión de los distintos anticuerpos se realizó mediante el software ImageJ versión 1.49 para Windows.

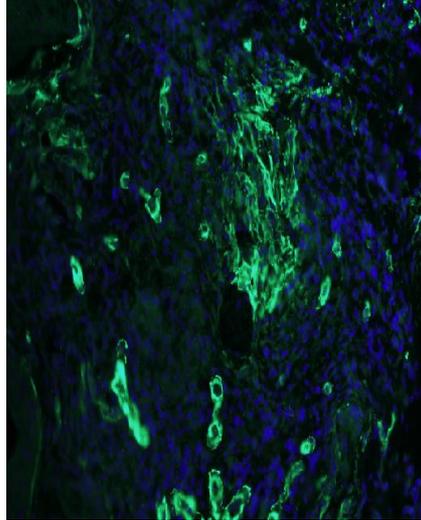


Figura 29. Combinación de ambas lecturas (proteína en estudio y núcleos)

Una vez cuantificada la expresión de las distintas proteínas en estudio (Ki67, α -SMA, CD31 o TUNEL) mediante el software *ImageJ*, realizaremos una *interpolación lineal de Newton* con el objeto de cambiar la escala de los valores obtenidos.

La interpolación lineal estima los valores que toma una función en un intervalo del cual conocemos sus valores extremos $(x_1, f(x_1))$ y $(x_n, f(x_n))$. En nuestro caso el número mínimo y máximo de expresión de cada una de las proteínas estudiadas. Para estimar este valor utilizamos la aproximación a la función $f(x)$ por medio de una recta $r(x)$ (de ahí el nombre de interpolación lineal). La expresión de la interpolación lineal se obtiene del polinomio interpolador de Newton grado uno.

Ordenamos los valores de menor a mayor, siendo x_1 el valor mínimo y x_n el valor máximo de nuestra escala. Asignamos una función en la cual $f(x_1)=0$ y $f(x_n)=100$, para de este modo mediante la aplicación de una interpolación lineal, aplicar el valor $f(x_k)$ a cualquier valor k perteneciente a la muestra, mediante la siguiente formulación:

$f(x_1)=0$ x_1 (valor mínimo)

$f(x_k)=?$ x_k (valor cualquiera)

$f(x_n)=100$ x_n (valor máximo)

$$f(x_k) = f(x_1) + \frac{(x_k - x_1)}{(x_n - x_1)} \cdot (f(x_n) - f(x_1)) \quad \forall k \in (1, \dots, n - 1, n)$$

A continuación mostramos un ejemplo con Ki 67:

$f(x_1)=0$ $x_1=0,021$ (valor mínimo)

$f(x_k)=?$ $x_k=0,24$ (valor cualquiera)

$f(x_n)=100$ $x_n=0,4971$ (valor máximo)

$$f(x_k) = 0 + \frac{(0,24 - 0,021)}{(0,497 - 0,021)} \cdot (100 - 0)$$

$$f(x_k)=49,68\%$$

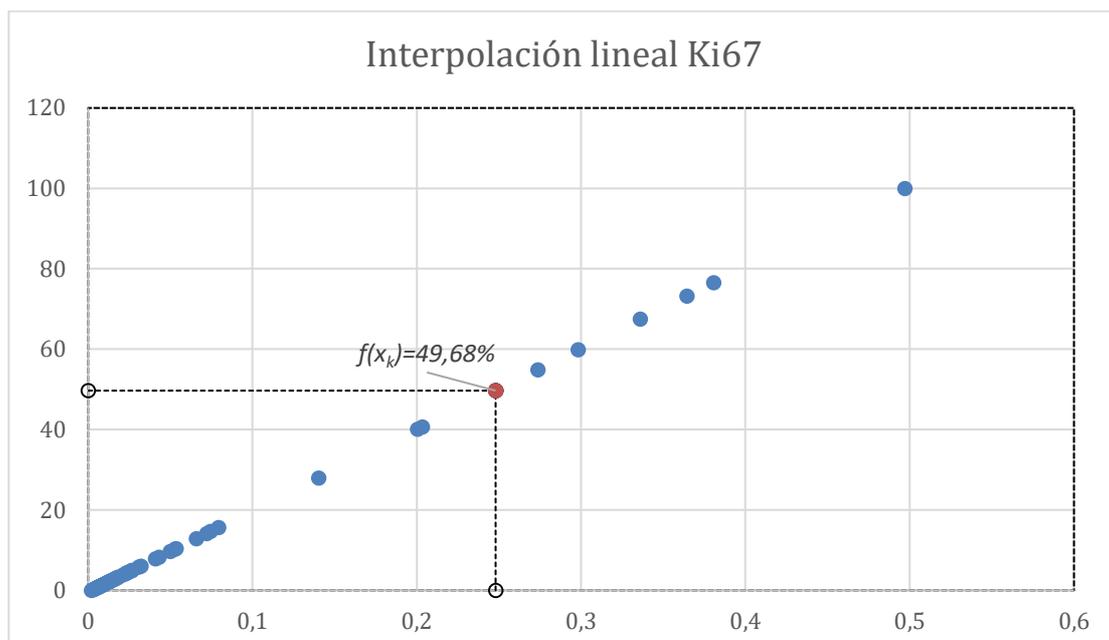


Figura 30. Interpolación lineal de Newton para la expresión de Ki67

Obtenida nuestra escala porcentual correspondiente a la expresión de las proteínas, el principal problema que encontramos a la hora de realizar una escala nominal para la clasificación de la expresión de las distintas proteínas en estudio es la ausencia de una escala concreta para la expresión de las proteínas estudiadas en los adenocarcinoma de páncreas o en los ampulomas.

La expresión de genes y proteínas habitualmente están representados por variables métricas u ordinales. En orden de transformar una variable continua en una decisión clínica es necesario encontrar el punto de corte y estratificar los casos en grupos que nos permitan encontrar el nivel de expresión correspondiente.

De esta forma hemos determinado el punto de corte de expresión de cada proteína estudiada mediante software *Cutoff Finder* versión 2.1 (81,82).

Mediante este software, podemos dividir en dos categorías (baja y alta) la expresión de las proteínas estudiadas en la inmunohistoquímica.

6.7.1. Ki67

Ki67 es una proteína nuclear que está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero este ausente de las células en reposo (G0), lo que la convierte en un excelente marcador para determinar la proliferación celular. (83)

La expresión de Ki67 de al menos 2,97% de las células tumorales de cada muestra ha sido considera como una expresión alta, basándonos en la determinación del punto de corte 0,035 mediante el software *Cutoff Finder*.

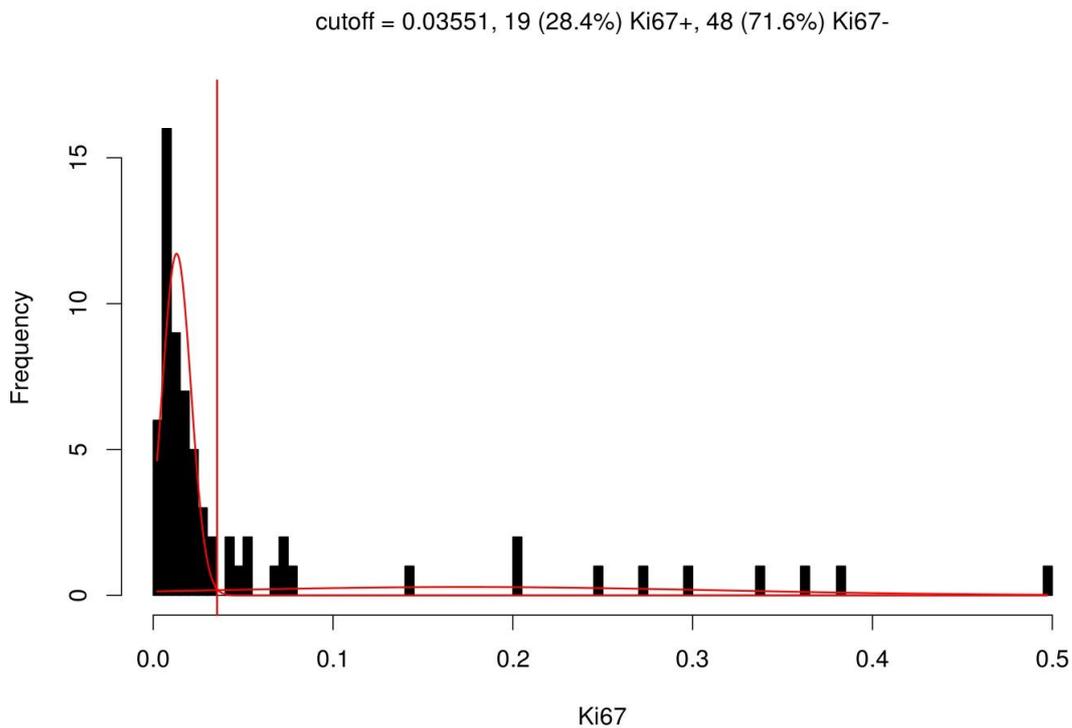


Figura 31. Histograma para Ki67. La barra roja indica el punto de corte para la expresión alta de Ki67

6.7.2. α -SMA

Es una proteína que forma parte del aparato contráctil de las células. Se usa comúnmente como marcador de la formación de mioblastos y fibroblastos. (84)

La expresión de α -SMA de al menos 1,84 % de las células tumorales de cada muestra ha sido considerada como una expresión alta, basándonos en la determinación del punto de corte 0,4687 determinado mediante el software *Cutoff Finder*.

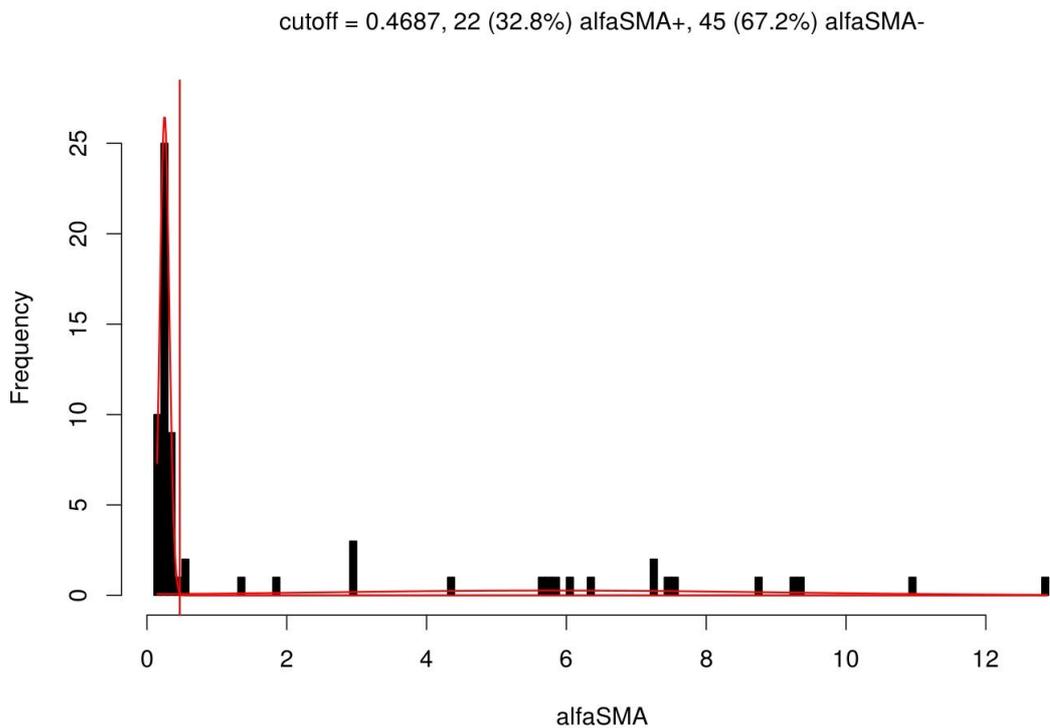


Figura 32. Histograma para α SMA. La barra roja indica el punto de corte para la expresión alta de α SMA.

6.7.3. CD31

Esta proteína se encuentra en las uniones celulares de las células endoteliales por lo que se ha relacionado íntimamente como un marcador de la angiogénesis (85). También se expresa en la superficie de plaquetas, neutrófilos y algunas células T. Es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y es probable que esté implicado en la migración de leucocitos. (86)

La expresión de CD31 de al menos 0,2 % de las células tumorales de cada muestra ha sido considerada como una expresión alta, basándonos en la determinación del punto de corte 0,2347 determinado mediante el software *Cutoff Finder*.

6.7.4. TUNEL

TUNEL es un marcador de la apoptosis. Las células sufren una degradación extensa del ADN durante las últimas etapas de la apoptosis. TUNEL marca los extremos fragmentados de ADN bicatenario (87)

La expresión de TUNEL de al menos 27,11 % de las células tumorales de cada muestra ha sido considerada como una expresión alta, basándonos en la determinación del punto de corte 0,0424 determinado mediante el software *Cutoff Finder*.

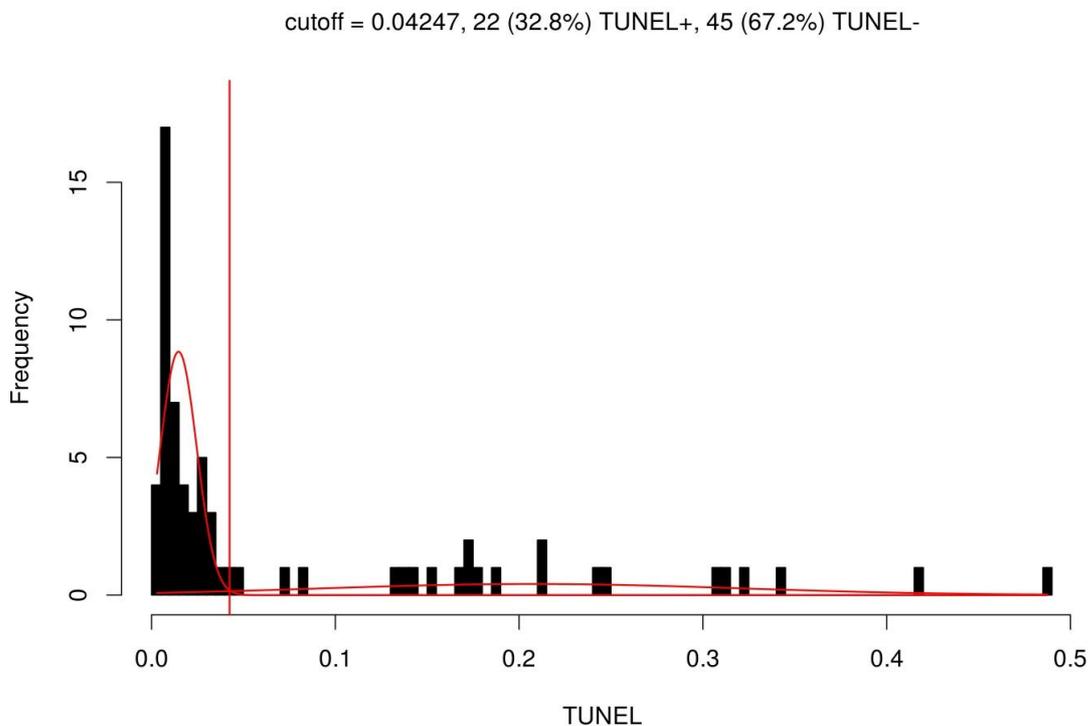


Figura 33. Histograma para TUNEL. La barra roja indica el punto de corte para la expresión alta de TUNEL

7. SOPORTE BIBLIOGRÁFICO

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

Seleccionamos aquellos artículos escritos en español o en inglés independientemente del tipo de estudio y de estatus de publicación.

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

8. TRATAMIENTO INFORMÁTICO

Todos los datos referentes al estudio se trataron en un ordenador PC con microprocesador Intel Core i3-4012Y utilizando el siguiente software:

- *Como sistema operativo: Windows 8*
- *Como procesador de textos: Microsoft Word 2013*
- *Como editor de hojas de cálculo: Microsoft Excel 2013*
- *Como gestor de base de datos: SPSS® versión 21.0 para Windows*
- *Como programas estadísticos para tratamiento y análisis posterior de los datos: SPSS 21.0 para Windows.*

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

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

1. Análisis descriptivo para variables cuantitativas mediante el cálculo de la *media* como medida de tendencia central y la *desviación típica* o *estándar* como medida de dispersión; y para las variables cualitativas mediante el cálculo de porcentajes o *proporciones* (%) e *intervalos de confianza* (IC) al 95% de seguridad.
2. Determinación de la bondad de ajuste a una distribución normal (datos normales) mediante la *prueba de Kolmogorov*. También se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante la *prueba de Levene*. Si las muestras seguían una distribución normal y las varianzas eran homogéneas se aplicaban tests paramétricos, en caso contrario se utilizaban test no paramétricos.
3. Comparación de los valores medios del número de mitosis entre los países, así como entre los diferentes modelos animales (subcutáneo, intraabdominal y pancreático) mediante la *prueba de Kruskal-Wallis* (prueba no paramétrica).

4. Comparación de proporciones en los distintos grupos mediante *pruebas ji-cuadrado* (χ^2) para tablas de contingencia; en el caso de tablas 2 x 2 se utilizó el *estadístico χ^2 con corrección de Yates*, y cuando alguna frecuencia esperada fue menor o igual a 5 se aplicó la prueba exacta de Fisher. En el caso de tablas de 2 x 3 ó 3 x 4 se utilizó el *test exacto de χ^2* cuando alguna frecuencia esperada fue menor o igual a 5. Para el análisis post-hoc se ha aplicado la *corrección de Bonferroni*.
5. Cálculo del tiempo transcurrido hasta la aparición del tumor o tiempo libre de enfermedad mediante la prueba no paramétrica de *Kaplan-Meier*. Comparación entre los tres modelos animales, así como los diferentes pases y el tiempo transcurrido hasta la aparición del tumor mediante el *test de log-Rank*.
6. Cálculo de la progresión del peso en los ratones hasta la semana 10 mediante la prueba no paramétrica *test de Friedman*. Comparación del peso en la semana 10 entre los roedores con y sin desarrollo tumoral mediante la prueba *U de Mann-Whitney* (prueba no paramétrica)

Todos los contrastes de hipótesis fueron bilaterales. Y en todas las pruebas estadísticas se consideran valores “significativos” aquellos cuyo nivel de confianza fue del 95% ($p < 0,05$).

10. ETICA Y LEGISLACIÓN

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

VII. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS IMPLANTES EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES

1.1. RESULTADOS GLOBALES DEL IMPLANTE DEL XENOINJERTO

RESULTADOS AGREGADOS

De los 95 xenoinjertos implantados, 58 (61,1%) se han desarrollado a lo largo de los tres pases (Tabla 5).

El desarrollo en el Pase 0, (desde el humano al ratón) fue significativamente menor ($p=0,000013$) que en los pases consecutivos en los que se realizó el reimplante desde ratón a ratón (pase 1 y pase 2). (Figura 34)

Tabla 5. Tabla de contingencia. Impacto de los pases en el desarrollo del xenoinjerto

		PASES (%)				<i>p</i>
		PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Desarrollo Tumoral GLOBAL	SI	9 (28,1%)	15 (71,4%)	34 (80,9%)	58 (61,1%)	0,000013
	NO	23 (71,9%)	6 (28,6%)	8 (19%)	37 (38,9%)	
	Total	33 (100%)	33 (100%)	29 (100%)	95 (100%)	

Test de exacto de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

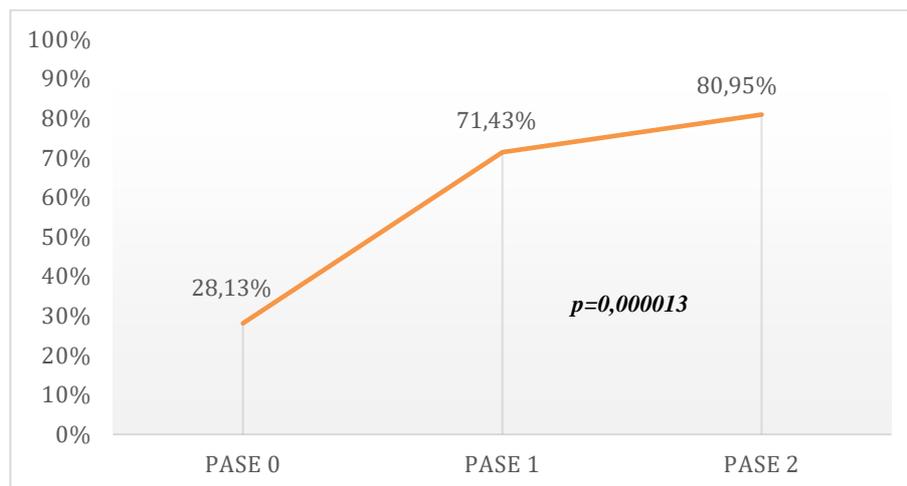


Figura 34. Desarrollo tumoral a lo largo de los pases independiente del modelo murino

De los 11 xenoinjertos procedentes de humanos, 5 desarrollaron tumor en los distintos modelos del ratón, lo que supone que el 45,5% de los tumores humanos se desarrollaron en alguno de los modelos experimentales empleados.

A continuación desglosaremos los resultados globales a los largo de cada pase

PASE 0 (Hx→T₁)

Durante el Pase 0 se han implantado 11 especímenes de cáncer periampular y ADCP procedentes de 10 pacientes diferentes en 32 animales de experimentación (11 subcutáneos, 11 intraabdominales y 10 en el páncreas).

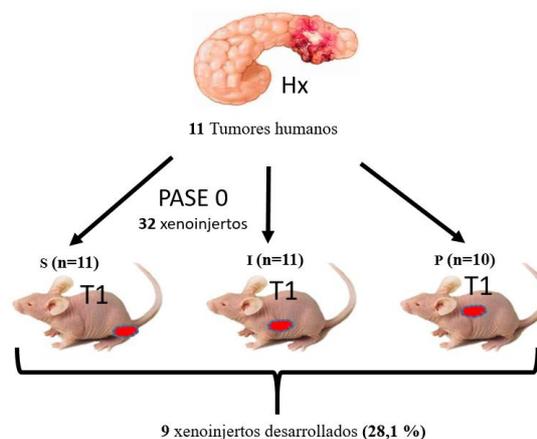


Figura 35. Desarrollo tumoral en el Pase 0; (S): Subcutáneo; (I): Intraabdominal; (P): Páncreas

Todas las muestras fueron obtenidas de tumores primarios, excepto en un caso en el que además de la muestra recogida en el parénquima pancreático, se obtuvo un xenoinjerto de una metástasis ganglionar paraaórtica (humano 4).

Cada tumor extraído de los humanos (n=11), se dividió en tres porciones que se implantaron en los tres modelos descritos, a excepción del *humano 5* que sólo se implantó en dos modelos: subcutáneo e intraabdominal.

De los 32 xenoinjertos humanos implantados en el Pase 0, nueve (28,1%) se han desarrollado en el ratón independientemente del modelo (Figura 35).

PASE 1(T₁→T₂)

De los 9 xenoinjertos extraídos, sólo se reimplantaron 7 debido a que el éxito inesperado de dos ratones hizo que pasaran varias horas desde el fallecimiento hasta la autopsia haciendo inviable el reimplante de los xenoinjertos. Cada uno de los 7 xenoinjertos extraídos de los ratones T1 se dividió nuevamente en tres porciones que se implantaron en los tres modelos. De esta forma se reimplantaron 21 xenoinjertos en el pase 1. (7 subcutáneos, 7 intraabdominales y 7 en el páncreas).

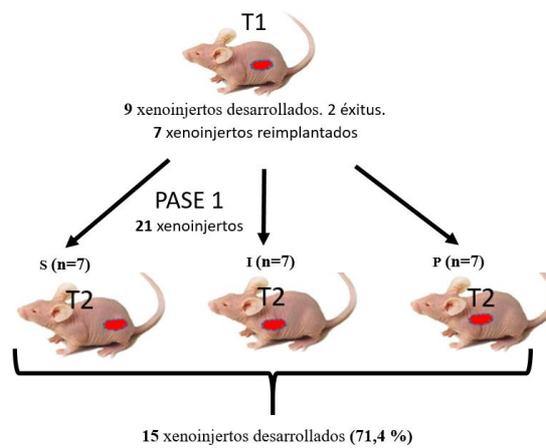


Figura 36. Desarrollo tumoral en el Pase 1. (S): Subcutáneo; (I): Intraabdominal; (P): Páncreas

De los 21 xenoinjertos extraídos de los ratones T1, 15 (71,4%) se han desarrollado en el ratón T2 independientemente del modelo aplicado (Figura 36).

PASE 2 (T₂→T₃)

Cada uno de los 15 xenoinjertos extraídos de los ratones T2 se dividió nuevamente en tres porciones y se reimplantaron en los tres modelos a excepción de los xenoinjertos procedentes de los ratones T2.S.P.1; T2.S.S.4A y T2.P.S.4A que sólo se implantaron en dos modelos: subcutáneo e intraabdominal. De esta forma, se implantaron 42 xenoinjertos en el Pase 2 (15 subcutáneos, 15 intraabdominales y 12 en el páncreas).

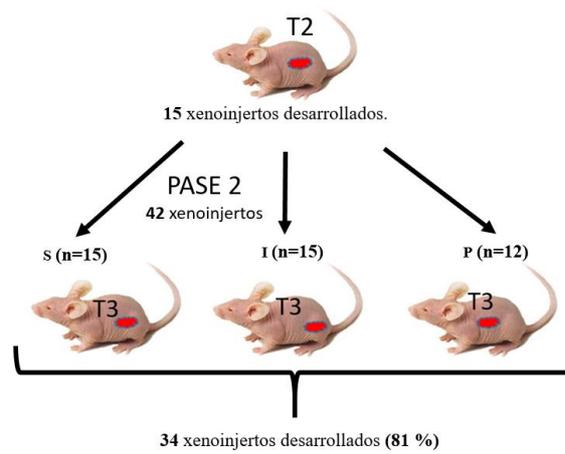


Figura 37. Desarrollo tumoral en el Pase 2. (S): Subcutáneo; (I): Intraabdominal; (P): Páncreas

De los 42 xenoinjertos extraídos de los ratones T2, treinta y cuatro (81%) se han desarrollado en el ratón T3 independientemente del modelo. Tras el sacrificio de los ratones T3 no se realizaron nuevos reimplantes.

P0: 28,1% P1: 71,4% P2: 81%

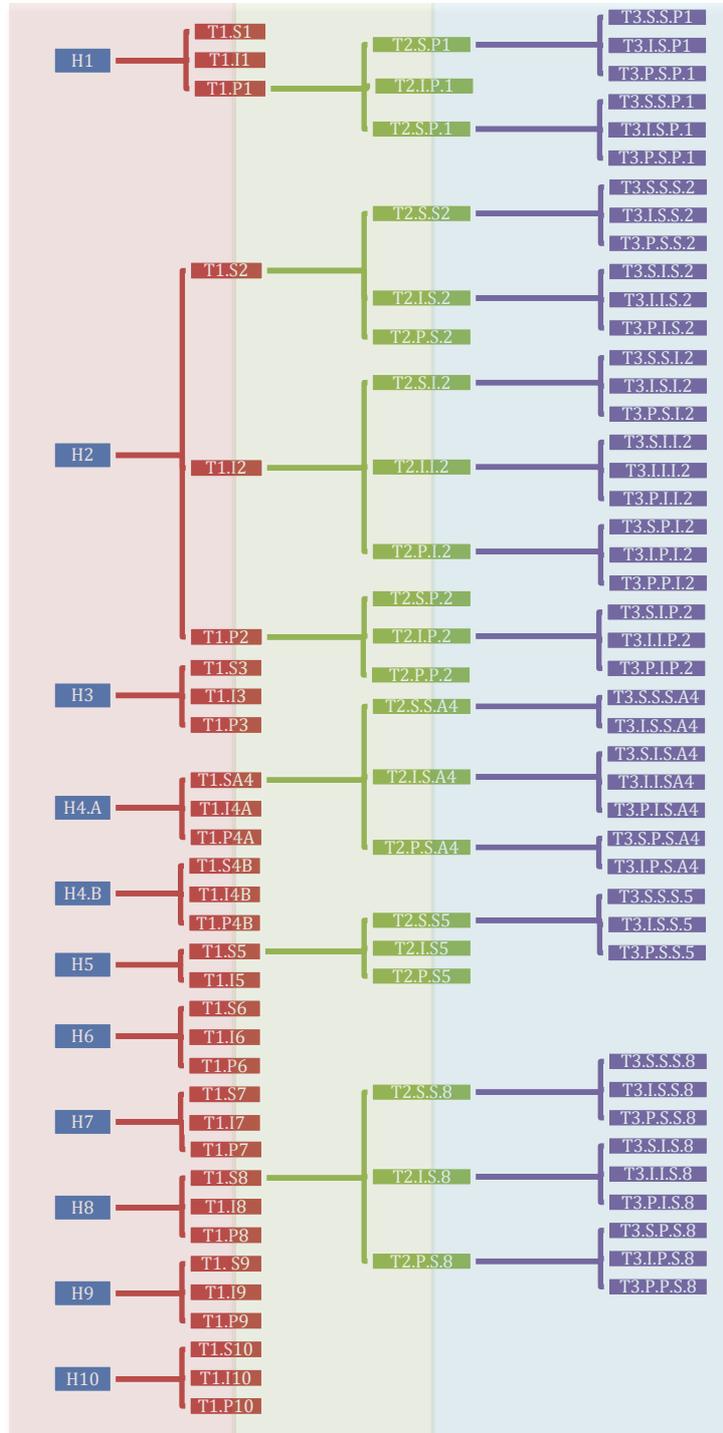


Figura 38. Ratones implantados a lo largo de los tres pases

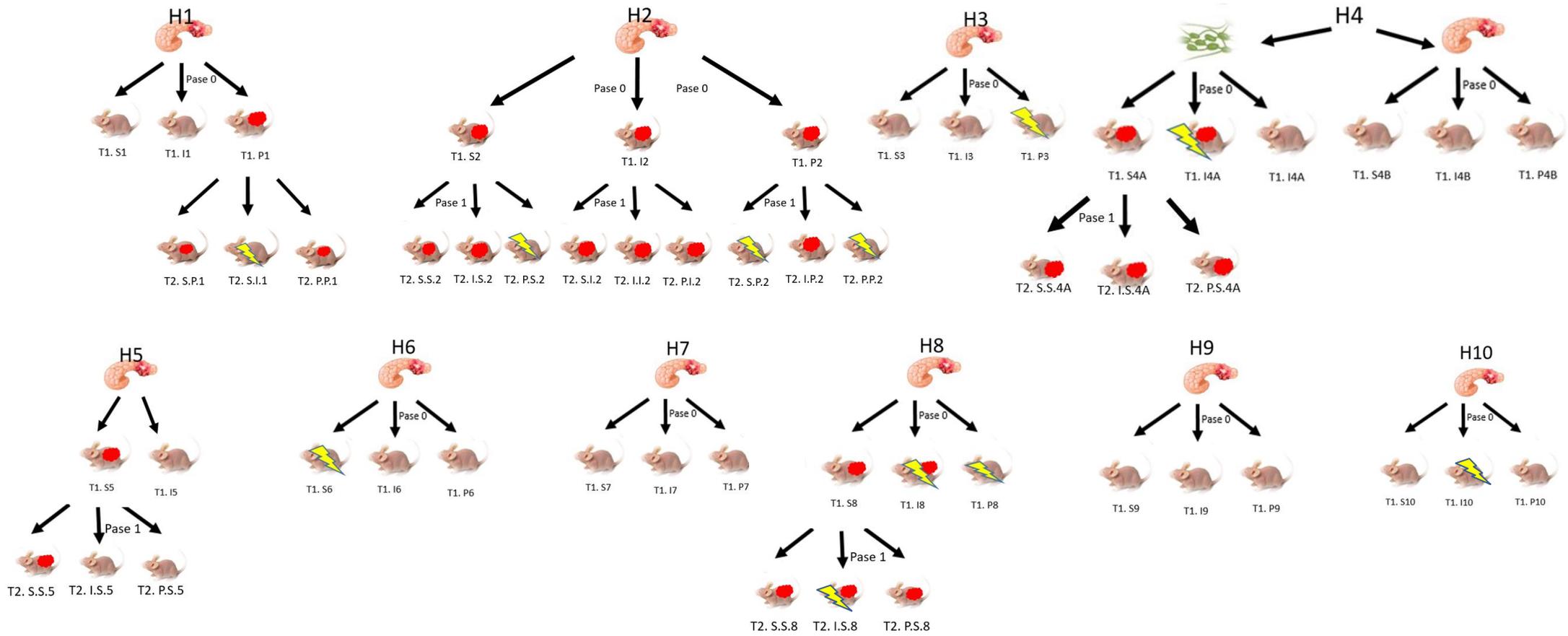


Figura 39. *Desarrollo tumoral en el Pase 0 y el Pase 1. Punto rojo: indica los ratones en los que crecieron tumor. Rayo amarillo: indica los éxitos no esperados.*

1.2. MORTALIDAD

La ***mortalidad global*** en la serie de los 95 ratones a los que se les implantó un xenoinjerto fue del 13,6% (13/95).

La ***mortalidad postoperatoria*** fue del 4,2% (4/95). Se correspondieron con (Tabla 6):

1. Un caso en el que no se objetivó causa de la muerte y que se produjo a los tres días del implante (ratón T2.S.P.2) por lo que la causa más probable de la muerte fue una sepsis.
2. Un caso por sobredosificación de anestesia (ratón T2.P.P.2).
3. Una peritonitis por una enterotomía desapercibida en la que el ratón falleció a las tres semanas (ratón T2.P.S.2).
4. Un caso de evisceración en el que el ratón se comió las suturas de la laparotomía (ratón T2.I.P.1).

Todos los casos de mortalidad postoperatoria se produjeron en el Pase 1. Se correspondieron con un modelo subcutáneo, dos pancreático y uno intraabdominal.

Tabla 6. *Mortalidad postoperatoria*

<i>Ratón</i>	<i>Supervivencia</i>	<i>Causa de la muerte</i>	<i>Pase</i>	<i>Modelo</i>
T2.S.P.2	3 días	Sepsis	Pase 1	Subcutáneo
T2.P.P.2	1 días	Anestésico local	Pase 1	Páncreas
T2.P.S.2	3 semanas	Peritonitis sin tumor	Pase 1	Páncreas
T2.I.P.1	1 día	Eviscerado	Pase 1	Intraabdominal

1.2.1. Análisis de la Mortalidad por pases

En el análisis global por pases se evidenciaron 6 casos en el *Pase 0* (6,32%), cinco casos en el *Pase 1* (5,26%) y dos casos en el *Pase 2* (2,11%). (Figura 40).

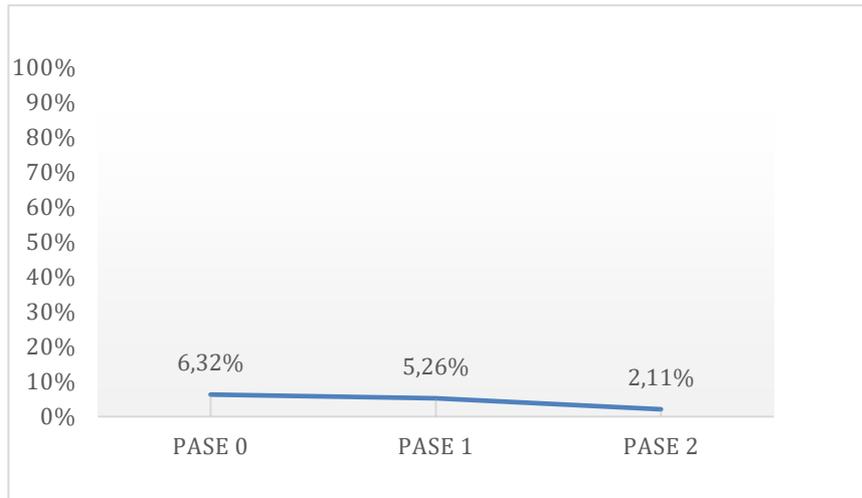


Figura 40. Mortalidad global a lo largo de los pases

La mortalidad dentro de cada pase fue del 18,8% (6/32) en el Pase 0, 23,8% (5/21) en el Pase 1 y del 4,8% (2/42) en el Pase 2. Aunque no se observaron diferencias significativas la “p” fue menor de 0,1 ($p=0,069$), lo que sugiere que existe una tendencia a disminuir la mortalidad a medida que avanzan los pases. (Tabla 7 y Figura 41).

Tabla 7. Tabla de contingencia. Impacto de la mortalidad a lo largo de los pases

Pases (%)		Mortalidad			p
		SI	NO	TOTAL	
Pases (%)	Pase 0	6(18,8%)	26(81,2%)	32 (100%)	0,069
	Pase 1	5(23,8%)	16(76,2%)	21 (100%)	
	Pase 2	2(4,8%)	40(95,2%)	42 (100%)	
	Total	13	82	95	

El valor de la “p” fue generado a partir del Test de χ^2 . Se alcanza la significación estadística con una $p<0,05$.

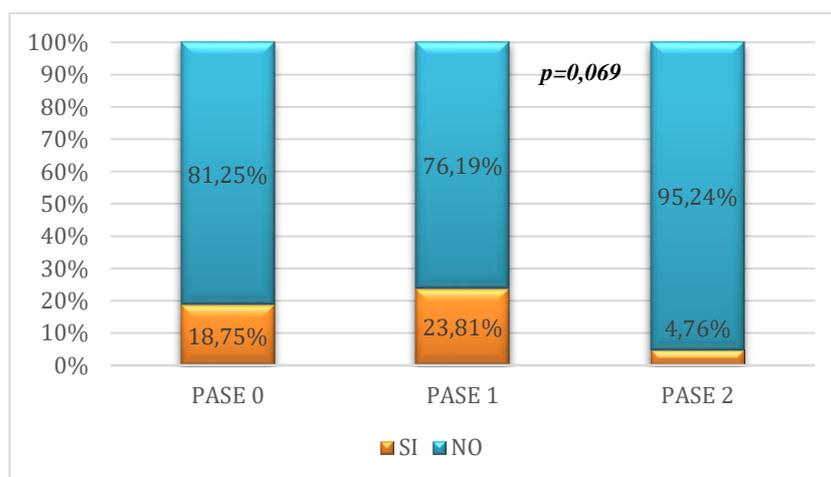


Figura 41. Mortalidad en cada pase. *Color naranja: expresa los ratones que fueron éxitos de forma espontánea. *Color azul: expresa los ratones que han sido sacrificados.

1.3. TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD

El tiempo medio libre de tumor fue de $22 (\pm 1,62)$ semanas con un IC al 95% (19,2-25,5). La mediana se sitúa en la semana 15 con un rango intercuartílico (8,4-26,1). (Tabla 8). Se observa que el 50% de los murinos permanecen sin evidencias de tumor a las 15 semanas. (Figura 42).

En la semana 20 han crecido el 89% ($n=52$) de todos los xenoinjertos que desarrollarán tumor y la probabilidad de que el resto de implantes se desarrolle es escasa a partir de esta semana. En esta semana permanecen libres de enfermedad el 41,2% ($\pm 5,3\%$) de todos los ratones implantados.

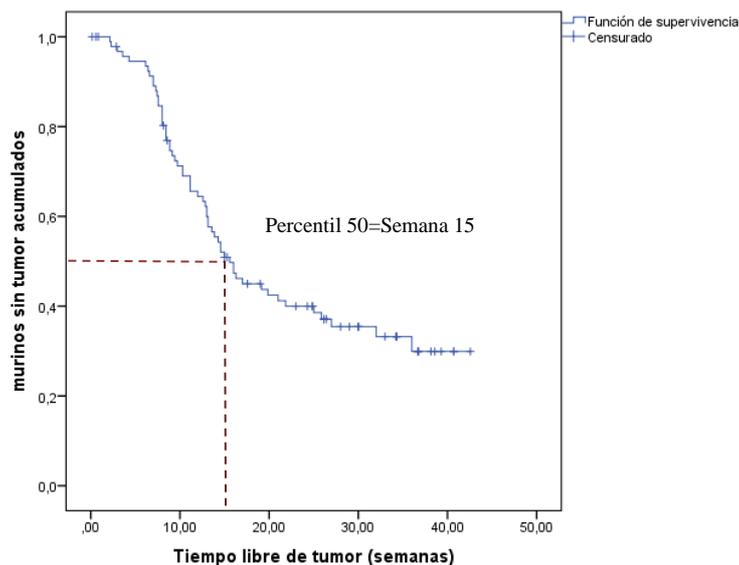


Figura 42. Test de Kaplan-Meier. Tiempo libre de tumor

1.3.1. Tiempo libre de enfermedad en los Pases

La mediana del tiempo libre de tumor en el Pase 0 fue de 26 semanas respecto al Pase 1 y el Pase 2 en los que se observó un desarrollo tumoral más precoz (mediana 11 y 9 semanas respectivamente). (Tabla 8)

En el Pase 0 a las 15 semanas el 84,2% ($\pm 6,5\%$) de los ratones injertados permanecen sin desarrollo tumoral. Sin embargo, a las 15 semanas tan solo un 29,4% ($\pm 11,1\%$) y un 34% ($\pm 7,3\%$) de los ratones implantados en el Pase 1 y en el Pase 2 permanecen libres de

tumor, respectivamente. Se observa un desarrollo tumoral más rápido y mayor número de casos en los pases entre ratón-ratón (Pase 1 y Pase 2), respecto al pase entre humano-ratón (Pase 0) con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,000004$). (Figura 43)

Tabla 8. Media y Mediana del tiempo libre de enfermedad en los tres pases

Implantes	MEDIA				MEDIANA		
	Estimación	Error estándar	IC 95%		Estimación	Rango intercuartílico	
			Límite Inferior	Límite Superior		Percentil 25	Percentil 75
Pase 0	33,67	2,52	28,73	38,62	26,14	16	32,50
Pase 1	15,50	1,85	11,86	19,14	11,14	8,43	14,57
Pase 2	16,09	1,86	12,43	19,74	9,71	7,57	19,14
GLOBAL	22,40	1,613	19,23	25,56	15,57	8,43	26,14

La estimación está limitada al tiempo de ausencia de tumor más largo, si esta censurado

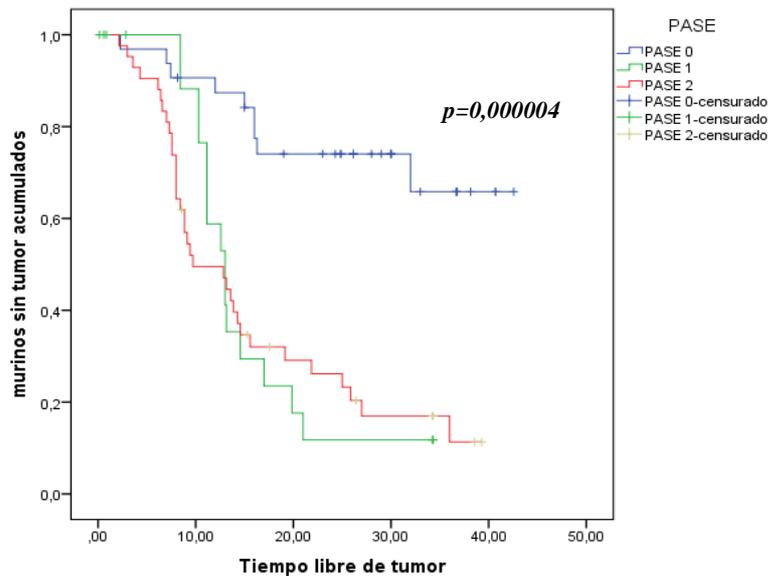


Figura 43. Test de Kaplan-Meier. Tiempo libre de tumor por pase

1.4. IMPACTO DEL PORCENTAJE DE GANANCIA DE PESO EN EL MURINO

En la semana 10 los ratones que desarrollan tumor presentaron una ganancia media de peso del $20,38 \pm 3,51$ % (IC al 95%=13,2-27,56) respecto a los ratones que no desarrollan tumor que presentaron una ganancia media de peso del $11,51 \pm 2,38$ % (IC al 95%=6,63-11,51). (Tabla 9)

Tabla 9. Resumen descriptivo del % de ganancia de pesos en la semana 10.

% Ganancia de peso 10 semana	Desarrollo tumoral	
	SI	NO
Media	20,38±3,51	11,51± 2,38
Desv. típ.	19,90	13,07
Mediana	17,54	8,52
Percentil 25	11,48	4,45
Percentil 75	22,52	15,55

Tras correlacionar el porcentaje de ganancia de pesos en la semana 10 con el desarrollo tumoral mediante el *test no paramétrico de la U de Mann Whitney* observamos una mayor ganancia de peso a favor de los ratones con desarrollo de tumor existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,021$). (Figura 44)

Es decir, en la semana 10, los ratones que desarrollan tumor presentan un 8,87% más de ganancia de peso respecto a los que no lo desarrollan.

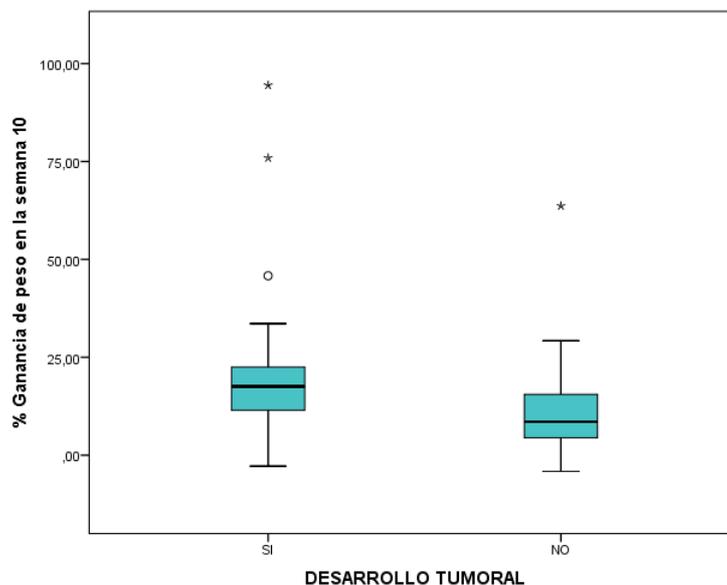


Figura 44. Mediana de la ganancia de peso en la semana 10 en función del desarrollo tumoral

1.5. FACTORES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO TUMORAL

1.5.1. Impacto de las características clínicas y epidemiológicas del humano en el desarrollo tumoral

Se ha analizado la probabilidad de que una determinada característica de los pacientes estuviera relacionada o no con el implante exitoso en ratones (Tabla 10). Nuestro análisis no identificó una correlación entre la tasa de implante con la edad o el sexo del paciente, el estadio tumoral, la localización del tumor (cabeza, cuerpo o la cola del páncreas o metástasis), presencia de ganglios linfáticos, metástasis a distancia o invasión perineural.

Los dos únicos tumores humanos con una anatomía patológica de adenocarcinoma ampular (H2 y H8) y los xenoinjertos derivados de los mismos presentan una tasa de desarrollo tumoral muy elevada, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas respecto al ADCP.

Tabla 10. Impacto de las características clínicas en el desarrollo del xenoinjerto en el ratón

VARIABLES	Nº de Pacientes	Generan tumores (%)	Impacto de las características clínicas
Edad			
<70 años	2	0 (0%)	p=0,444
≥70 años	8	5 (62,5%)	
Sexo			
Hombre	5	2 (40%)	p=1,0000
Mujer	5	3 (60%)	
Anatomía Patológica			
ADCP	9	3 (33,3%)	p=0,18
Ampuloma	2	2 (100%)	
Histología			
G1	0	0	No es posible su aplicación
G2+G3	10	5 (50%)	
. Estadio			
≤Estadio I o II	7	2 (28,6%)	p=0,16
>Estadio III o IV	3	3 (100%)	
Localización del tumor			
Cabeza	8	4 (50%)	p=0,3
Cola	1	0 (0%)	
Metástasis	1	1 (100%)	
Invasión Perineural			
Si	3	1 (33,3%)	p=1,0000
No	7	4 (57,1%)	
Metástasis ganglionares			
Si	6	3 (50%)	p=1,0000
No	4	2 (50%)	
Metástasis a distancia			
Si	2	1 (50%)	P=1,00000
No	8	4 (50%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

1.5.2. Impacto de la anatomía patológica y de la inmunohistoquímica de las muestras humanas en el desarrollo tumoral.

Se ha analizado la probabilidad de que una determinada característica de la anatomía patológica (grado de diferenciación, fibrosis, número de mitosis) o de la inmunohistoquímica (Ki67, α -SMA, CD31 o TUNEL) de las muestras humanas estuviera relacionada o no con el desarrollo exitoso del xenoinjerto en ratones. (Tabla 11)

Tabla 11. Impacto de las características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas de la muestra humana en el desarrollo del xenoinjerto en el ratón

VARIABLES	Nº de Muestras humanas	Generan tumores (%)	Impacto
ANATOMÍA PATOLÓGICA			
H&E* (Diferenciación)			
Bien	2	0 (0%)	p=0,45
Moderado	8	4 (50%)	
Indiferenciado	1	1(100%)	
Masson (Fibrosis)			
Leve	4	3 (75%)	p=0,24
Moderado	3	1 (33,3%)	
Elevado	1	1 (100%)	
Muy elevado	3	0	
Nº mitosis (Proliferación)			
0	4	0 (0%)	p=0,24
1	1	1 (20%)	
2	3	1 (20%)	
3	2	2 (40%)	
4	1	1 (20%)	
INMUNOHISTOQUÍMICA			
Ki67 (Proliferación)			
Baja	4	1 (25%)	p=0,54
Alta	7	4 (57,1%)	
AlfaSMA(Fibrogénesis)			
Baja	0	0 (0%)	No es posible su aplicación
Alta	11	5 (45,4%)	
CD31(Angiogénesis)			
Baja	2	1 (50%)	p=0,72
Alta	9	4 (44,4%)	
TUNEL (Apoptosis)			
Baja	3	1 (33,3%)	p=0,54
Alta	8	4 (50%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el desarrollo tumoral en los murinos y las características anatomopatológicas estudiadas en las

muestras humanas. Tampoco hemos observado diferencias significativas en relación con la expresión de las proteínas estudiadas en la inmunohistoquímica.

1.6. RESULTADOS SEGÚN EL MODELO EXPERIMENTAL

1.6.1. Resultados en el modelo subcutáneo

En el modelo subcutáneo se han implantado 33 xenoinjertos de los cuales se han desarrollado 23 tumores (69,9%) (Tabla 12 y Figura 45). Se observa un aumento significativo de los tumores desarrollados en este modelo a medida que avanzan los pases. En el P0 tan sólo 36,4% de los ratones implantados han desarrollado el tumor (4/11), mientras que en el P1 y P2 el 85,7% y el 86,6% desarrollaron tumor ($p=0,01$).

Tabla 12. Tabla de contingencia. Impacto de los pases en el desarrollo del xenoinjerto subcutáneo

		PASES (%)				p
		PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Desarrollo Tumoral SUBCUTANEO	SI	4 (36,4%)	6 (85,7%)	13 (86,7%)	23 (69,7%)	0,010
	NO	7 (71,9%)	1 (14,3%)	2 (13,3%)	10 (30,3%)	
	Total	11 (100%)	7 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	

Test de exacto de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,0166$

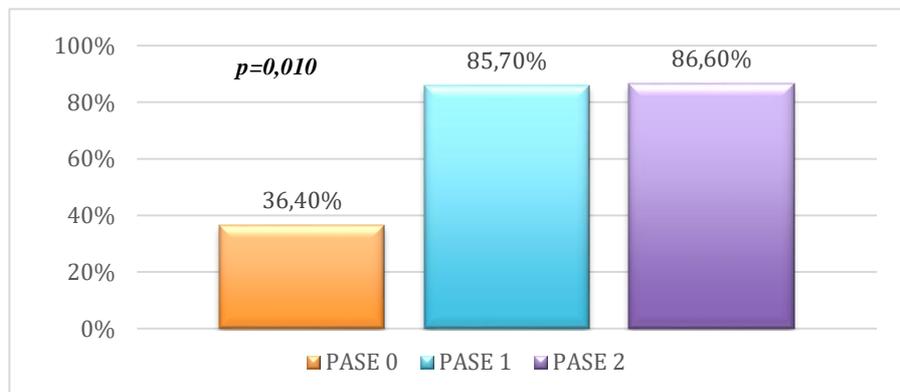


Figura 45. Desarrollo de los injertos en el modelo subcutáneo

1.6.2. Resultados en el modelo intraabdominal

En el modelo intraabdominal se han implantado 34 xenoinjertos de los cuales se han desarrollado 19 tumores (57,6%). (Tabla 13).

Nuevamente se aprecian un aumento de los xenoinjertos a medida que avanzan los pases. Aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, se encuentra muy próximo a la significación. En P0 tan sólo 27,2% de los ratones implantados han desarrollado el tumor (3/11), mientras que en el P1 y P2 el 71,4% y el 73,3% desarrollaron tumor ($p=0,058$). (Tabla 13 y Figura 46).

Tabla 13. Tabla de contingencia. Impacto de los pases en el desarrollo del xenoinjerto intraabdominal

		PASES (%)				p
		PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Desarrollo Tumoral INTRAABDOMINAL	SI	3 (27,3%)	5 (71,4%)	11 (73,3%)	19 (57,6%)	0,058
	NO	8 (72,7%)	2 (28,6%)	4 (26,7%)	14 (42,4%)	
	Total	11 (100%)	7 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	

Test de exacto de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,0166$

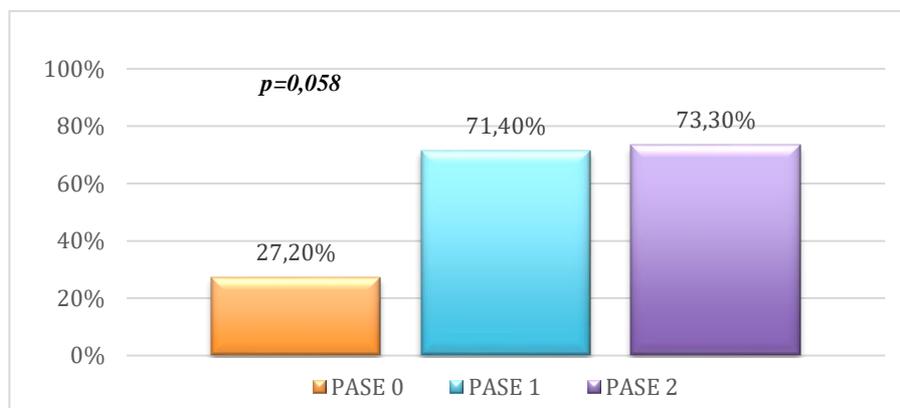


Figura 46. Desarrollo de los injertos en el modelo intraabdominal

1.6.3. Resultados en el modelo pancreático

En el modelo pancreático se han implantado 29 xenoinjertos de los cuales se han desarrollado 16 tumores (55%). (Figura 47).

En este modelo se aprecia un aumento significativo del desarrollo tumoral a medida que avanzan los pases. En P0 sólo 20% de los ratones implantados han desarrollado tumor (2/11), mientras que en el P1 y P2 el 57,1% y el 83,3% desarrollaron tumor ($p=0,009$). (Tabla 14 y Figura 47).

Tabla 14. Tabla de contingencia. Impacto de los pases en el desarrollo del xenoinjerto pancreático.

		PASES (%)				p
		PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Desarrollo Tumoral PÁNCREAS	SI	2 (20%)	4 (57,1%)	10 (83,3%)	16 (55,2)	0,009
	NO	8 (80%)	3 (42,9%)	2 (16,7%)	13 (44,8%)	
	Total	11 (100%)	7 (100%)	12 (100%)	29 (100%)	

Test de exacto de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,0166$

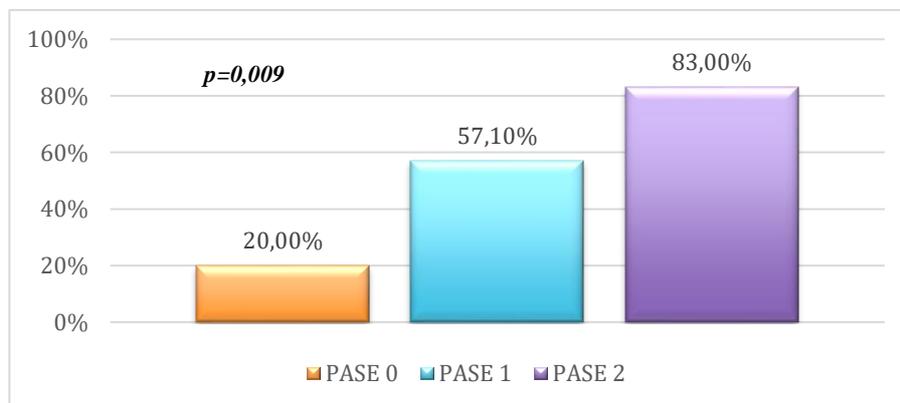


Figura 47. Desarrollo del modelo pancreático

1.7. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL DESARROLLO TUMORAL EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES

El análisis global el número de injertos desarrollados en los tres modelos evidenció que el modelo subcutáneo es el más prolífico (69% de los tumores injertados) seguido por el modelo intraabdominal (57,6% desarrollaron tumor) y el modelo pancreático (55% desarrollo tumor).

Aunque el modelo subcutáneo es el más desarrollado en los murinos no apreciamos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,443$). (Figura 48 y Tabla 15)

Tabla 15. Tabla de contingencia. Impacto de los modelos animales en el desarrollo del xenoinjerto.

		Modelos Experimentales (%)				p
		SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PANCREAS	TOTAL	
Desarrollo Tumoral GLOBAL	SI	23 (69,6%)	19 (57,6%)	16 (55%)	58 (61,1)	0,443
	NO	10 (30,3%)	14 (42,4%)	12 (41,4%)	37 (38,9%)	
	Total	33 (100%)	33 (100%)	29 (100%)	95 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de χ^2 .

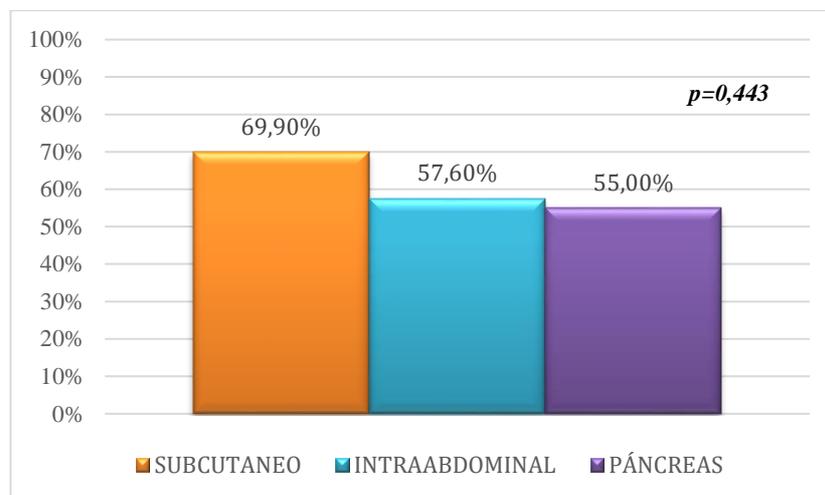


Figura 48. Desarrollo global de los xenoinjertos en los tres modelos animales

1.7.1. Análisis comparativo del desarrollo tumoral por pase y modelo

El análisis del desarrollo tumoral por pase y modelo animal, nuevamente evidencia una tendencia hacia un mayor desarrollo del modelo subcutáneo. Sin embargo no existen diferencias estadísticamente significativas a favor del desarrollo tumoral de este modelo con respecto a los otros dos. (Figura 49 y Figura 50). Se observa en todos los modelos un

aumento progresivo de los injertos desarrollados a medida que avanzan los pases. (Tabla 16)

Tabla 16. Análisis del desarrollo de los xenoinjertos en los tres modelos a lo largo de los pases

VARIABLES (Modelos)	Nº total de xenoinjertos implantados	Nº xenoinjertos desarrollados (%)	Impacto
PASE 0			
Subcutáneo	11	4 (36,4%)	p=0,63
Intraabdominal	11	3 (27,3%)	
Páncreas	10	2(20%)	
PASE 1			
Subcutáneo	7	6 (85,7%)	p=0,49
Intraabdominal	7	4 (71,4%)	
Páncreas	7	4 (57,1%)	
PASE 2			
Subcutáneo	15	13 (86,6%)	p=0,17
Intraabdominal	11	11 (73,3%)	
Páncreas	10	10 (83,3%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,0166$

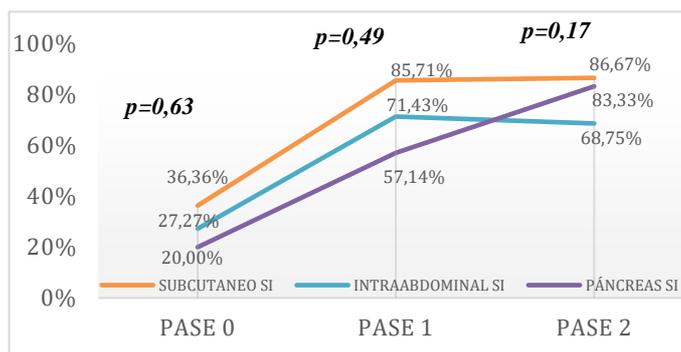


Figura 49. Desarrollo tumoral de los tres modelos a lo largo de los pases

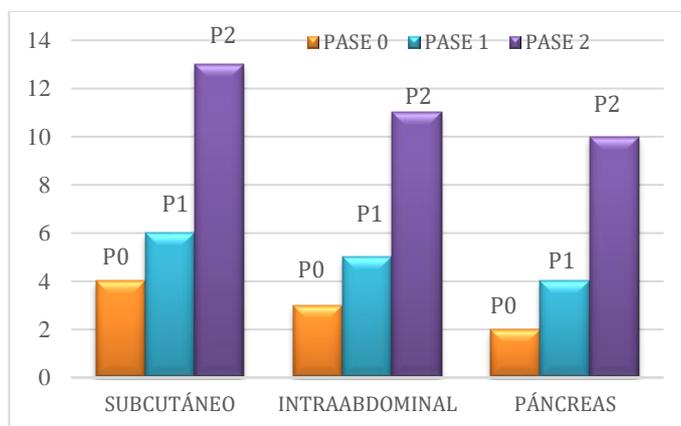


Figura 50. Desarrollo tumoral en los tres modelos

Como resumen del **apartado 1.5.** podemos decir que a medida que avanzan los pases se aprecia un aumento progresivo de la tasa de implante exitosos en los tres modelos experimentales. A pesar de que no existe significación estadística para el desarrollo de un modelo a lo largo de los distintos pases se observa una mayor tendencia en el desarrollo del xenoinjerto tumoral en el modelo subcutáneo. (Figura 51).

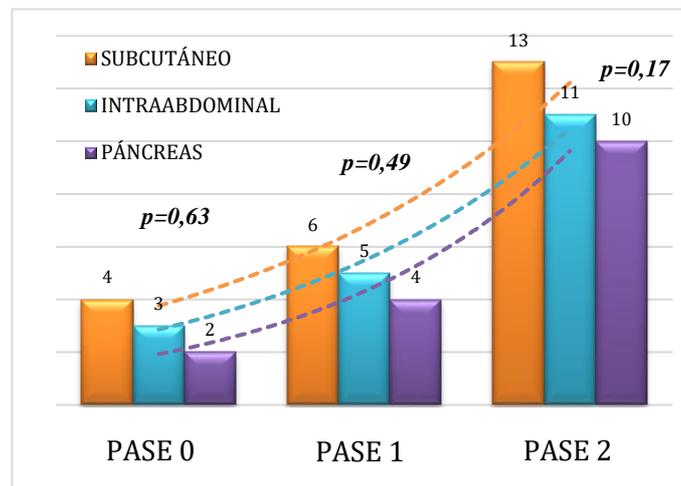


Figura 51. Desarrollo tumoral en los tres modelos a lo largo de los pases

1.7.2. Mortalidad por modelo animal

Hemos apreciado una *mortalidad global* para los modelos subcutáneos del 3,16% (3/95), del 5,26% en modelos intraabdominales (5/95) y del 5,26% en los xenoinjertos pancreáticos (5/95). (Figura 52).

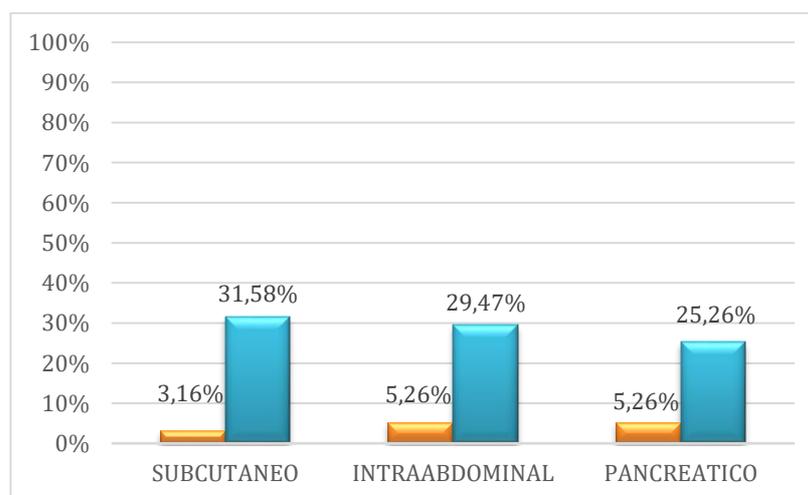


Figura 52. Mortalidad global en los tres modelos animales desarrollados. *Naranja: Ratones que fueron éxitos de forma espontánea. *Azul: Ratones que han sido sacrificados

También se ha analizado la *mortalidad dentro de cada modelo* apreciando una mortalidad del 9,1% en el modelo subcutáneo (3/33), 15,2% en el modelo intraabdominal (5/33) y 17,2% en el modelo pancreático (5/29). (Figura 53).

El modelo pancreático seguido del intraabdominal es el que presenta mayor mortalidad, aunque tras aplicar el *test exacto de χ^2* no hemos apreciado una mayor mortalidad en ninguno de los tres modelos (Tabla 17).

Tabla 17. Tabla de contingencia. Impacto de la mortalidad en los tres modelos animales desarrollados

Modelos (%)		Mortalidad			p
		SI	NO	TOTAL	
	Subcutáneo	3 (9,1%)	30 (90,9%)	33 (100%)	0,619
	Intraabdominal	5 (15,2%)	28 (84,8%)	33 (100%)	
	Pancreático	5 (17,2%)	24 (82,8%)	29 (100%)	
	Total	13 (13,6%)	82 (86,3%)	95 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test exacto de χ^2

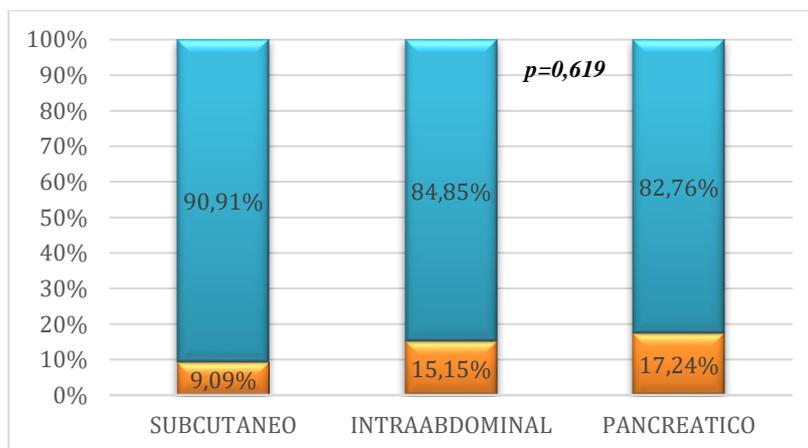


Figura 53. Mortalidad dentro de cada modelo animal. *Naranja: Ratones que fueron éxitos de forma espontánea.

*Azul: Ratones que han sido sacrificados.

A continuación se describen las causas de mortalidad por modelos:

Tabla 18. Mortalidad en el modelo subcutáneo

Ratón	Supervivencia	Causa de la muerte	Pase
T1.S6	19 semanas	Desconocida	Pase 0
T2.S.P.2	5 días	Sepsis	Pase 1
T3.S.I.4A	14 semanas	Desconocida	Pase 2

Tabla 19. Mortalidad en el modelo intraabdominal

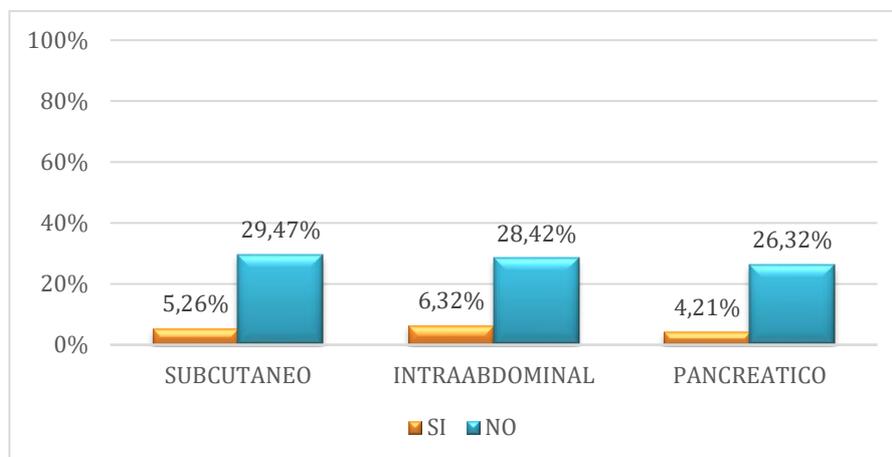
<i>Ratón</i>	<i>Supervivencia</i>	<i>Causa de la muerte</i>	<i>Pase</i>
T1.I4A	3 semanas	Peritonitis con tumor	Pase 0
T1.I.8	8 semanas	Desconocida	Pase 0
T1.I.10	15 semanas	Desconocida	Pase 0
T2.S.I.1	1 día	Eviscerado	Pase 1
T3.I.P.S.8	9 semanas	Peritonitis con tumor	Pase 2

Tabla 20. Mortalidad en el modelo pancreático

<i>Ratón</i>	<i>Supervivencia</i>	<i>Causa de la muerte</i>	<i>Pase</i>
T1.P3	5 semanas	Peritonitis sin tumor	Pase 0
T2.P.P.2	1 días	Anestésico local	Pase 1
T2.P.S.2	3 semanas	Peritonitis sin tumor	Pase 1
T1.I.8	5 semanas	Desconocida	Pase 0
T2.P.S.8	6 semanas	Peritonitis con tumor	Pase 1

1.7.3. Morbilidad

Hemos apreciado una *morbilidad global* para los modelos subcutáneos del 5,26% (5/95), del 6,32% en modelos intraabdominales (6/95) y del 4,21% en los xenoinjertos pancreáticos (4/95). (Figura 54).

**Figura 54.** Morbilidad global en cada modelo animal. *Naranja: Ratones que fueron éxitos de forma espontánea.

*Azul: Ratones que han sido sacrificados.

Hemos valorado la infección del sitio quirúrgico, la infección intraabdominal o peritonitis, la hemorragia, la sepsis, la aparición de ascitis o úlceras, la sobredosis y la dehiscencia de la laparotomía media o subcostal (Figura 55).



Figura 55. Morbilidad

También se ha analizado la *morbilidad dentro de cada modelo* apreciando una morbilidad del 15,15% en el modelo subcutáneo (5/33), 18,82% en el modelo intraabdominal (6/33) y 13,79% en el modelo pancreático (4/29). (Figura 56).

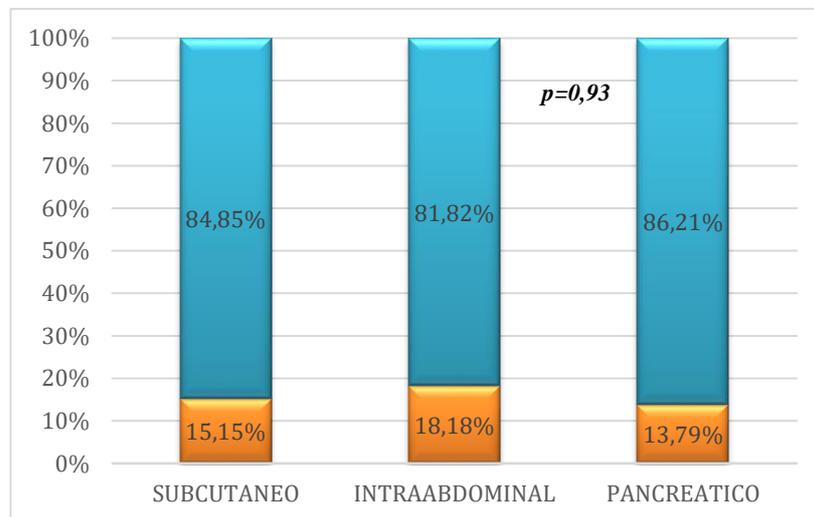


Figura 56. Morbilidad por modelo animal. *Naranja: Ratones que fueron éxito de forma espontánea. *Azul: Ratones que han sido sacrificados.

Tras aplicar el *test exacto de χ^2* , no hemos apreciado una mayor morbilidad en ninguno de los tres modelos, no existiendo diferencia estadísticamente significativa en favor de ningún modelo. (Tabla 21).

Tabla 21. Tabla de contingencia. Impacto de la morbilidad en los tres modelos animales desarrollados

Modelos (%)		Morbilidad			p
		SI	NO	TOTAL	
	Subcutáneo	5 (15,15%)	28 (84,85%)	33 (100%)	0,93
	Intraabdominal	6 (18,18%)	27 (81,82%)	33 (100%)	
	Pancreático	4 (13,79%)	25 (86,21%)	29 (100%)	
	Total	15 (15,7%)	80 (84,2%)	95 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test exacto de χ^2 .

Hemos evidenciado dos casos de evisceración en el modelo intraabdominal (ratones T2.I.P.1 y T1.I.5). En ambos casos, los ratones se comieron los puntos de sutura. Esta complicación postquirúrgica fue detectada precozmente en un caso, realizándose una nueva eventrorrafia con un resultado satisfactorio. En el otro caso el roedor fue éxitus. (Figura 57).



Figura 57. Evisceración en el modelo intraabdominal. Ratón T2.I.P.1

En el modelo subcutáneo hemos detectado dos casos de aparición de úlceras cutáneas cercanas a la zona del implante (ratones T1.S.2 y T1.S.9). No apreciamos signos de sobreinfección de las mismas. (Figura 58).



Figura 58. Ratón T1.S.2. Úlceras cutáneas

Hemos detectado 5 casos de peritonitis distribuidos entre dos modelos intraabdominales y tres modelos pancreáticos. Todos los ratones que sufrieron una peritonitis murieron. En tres casos (ratones T1.I.4A, T3.I.P.S.8 y T2.P.S.8) la peritonitis apareció meses después del implante y durante la autopsia se apreció un gran crecimiento tumoral inadvertido que provocó la perforación de un asa intestinal. En los otros dos casos no se observó desarrollo tumoral. Uno de ellos, presentó un éxitus precoz debido a una enterotomía desapercibida relacionada con un fallo en la técnica quirúrgica (ratón T2.P.S.2). El otro caso falleció a las 5 semanas del implante. El líquido encontrado en la cavidad abdominal era turbio. Posiblemente el éxitus se debió a una reacción pancreática (ratón T1.P.3).

Hemos observado tres casos de degeneración quística del xenoinjerto implantado que impidió el desarrollo del tumor (ratones T1.S1, T1.S.9 y T1.I.9).

En un modelo subcutáneo se apreció un éxitus tres días después del implante. Posiblemente, fue consecuencia de una sepsis debido a un fallo en la técnica de asepsia.

En un modelo intraabdominal observamos ascitis como consecuencia de la infiltración el eje esplenoportal (ratón T3.I.I.S.8).

No hemos evidenciados otro tipo de complicaciones postoperatorias como hemorragia o infección de la herida quirúrgica.

1.7.4. Tiempo libre de enfermedad en los modelos animales

Entre los tres modelos (subcutáneo, intraabdominal y páncreas) se observa un menor tiempo libre de tumor en el modelo subcutáneo, aunque no existe diferencias estadísticamente significativas a favor de ningún modelo ($p = 0,063$). (Figura 59)

La mediana del tiempo libre de tumor fue de nueve semanas y media en el caso del modelo subcutáneo versus 21 y 19 semanas en el modelos intraabdominal y en el modelo pancreático respectivamente. (Tabla 22)

Tabla 22. Media y Mediana del tiempo libre de enfermedad en los tres modelos

Implantes	MEDIA				MEDIANA		
	Estimación	Error estándar	IC 95%		Estimación	Rango intercuartílico	
			Límite Inferior	Límite superior		Percentil 25	Percentil 75
Subcutáneo	17,72	2,58	12,71	22,83	9,42	7,43	15,29
Intraabdominal	25,04	2,69	19,75	30,32	21,00	10,29	32
Páncreas	23,10	2,26	18,66	25,56	19,85	11,14	26,14
GLOBAL	22,40	1,613	19,23	25,56	15,57	8,42	26,14

*La estimación está limitada al tiempo de ausencia de tumor más largo, si esta censurado

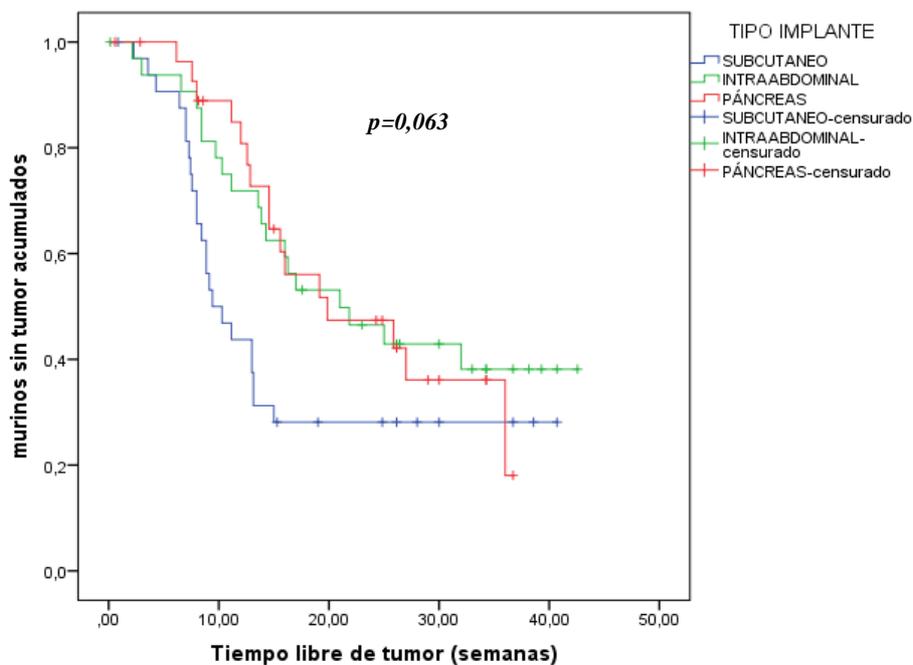


Figura 59. Test de Kaplan-Meier. Tiempo libre de tumor en función del modelo animal

A las 15 semanas el 62 % ($\pm 8,6\%$) de los modelos intraabdominales y el 64% ($\pm 9,5\%$) de los modelos pancreáticos se encuentran libres de tumor, a diferencia del modelo subcutáneo en el que tan sólo un 28% ($\pm 7,9\%$) permanecen libres de tumor.

No es hasta la semana 36 en el caso del xenoinjerto de páncreas y hasta la semana 32 en el modelo intraabdominal (es decir 21 y 17 semanas después respecto al modelos subcutáneo) cuando se consigue el desarrollo todos los xenoinjertos.

1.7.5. Evolución del peso

Observamos que desde el momento del implante hasta la semana 10, existe un aumento progresivo del peso en los tres modelos siendo un aumento estadísticamente significativo.

En los tres modelos, se aprecia un ascenso inicial del peso que se frena cuando alcanzan la madurez (5^a-6^a semana). A partir de este momento se continúa apreciando un ascenso del peso menos marcado que tiende a la estabilización

(Modelos subcutáneo **semana 1**: $30,46 \pm 0,81$ gr IC95%(28,76- 32,16) vs modelos subcutáneo **semana 10**: $35,16 \pm 0,75$ gr IC95%(33,58-36,74) ($p < 0,001$); Modelos intraabdominal **semana 1**: $32,27 \pm 0,76$ gr IC 95% (30,68-33,55) vs modelo intraabdominal **semana 10**: $35,79 \pm 0,69$ gr IC 95% (34,34-37,23) ($p < 0,001$); modelo pancreático **semana 1**: $29,79 \pm 0,81$ IC 95% (27,38-32,30) vs modelo pancreático **semana 10**: $35,13 \pm 0,83$ IC 95 % (33,38-36,88) ($p < 0,001$). (Figura 60).

Tabla 23. Resumen descriptivo del peso en la semana 10 en los tres modelos

Pesos en la semana 10	Modelo animal		
	Subcutáneo	Intraabdominal	Páncreas
Media	$35,16 \pm 0,75$	$35,79 \pm 0,69$	$35,13 \pm 0,83$
Desv. típ.	3,37	3,34	3,63
Mediana	34,64	35,46	34,10
Percentil 25	33,0	33,5	32,9
Percentil 75	36,51	36,46	37,5

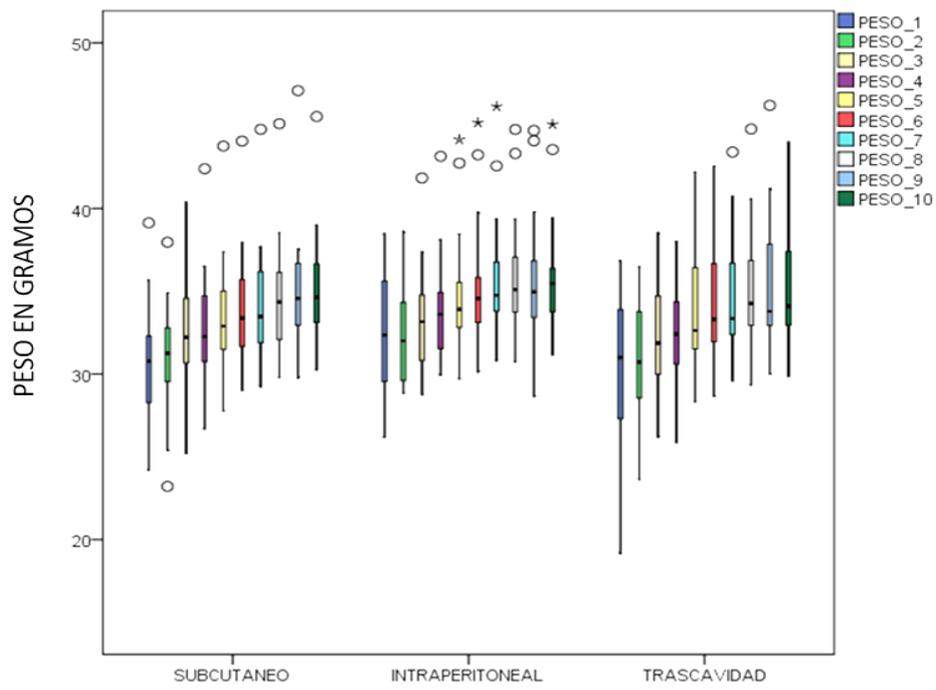


Figura 60. Evolución del peso en los tres modelos empleados (Prueba de Friedman)

2

2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS IMPLANTES EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES Y EN LOS PASES.

2.1. HEMATOXILINA & EOSINA: GRADO DE DIFERENCIACIÓN

2.1.1. Grado de diferenciación a lo largo de los modelos

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grado de diferenciación de las muestras humanas y los modelos experimentales ($p=0,20$). La mayor parte de las muestras humanas eran moderadamente diferenciadas (72,7%) al igual que las muestras obtenidas de los modelos pancreáticos (50%). En los modelos subcutáneos e intraabdominales, parece existir una mayor tendencia (no significativa) hacia la indiferenciación. (Tabla 24 y Figura 61). Los xenoinjertos de los tres modelos conservan los rasgos de diferenciación histológica provenientes de los humanos.

Tabla 24. Tabla de contingencia. Impacto del grado de diferenciación en los modelos animales.

		Modelos (%)					p
		HUMANO	SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PÁNCREAS	TOTAL	
H&Eo (grado de diferenciación)	Bien	2 (18,2%)	7% (30,4%)	5 (29,4%)	3 (18,8%)	17 (34,3%)	0,205
	Moderado	8 (72,7%)	7 (30,4%)	4 (23,5%)	8 (50%)	27 (40,3%)	
	Poco	1 (9,1%)	9 (39,1%)	8 (47,1%)	5 (31,3%)	23 (34,3%)	
	Total	11 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	16 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de χ^2 .

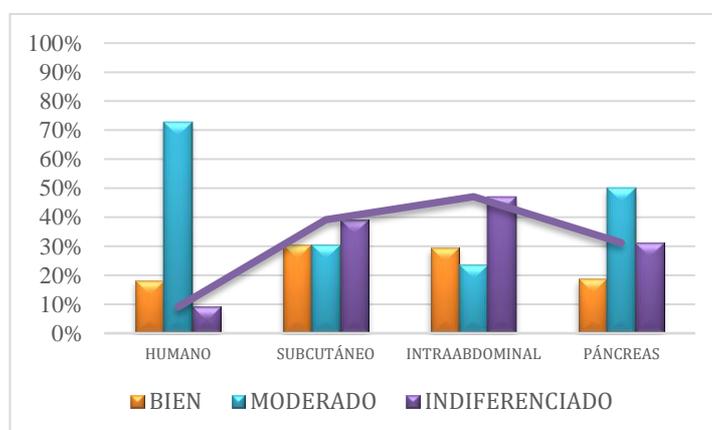


Figura 61. Grado de diferenciación en los modelos animales. *Línea de tendencia morada:* refleja la progresión de las muestras indiferenciadas en los tres modelos y el humano

2.1.2. Grado de diferenciación a lo largo de los pases

No apreciamos diferencias significativas en el grado de diferenciación a lo largo de los pases ($p=0,25$), por tanto, las muestras mantiene el grado de diferenciación a lo largo de los mismos. Observamos que en el humano la mayoría de las muestras son moderadamente o bien diferenciadas (72,7% moderadas y 18,2% bien diferenciadas) y que a medida que avanzan los pases existe una leve tendencia no significativa hacia la indiferenciación de las muestras murinas (Tabla 25, Figura 62 y Figura 63)

Tabla 25. Tabla de contingencia. Impacto del grado de diferenciación a lo largo de los pases.

		Pases (%)					p
		HUMANO	PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Hematoxilina-Eosina (grado de diferenciación)	Bien	2 (18,2%)	1 (12,5%)	5 (33,3%)	9 (27,3%)	17 (25,4%)	0,252
	Moderado	8 (72,7%)	4 (50%)	5 (33,3%)	10 (30,3%)	27 (40,3%)	
	Poco	1 (9,1%)	3 (37,5%)	5 (33,3%)	14 (42,4%)	23 (34,3%)	
	Total	11 (100%)	8 (100%)	15 (100%)	17 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de χ^2 .

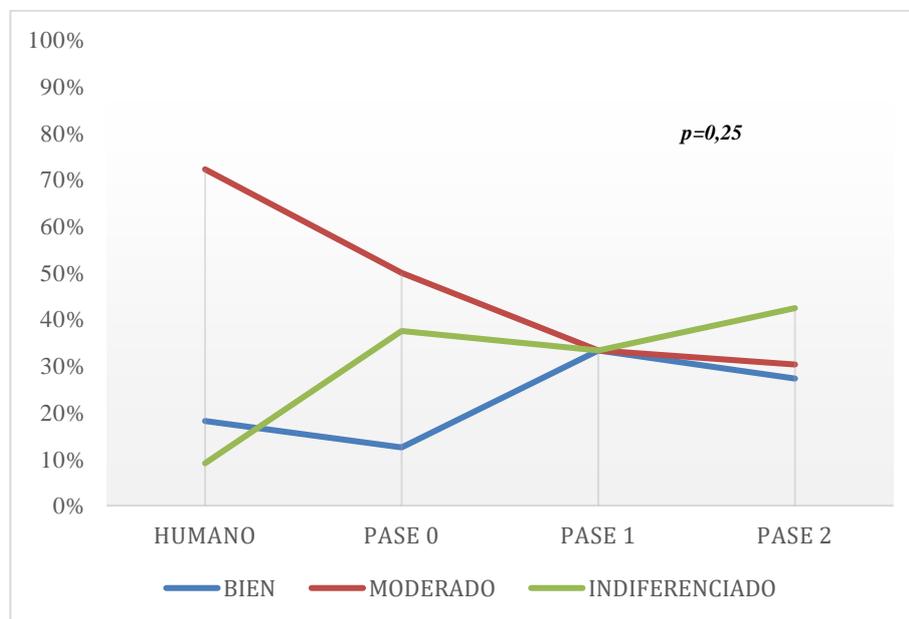


Figura 62. Tendencia del grado de diferenciación a lo largo de los pases.

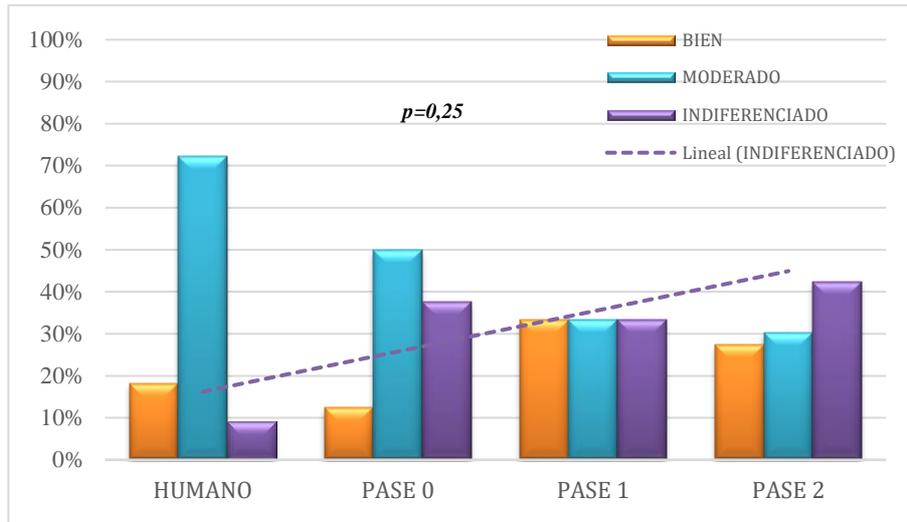


Figura 63. Grado de diferenciación a lo largo de los pases. *Línea de tendencia:* Muestra el grado de indiferenciación a lo largo de los pases

2.1.2.1. Análisis de la diferenciación de los modelos a lo largo de los pases

No se aprecian diferencias significativas con las muestras humanas. (Figura 64, Figura 65 y Figura 66). Es decir, los tres modelos mantienen el grado de diferenciación a lo largo de los pases.

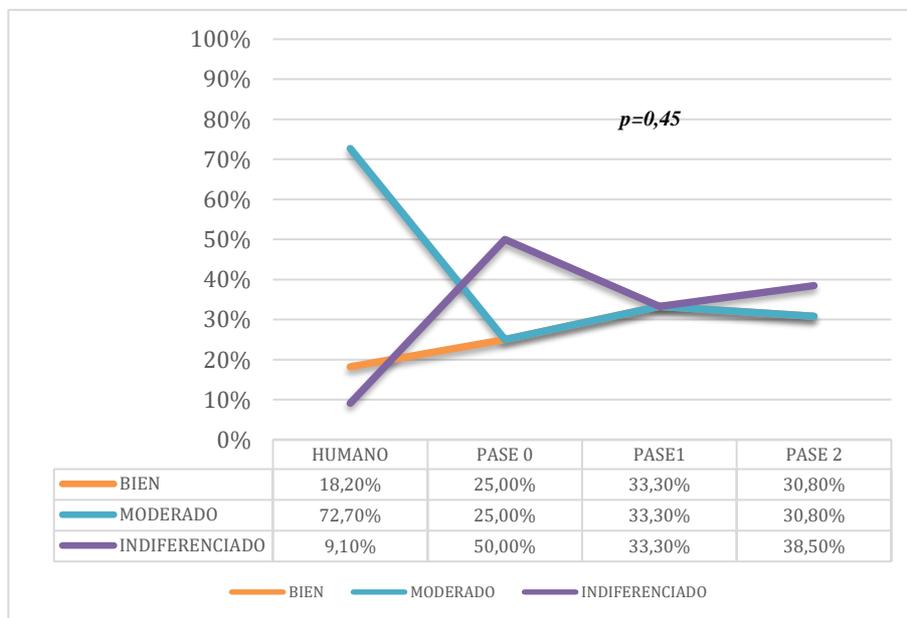


Figura 64. Grado de diferenciación del modelo subcutáneo. Test de exacto de χ^2 . La "p" es considerada significativa si $p < 0,016$

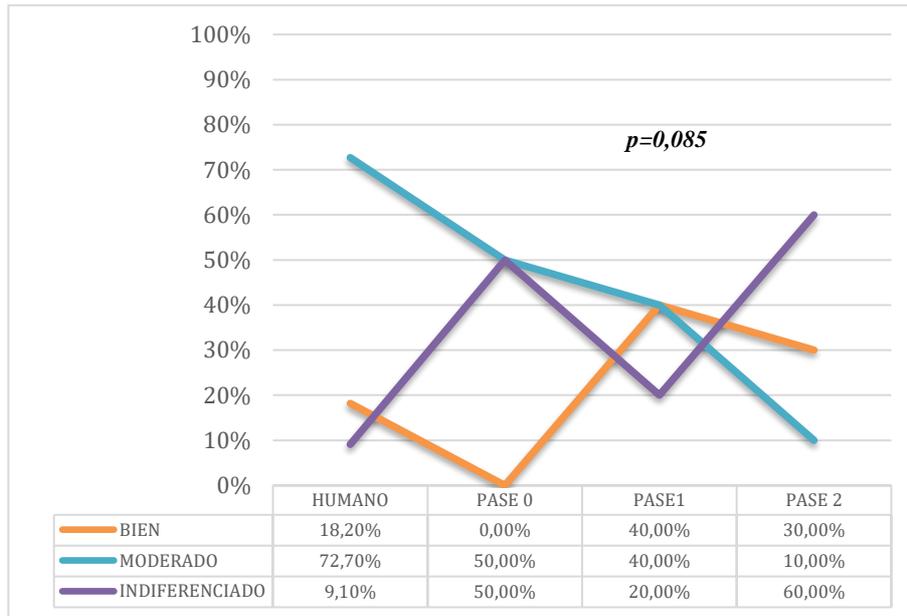


Figura 65. Grado de diferenciación del modelo intraabdominal. Test de exacto de χ^2 . La “p” es considerada significativa si $p < 0,016$

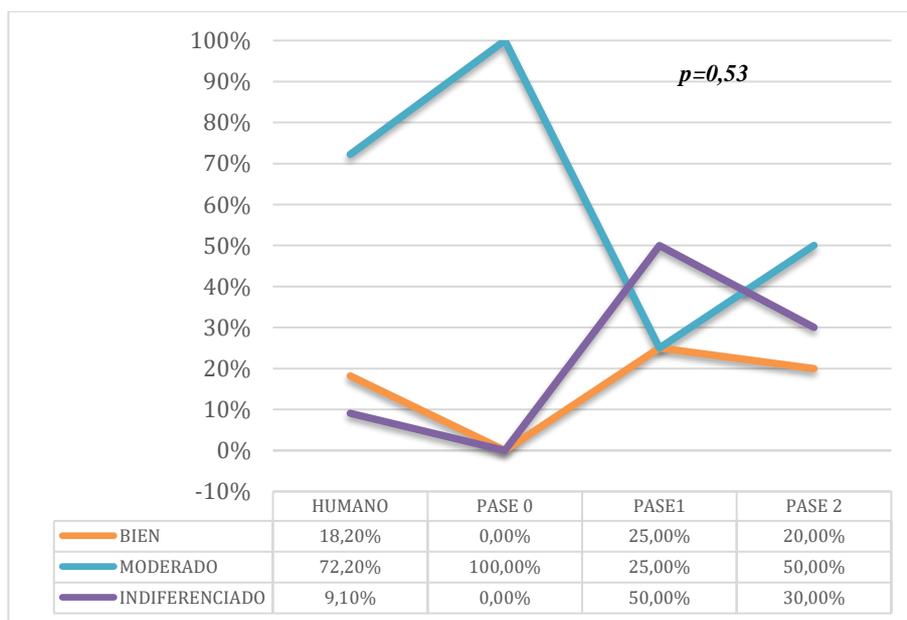


Figura 66. Grado de diferenciación del modelo pancreático a lo largo de los pases. Test de exacto de χ^2 . La “p” es considerada significativa si $p < 0,016$

2.2. NÚMERO DE MITOSIS POR CAMPO

2.2.1. Número de mitosis y los modelos animales

No se observan variaciones en el número de mitosis y los distintos modelos y el humano. No existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,086$). (Tabla 26 y Figura 67). Sin embargo la “ p ” se encuentra cercana a la significación y se aprecia un aumento de las mitosis por campo del modelo intraabdominal.

Los datos descriptivos aparecen reflejados en la Tabla 26.

Tabla 26. Rango promedio del número de mitosis a lo largo de los modelos

	<i>PASE</i>	<i>n</i>	<i>Rango Promedio</i>	<i>p</i>
Nº de mitosis	HUMANO	11	24,00	0,086
	SUBCUTANEO	23	35,48	
	INTRAABDOMINAL	16	38,44	
	PÁNCREAS	16	32,25	

El valor de la “ p ” fue generado a partir del Test de Kruskal-Wallis. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

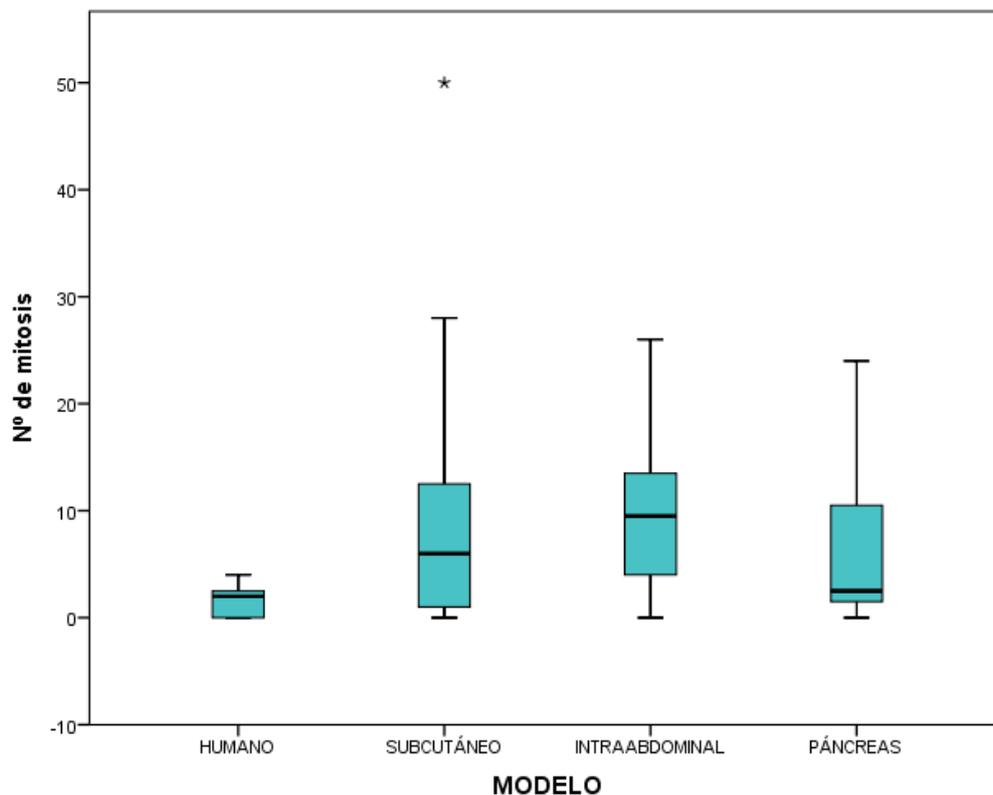


Figura 67. Medianas del nº de mitosis/Modelo

Tabla 27. Resumen descriptivo del número de mitosis por modelo.

Nº de mitosis por modelo	Modelos Experimentales		
	SUBCUTANEO (n=33)	INTRAABDOMINAL (n=33)	PANCREÁTICO (n=29)
Media \pm error típico	10 \pm 2	10 \pm 2	6 \pm 2
Desviación típica	12	8	7
Mediana	6	10	3
Percentil 25	1	4	2
Percentil 75	13	14	11

2.2.2. Número de mitosis a lo largo de los pases

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p=0,118$) por lo que se mantiene el número de mitosis por campo entre los distintos pases y el humano, aunque parece existir una tendencia al alza no significativa en el número de mitosis a medida que avanzan los pases (Tabla 28 y Figura 68).

Los datos descriptivos aparecen reflejados en la Tabla 29.

Tabla 28. Rango promedio del número de mitosis a lo largo de los pases.

	<i>PASE</i>	<i>n</i>	<i>Rango Promedio</i>	<i>p</i>
Nº de mitosis	HUMANO	11	24,00	0,118
	PASE 0	8	36,38	
	PASE 1	15	32,80	
	PASE 2	32	36,38	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de Kruskal-Wallis. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

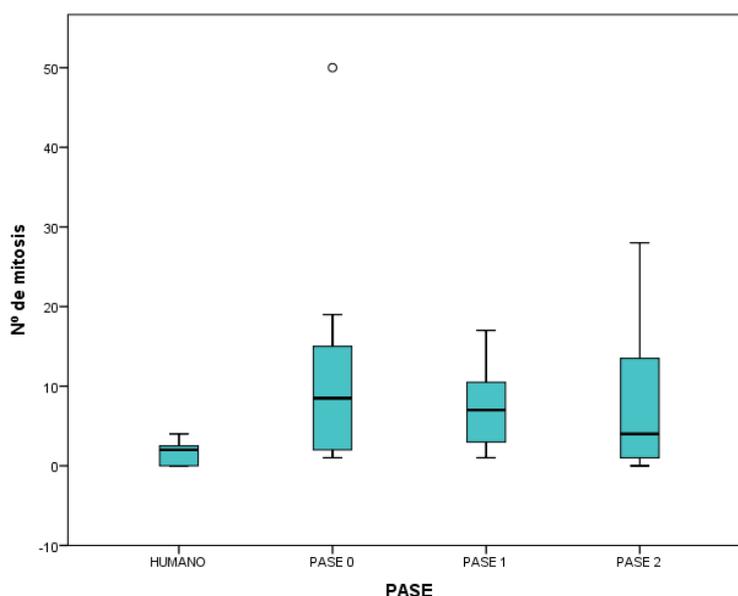
**Figura 68.** Medianas del nº de mitosis/Pase

Tabla 29. Resumen descriptivo del número de mitosis por pases.

Nº de mitosis por campo	Pases			
	HUMANO (n=11)	PASE 0 (n=8)	PASE 1 (n=15)	PASE 2 (n=33)
Media \pm error típico	2 \pm 0	13 \pm 6	7 \pm 1	8 \pm 2
Desviación típica	1	16	5	9
Mediana	2	9	7	4
Percentil 25	0	2	3	1
Percentil 75	3	15	11	14

Como resumen del **apartado 2.2** podemos decir que las muestras murinas mantienen las mitosis por campo respecto a las muestras humanas a lo largo de los pases. Tampoco se aprecia un aumento de las mitosis en ninguno de los tres modelos desarrollados.

2.3. TRICRÓMICO DE MASSON: GRADO DE FIBROSIS

2.3.1. Masson a lo largo de los modelos

En los tres modelos se aprecia una disminución de las muestras con fibrosis muy elevada respecto a las muestras humanas (Figura 69). Tras aplicar el *test exacto de χ^2* se observan diferencias estadísticamente significación entre el grado de fibrosis de las muestras humanas y los modelos experimentales ($p=0,044$). (Tabla 30)

Las muestras humanas presentan una fibrosis más elevada que el resto de muestras de los modelos animales. El 36,3% de las muestras humanas presentaban una fibrosis muy elevada. Mientras que la mayoría de las muestras obtenidas de los ratones, presentaban un grado de fibrosis leve o moderada. (Figura 69).

Tabla 30. Tabla de contingencia. Impacto del grado de diferenciación en los modelos animales

Masson (grado de fibrosis)		Modelos (%)					p
		HUMANO	SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PÁNCREAS	TOTAL	
	Leve	4 (36,3%)	12 (52,1 %)	6 (35,2 %)	6 (37,5%)	28 (41,8%)	0,044
	Moderado	3 (27,2 %)	5 (21,7%)	9 (52,9%)	3 (18,8 %)	20 (29,9%)	
	Elevado	0 (0%)	4 (17,3%)	2 (11,7%)	5 (31,3%)	11 (16,4%)	
	Muy elevado	4 (36,3%)	2 (8,6%)	0 (0%)	2 (12,5%)	8 (11,9%)	
	Total	11 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	16 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

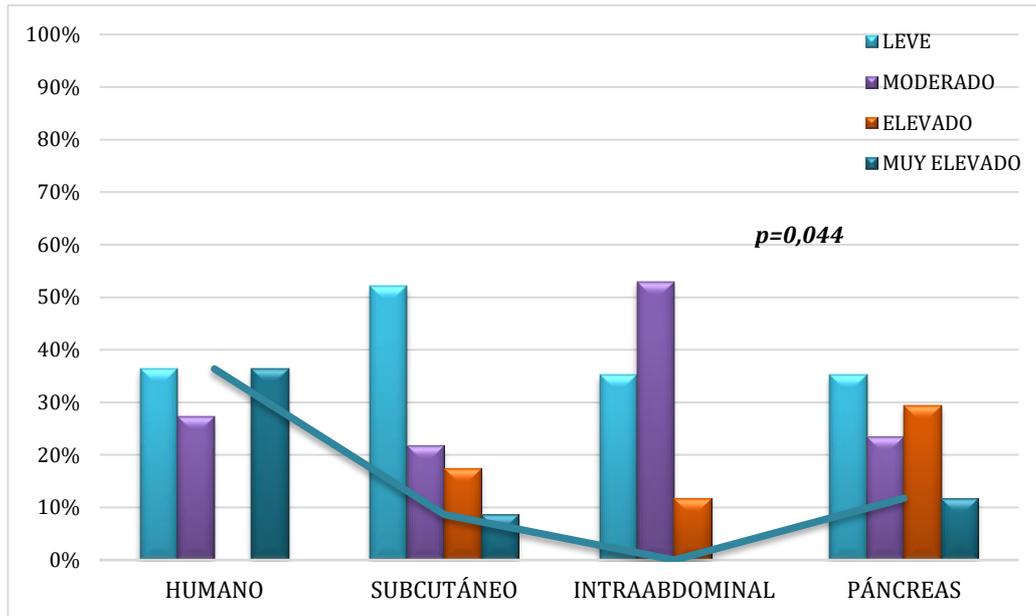


Figura 69. Grado de fibrosis en los modelos animales. La línea de tendencia azul representa las muestras con fibrosis muy elevada

Debido a la significación estadística alcanzada, se ha analizado de forma individual la fibrosis en cada modelo en comparación con los humanos, para determinar que modelos presentaban diferencias. La “p” se consideró significativa si $<0,01667$ (Corrección de Bonferroni). No hemos observado diferencias significativas entre el grado de fibrosis en el humano y ninguno de los modelos empleados (subcutáneo $p=0,15$, intraabdominal $p=0,03$, páncreas $p=0,17$), aunque el modelo intraabdominal presenta un valor cercano a la significación ($p=0,03$).

Podemos decir que existe una diferencias estadísticamente significativa entre el grado de fibrosis de las muestras humanas y las murinas ($p=0,044$). (Tabla 30). Cuando analizamos de forma individual cada uno de los modelos desarrollados, no apreciamos diferencias estadísticamente significativas entre el grado de fibrosis observado en las muestras humanas y cada uno de los modelos analizado individualmente, aunque nuevamente en el modelo intraabdominal se aprecia una “p” cercana a la significación ($p=0,03$. “p” es considerada significativa si $p<0,016$).

2.3.2. Masson a lo largo de los pases

Tras comparar las muestras a lo largo de los pases, no apreciamos diferencias estadísticamente significativas en el grado de fibrosis ($p=0,26$). Observamos que la

mayoría de las muestras presentan un grado de fibrosis leve o moderada y que este se mantiene a lo largo de los pases. Se aprecia una disminución no significativa a lo largo de los pases de las muestras con una fibrosis muy elevada. (Figura 70 y Tabla 31).

Tabla 31. Tabla de contingencia. Impacto del grado de fibrosis en los pases

		Pases (%)					p
		HUMANO	PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Masson (grado de fibrosis)	Leve	4 (36,3%)	4 (50%)	7 (46,7 %)	13 (39,4%)	28 (41,8%)	0,26
	Moderado	3 (27,3 %)	3 (37,5%)	4 (26,7%)	10 (30,3%)	20 (29,9%)	
	Elevado	0 (0%)	1 (12,5%)	2 (13,3%)	8 (24,2%)	11 (16,4%)	
	Muy elevado	4 (36,3%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	2 (6,1%)	8 (11,9%)	
	Total	11 (100%)	8 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

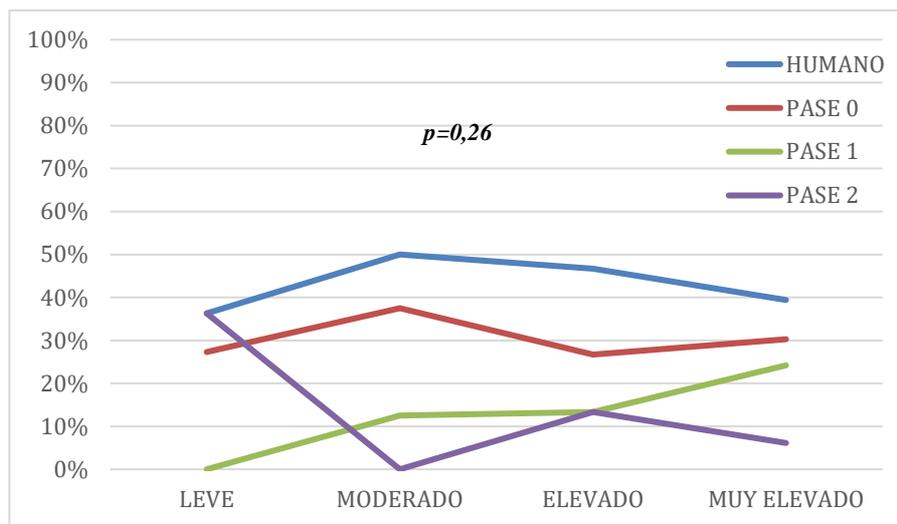


Figura 70. Grado de fibrosis a lo largo de los pases

Las muestras murinas mantienen la fibrosis a lo largo de los pases, aunque existe una tendencia no significativa hacia la disminución de las muestras con una fibrosis muy elevada.

2.3.2.1. Análisis del grado de fibrosis de los modelos a lo largo de los pases

Finalmente, el análisis del grado de fibrosis de las muestras de cada uno de los modelos experimentales desarrollados a lo largo de los pases, no evidencia diferencias a lo largo

de los pases en ningún modelo. Los tres modelos mantienen el grado de fibrosis a lo largo de los pases. (Figura 71, Figura 72 y Figura 73)

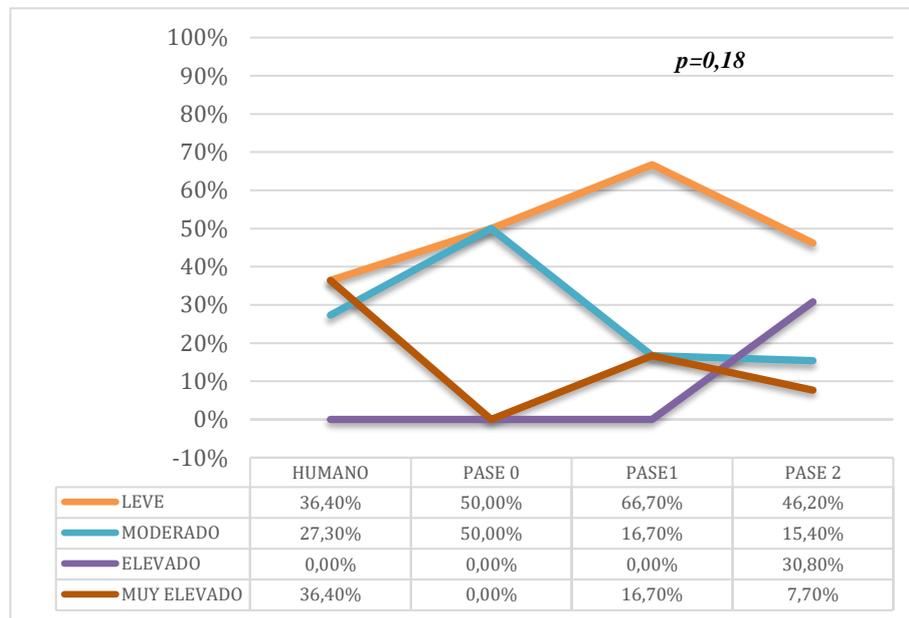


Figura 71. Grado de fibrosis del modelo subcutáneo a lo largo de los pases. Test de exacto de χ^2 . La “p” es considerada significativa si $p < 0,016$.

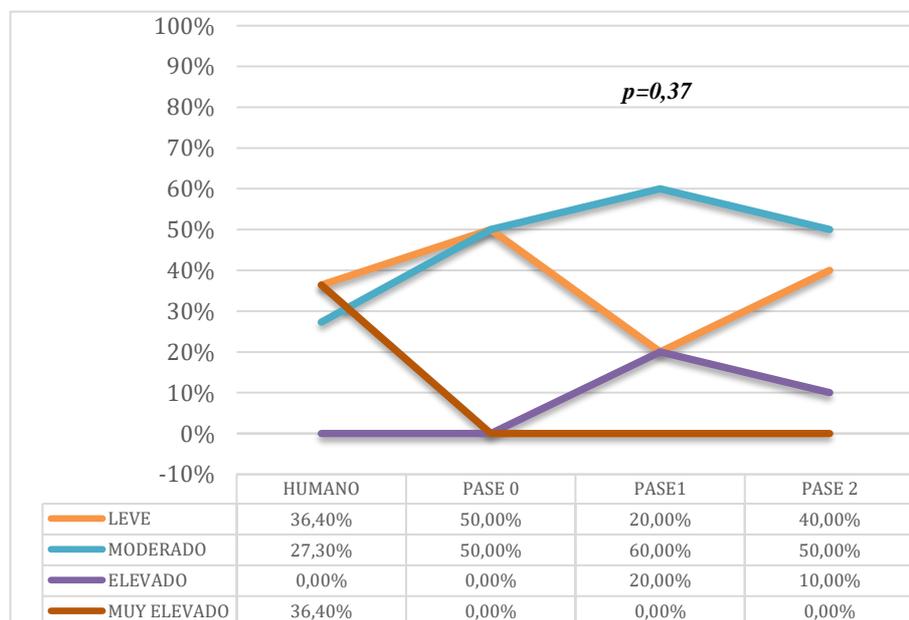


Figura 72. Grado de fibrosis del modelo intraabdominal a lo largo de los pases. Test de exacto de χ^2 . La “p” es considerada significativa si $p < 0,016$.

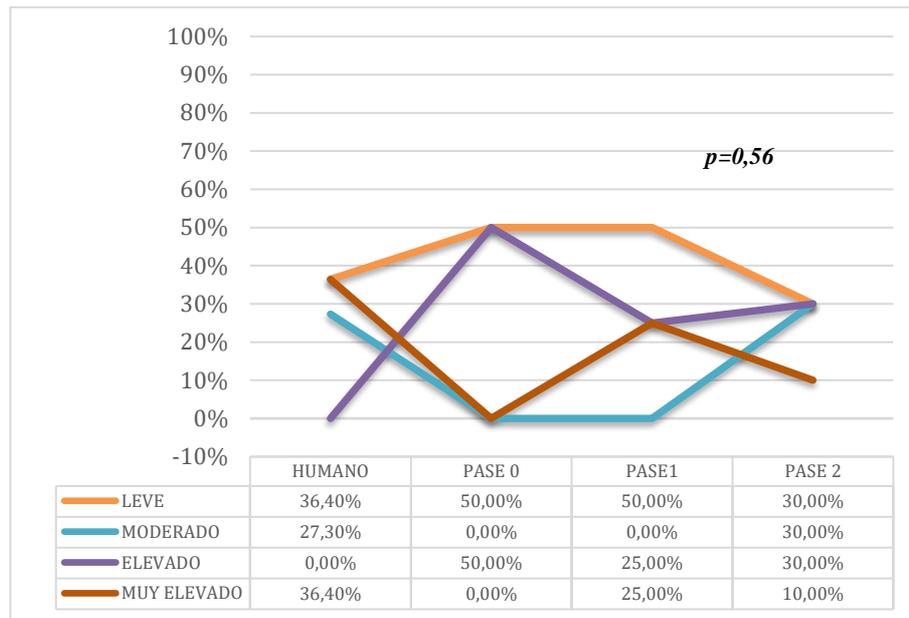


Figura 73. Grado de fibrosis del modelo pancreático a lo largo de los pases. Test de exacto de χ^2 . La “p” es considerada significativa si $p < 0,016$.

Como resumen del **apartado 2.3** podemos decir que existen diferencias entre el grado de fibrosis entre las muestras humanas y las murinas. Se aprecia una disminución de las muestras con fibrosis muy elevada. Cuando se analiza de forma individual cada uno de los modelos desarrollados no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, aunque el modelo intraabdominal parece tender hacia un menor grado de fibrosis.

Cuando analizamos la fibrosis a lo largo de los pases no se aprecian diferencias estadísticamente significativas. Lo mismo ocurre cuando analizamos el grado de fibrosis de cada modelo a lo largo de los pases.

Los murinos mantienen el grado de fibrosis a lo largo de los pases. Aunque existe una tendencia no significativa hacia la disminución de las muestras con fibrosis muy elevadas.

3. EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS IMPLANTES EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES Y EN LOS PASES

3.1. KI67: PROLIFERACIÓN CELULAR

3.1.1. Ki67 y modelos animales

El análisis del grado de expresión de Ki67 entre los modelos evidenció que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p=0,65$). Los tres modelos mantienen el grado de proliferación celular. (Tabla 32 y Figura 74)

Tabla 32. Tabla de contingencia. Impacto de la proliferación celular en los modelos

		Pases (%)					p
		HUMANO	SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PÁNCREAS	TOTAL	
Ki67	Bajo	4 (36,4%)	13 (56,5%)	10 (58,8%)	8 (50%)	35 (52,2%)	0,65
	Alto	7 (63,3%)	10 (43,5%)	7 (41,2%)	8 (50%)	32 (47,8%)	
	Total	11 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	16 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

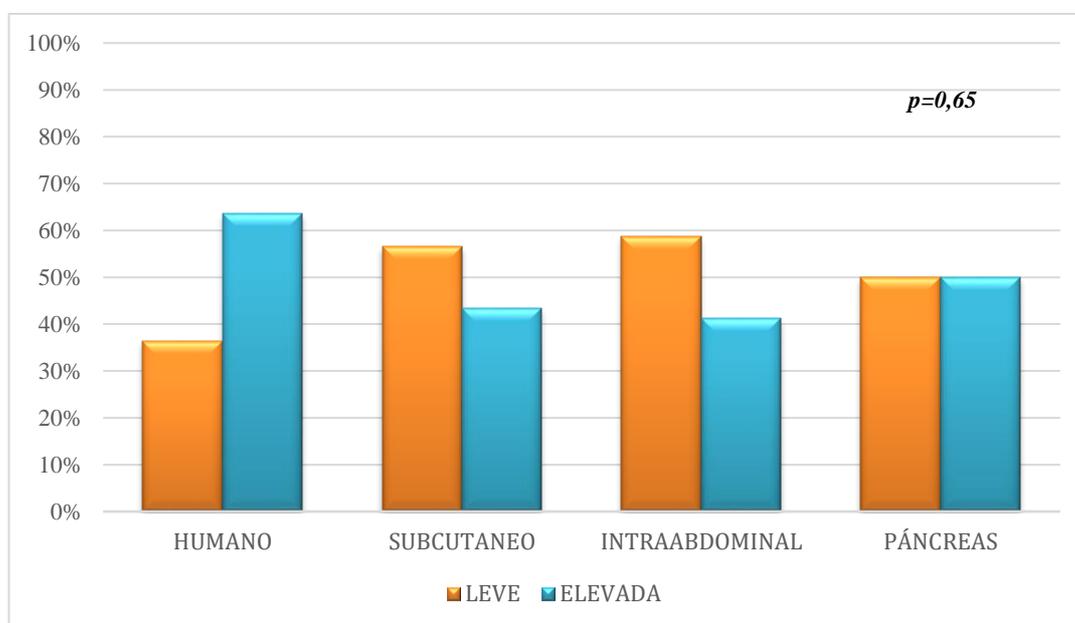


Figura 74. Proliferación celular en los modelos animales

3.1.2. Ki67 a lo largo de los pases

Se observa que a lo largo de los pases se mantiene el grado de proliferación. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p=0,59$). (Tabla 33 y Figura 75).

Tabla 33. Tabla de contingencia. Impacto de la proliferación celular en los pases

		Pases (%)					p
		HUMANO	PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Ki67	Baja	4 (36,3%)	5 (62,5%)	7 (46,7 %)	19 (57,6%)	35 (52,2%)	0,59
	Alta	7 (63,3%)	3 (37,5%)	8 (53,3%)	14 (42,4%)	32 (47,8%)	
	Total	11 (100%)	8 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

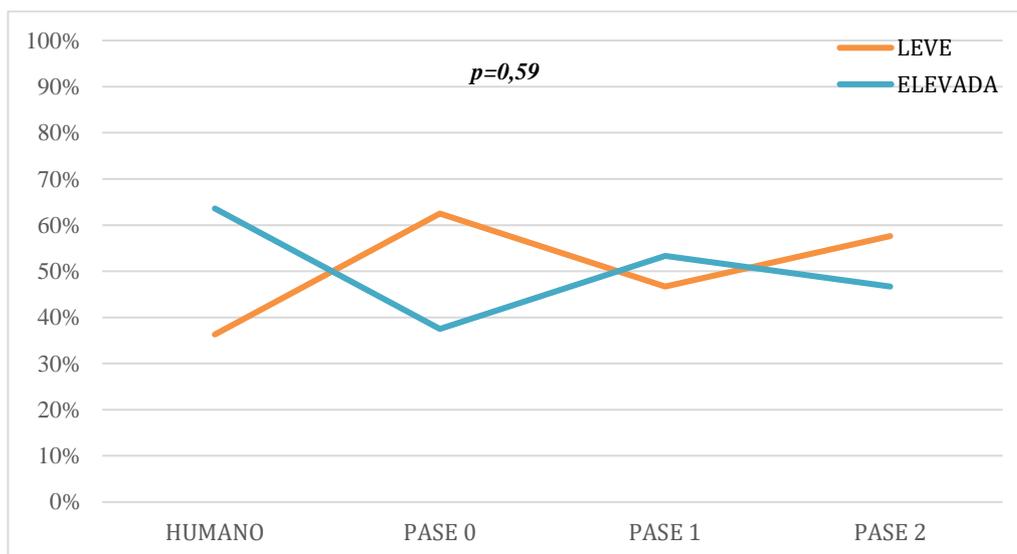


Figura 75. Tendencia de la proliferación celular a lo largo de los pases

Podemos decir que no existen diferencias significativas entre los tres modelos desarrollados y las muestras humanas a lo largo de los diferentes pases en la expresión de Ki67. Por tanto los tres modelos mantienen el grado de proliferación celular a medida que avanzan los pases.

3.2. α -SMA: FIBROGÉNESIS

3.2.1. α -SMA y los modelos animales

La correlación entre el grado de expresión de α -SMA y los tres modelos empleados, no evidenció variaciones en la fibrogénesis. No existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los modelos ($p=0,350$). Sin embargo cuando incluimos la muestras humanas y las comparamos con la expresión de α -SMA en los tres modelos apreciamos que existe una disminución significativa de la fibrogénesis ($p=0,000045$). (Tabla 34).

Tabla 34. Tabla de contingencia. Impacto de la fibrogénesis en los modelos

		Pases (%)					p
		HUMANO	SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PÁNCREAS	TOTAL	
α SMA	Baja	0 (0%)	16 (69,6%)	11 (64,7%)	14 (87,5%)	41 (61,2%)	0,000045
	Alta	11 (100%)	7 (30,4%)	6 (35,3%)	2 (12,5%)	26 (38,8%)	
	Total	11 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	16 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

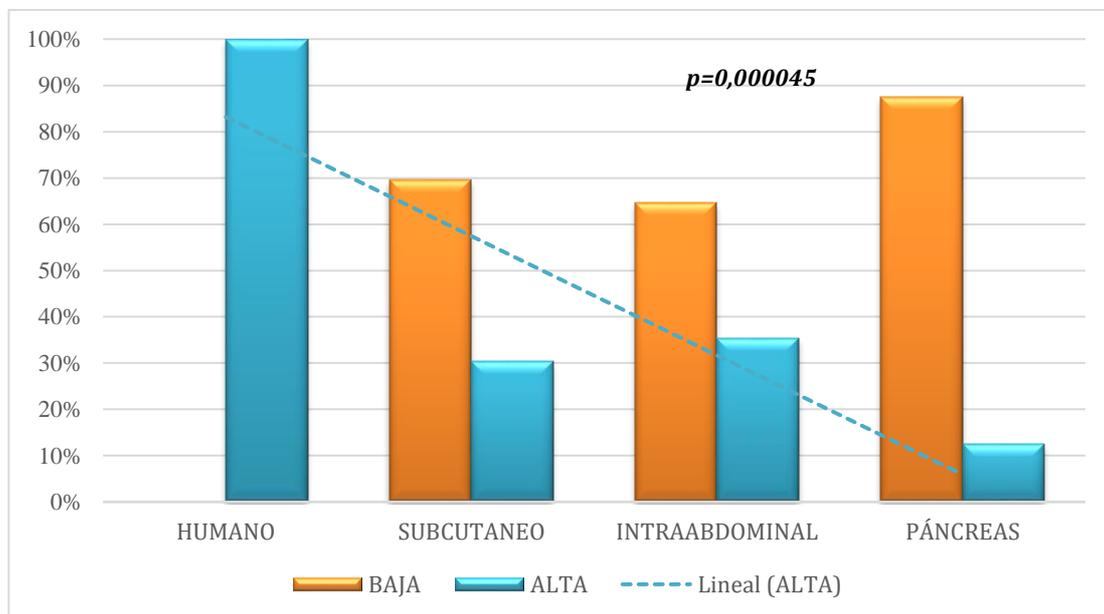


Figura 76. Expresión de α -SMA en los modelos animales

Todas las muestras humanas presentaron una fibrogénesis alta (n=11) lo que contrasta con los modelos experimentales en los que la mayoría de las muestras presentaron una fibrogénesis baja. Además, destaca el modelo pancreático en el que hasta el 87,5% de las muestras presentaron una expresión de α -SMA *baja* (Figura 76)

Para comprobar qué modelos experimentales presentaban diferencias respecto al humano, comparamos el grado de expresión de α -SMA de cada uno de los modelos experimental con los humanos de forma individual.

Tras aplicar el test de χ^2 o el Test exacto de Fisher, se comprueba que existe una disminución significativa de la fibrogénesis entre el humano y todos los modelos animales, siendo especialmente llamativa en el caso del páncreas. (Modelo subcutáneo vs humano $p=0,000144$; Modelo intraabdominal vs humano $p=0,0009$; Modelo pancreático vs humano $p=0,000008$). (Tabla 34 y Figura 77)

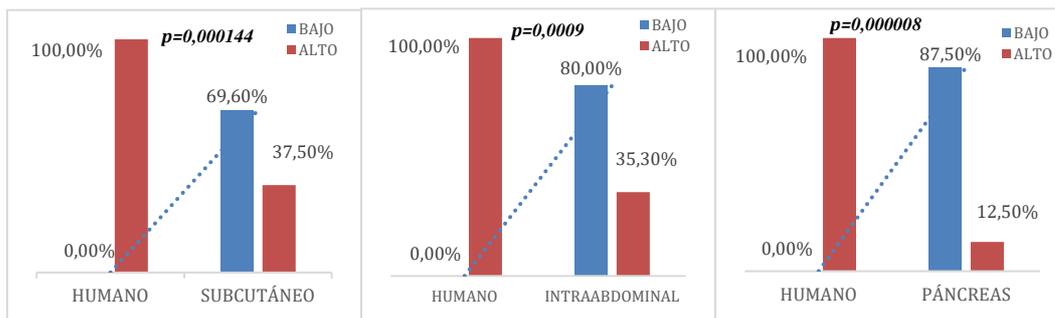


Figura 77. Análisis del grado de fibrosis entre el humano y los modelos

3.2.2. α -SMA a lo largo de los pases

A medida que avanzan los pases se aprecia un descenso significativo de la fibrogénesis (Humano: 100% fibrogénesis elevada; Pase 0: 50 % fibrogénesis elevada; Pase 1: 26,7% fibrogénesis elevada; Pase 2: 21,2% fibrogénesis elevada). Las diferencias encontradas son estadísticamente significativas ($p=0,00001$). (Tabla 35 y Figura 78)

Tabla 35. Tabla de contingencia. Impacto de la fibrosis en los pases

		Pases (%)					p
		HUMANO	PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
Fibrogénesis (AlfaSMA)	Baja	0 (0%)	4 (50%)	11 (73,3 %)	26 (78,8%)	41 (61,2%)	0,00001
	Alta	11 (100%)	4 (50%)	4 (26,7%)	7 (21,2%)	26 (38,8%)	
	Total	11 (100%)	8 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

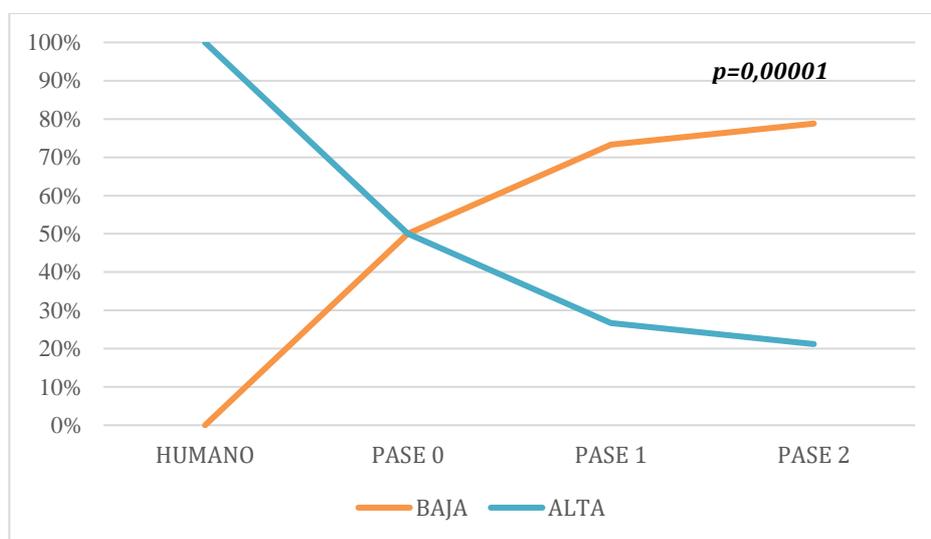


Figura 78. Tendencia de la fibrosis a lo largo de los pases

La Tabla 35 muestra como a medida que avanzan los pases, la expresión de α -SMA disminuye. La línea de tendencia naranja muestra como en cada pase los xenoinjertos presentan una menor expresión de α -SMA.

Para comprobar qué pases presentaban diferencias respecto al humano, comparamos de manera independiente el grado de expresión de α -SMA de cada uno de los pases con los humanos. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,01667$

Tras aplicar el test de χ^2 o el Test exacto de Fisher, se comprueba que existe una disminución significativa de la fibrogénesis entre el humano y el Pase y el Pase 2. (Pase 1 vs humano $p = 0,00019$; Pase 2 vs humano $p = 0,000004$).

En el Pase 0 aunque no se aprecian diferencias estadísticamente significativas la “p” se encuentra cerca a la significación (Pase 0 vs humano $p=0,0180$). (Figura 79)

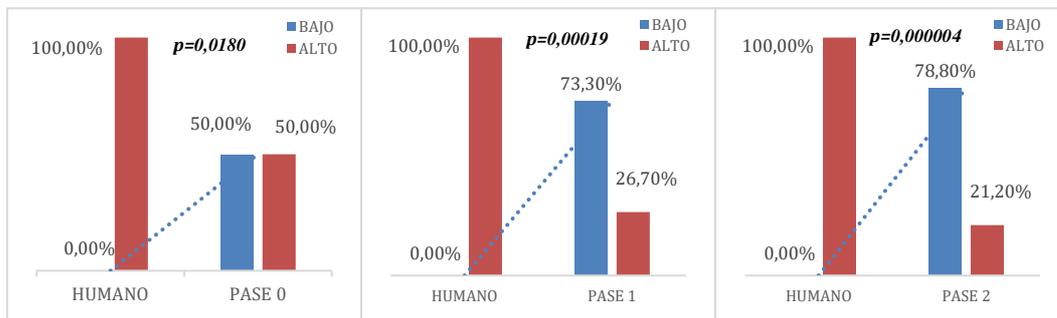


Figura 79. Análisis de la fibrogénesis entre el humano y los tres pases

3.2.2.1. Análisis de la fibrogénesis de los modelos a lo largo de los pases

El análisis de la fibrogénesis de cada modelo desarrollado a lo largo de los tres pases evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas en la fibrogénesis en todos los modelos a lo largo de los pases. (Subcutáneo: $p=0,000331$; Intraabdominal= $0,000527$; Páncreas= $0,000006$). (Figura 80, Figura 81 y Figura 82)

Se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de α -SMA a medida que avanzan los pases en todos los modelos siendo especialmente llamativa en el modelo pancreático.

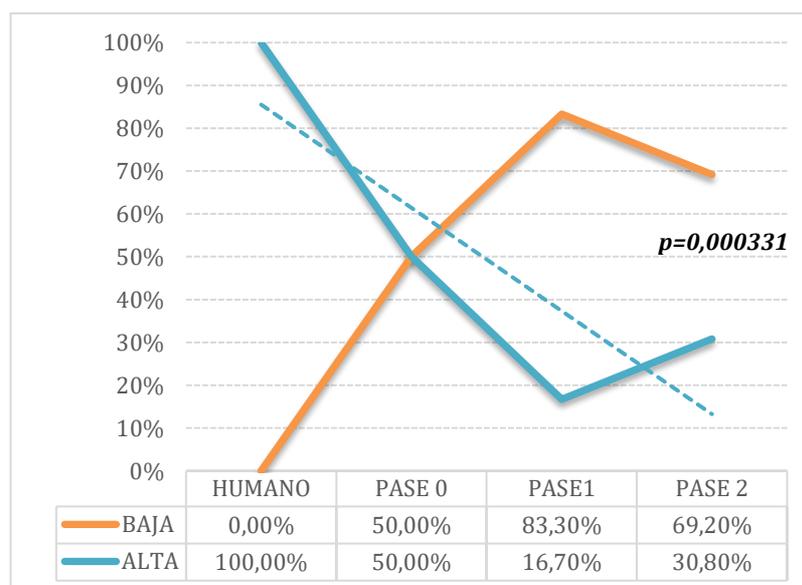


Figura 80. Expresión de α -SMA del modelo subcutáneo a lo largo de los pases. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

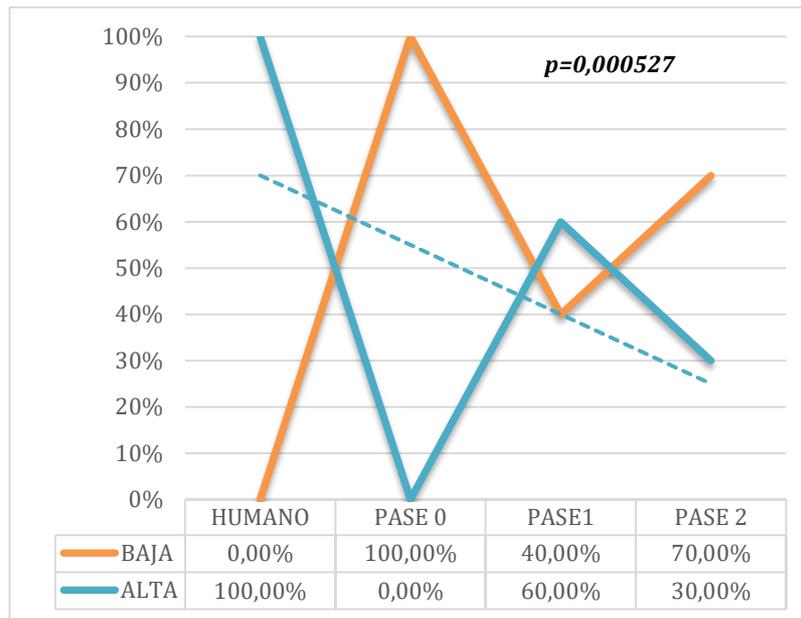


Figura 81. Expresión de α -SMA del modelo intraabdominal a lo largo de los pases. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

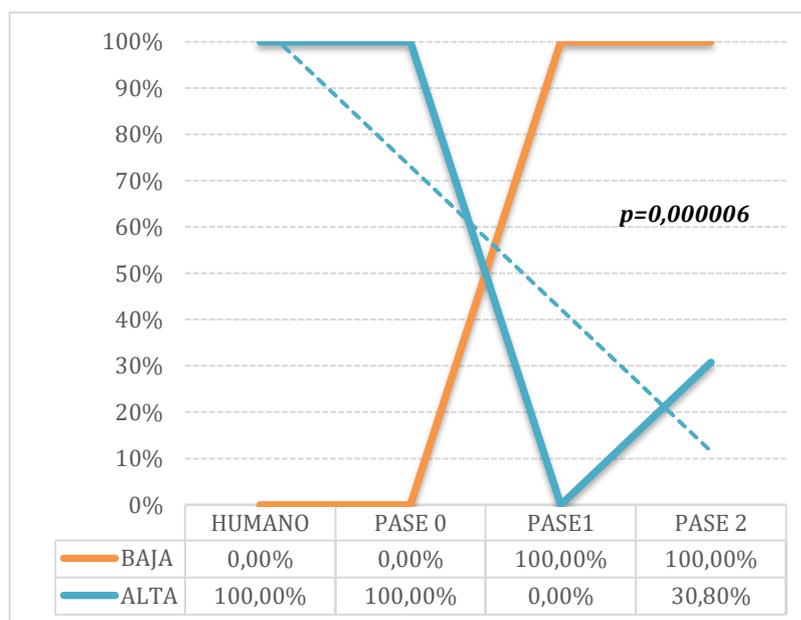


Figura 82. Expresión de α -SMA del modelo pancreático a lo largo de los pases. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

Como resumen del **apartado 3.2. (α -SMA: Fibrogénesis)** podemos decir que aunque no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los modelos experimentales en cuanto a la expresión de α -SMA, cuando se comparan con las muestras humanas sí se

observa una disminución de la fibrogénesis en todos los modelos. Destaca el modelo pancreático, en el que hasta el 87,5% de las muestras presentaron una expresión de α -SMA *baja*.

Por otro lado, hemos apreciado un descenso progresivo de la fibrogénesis entre los distintos pases y el humano, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,00035$). Cuando analizamos de forma individual cada pase con el humano apreciamos que en el Pase 0 no se aprecian diferencias estadísticamente significativas aunque se acerca a la significación. A lo largo del Pase 1 se alcanza la significación ($p=0,001$) y en el Pase 2 la disminución de la fibrogénesis es franca ($p=0,00001$).

Finalmente hemos analizado la evolución de la fibrogénesis de cada modelo desarrollado a lo largo de los tres pases desde las muestras humanas de manera individual. Se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de α -SMA a medida que avanzan los pases en todos los modelos siendo especialmente llamativa en el modelo pancreático.

3.3. CD31: ANGIOGÉNESIS

3.3.1. CD31 y los modelos animales

Se observa un aumento significativo de las muestras con baja expresión de CD31 en todos los modelos (Tabla 36 y Figura 83). Es decir, se aprecia un descenso de la angiogénesis en todos los modelos siendo más acusado en el modelo pancreático ($p=0,0034$).

Tabla 36. Tabla de contingencia. Impacto de la angiogénesis en los modelos

		Modelos (%)					p
		HUMANO	SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PANCREÁS	TOTAL	
CD31	Bajo	2 (18,2%)	15 (65,2%)	11 (64,7%)	14 (87,5%)	42 (62,7%)	0,0034
	Alto	9 (81,8%)	8 (34,8%)	6 (35,3%)	2 (12,5%)	25 (37,3%)	
	Total	11 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	16 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de χ^2 . Se alcanzó la significación estadística con una $p<0,05$

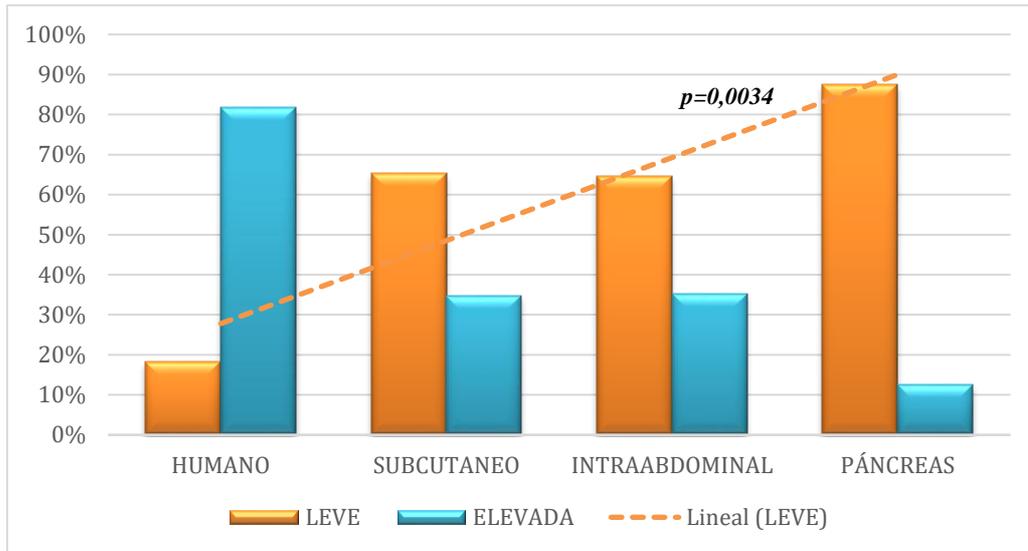


Figura 83. Grado de angiogénesis en los modelos animales

Debido a que apreciamos diferencias estadísticamente significativas entre la angiogénesis en los distintos modelos y el humano, comparamos la expresión de CD31 de cada modelo murino de forma independiente con los humanos. La “p” fue considerada significativa si era $< 0,01667$.

Tras aplicar *Test de χ^2* /*Test exacto de Fisher* se aprecia una disminución de la expresión de CD31 estadísticamente significativa en todos los modelos con respecto a las muestras humanas. Es especialmente llamativa en el caso de los modelos pancreáticos en el que se observa una mayoría de muestras con baja expresión de CD31. (Modelo subcutáneo vs humano $p=0,0102$; Modelo intraabdominal vs humano $p=0,0159$; Modelo pancreático vs humano $p= 0,0008$) (Figura 84).

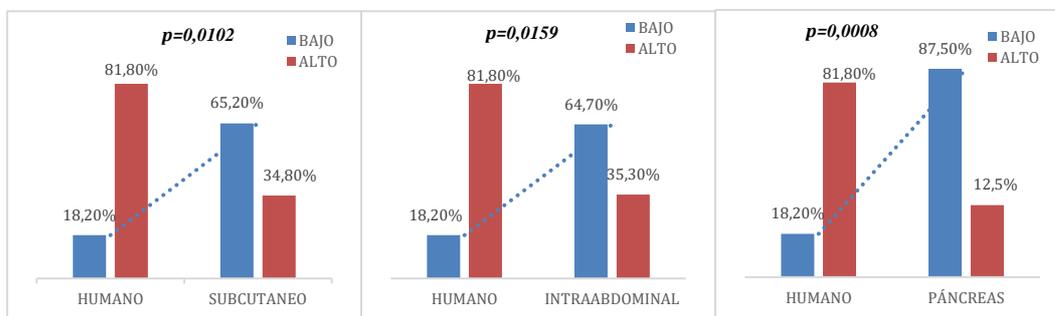


Figura 84. Análisis de la angiogénesis de cada modelo con el humano

3.3.2. CD31 a lo largo de los pases

Se aprecia un descenso de la angiogénesis en los tres pases siendo más acusado en P1 ($p=0,008$). En el humano la mayoría de las muestras presentaban una expresión de CD31 alta, presentando una disminución de la angiogénesis significativa especialmente durante el P1 y el P2 (Tabla 37 y Figura 85).

Tabla 37. Tabla de contingencia. Impacto de la angiogénesis en los pases

		Pases (%)					p
		HUMANO	PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
CD31	Baja	2 (18,2%)	5 (62,5%)	12 (80%)	23 (69,7%)	42 (62,7%)	0,008
	Alta	9 (81,8%)	3 (37,5%)	3 (20%)	10 (30,3%)	25 (37,3%)	
	Total	11 (100%)	8 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

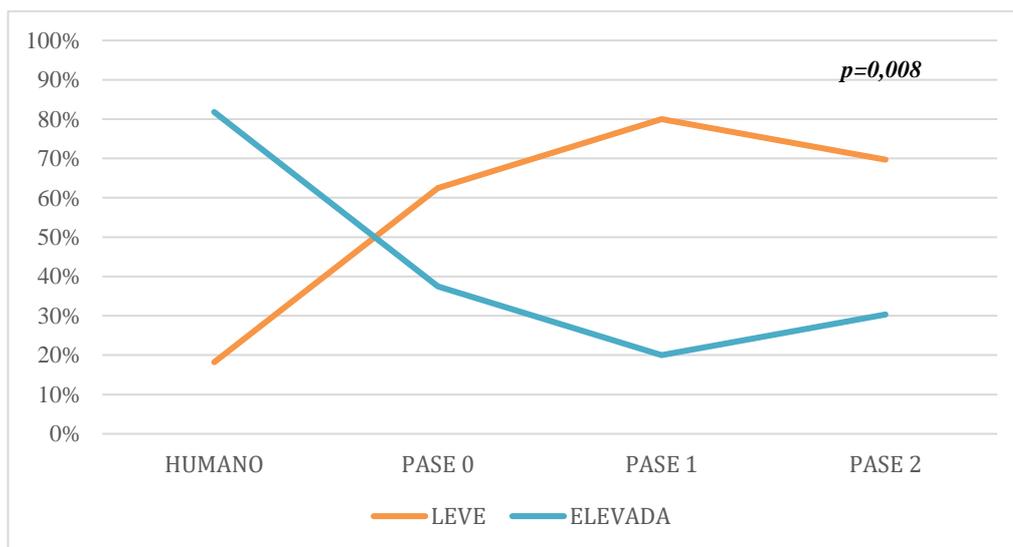


Figura 85. Tendencia de la expresión de CD31 a lo largo de los pases

Debido a la significación estadística entre el descenso de la angiogénesis a lo largo de los pases ($p=0,008$), para determinar que pases presentaban diferencias respecto al humano, comparamos la expresión de CD31 en cada pase de forma independiente con los humanos. Aplicamos el test de χ^2 o el test exacto de Fisher. La correlación se consideró significativa si la $p < 0,01667$.

Se aprecia que en el Pase 0 se mantienen características similares al humano aunque existe una tendencia hacia el aumento de la muestras con una expresión de CD31 baja ($p=0,073$). Sin embargo tanto en el Pase 1 como en el Pase 2 existen diferencias estadísticamente significativas que ponen de manifiesto una menor expresión de CD31 en las muestras murinas respecto al humano ($p=0,0017$ en el Pase 1 y $p= 0,0045$ en el Pase 2) (Figura 86).

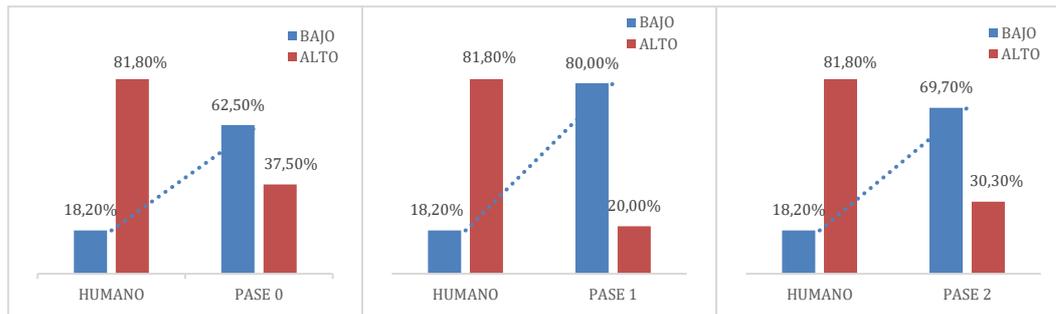


Figura 86. Análisis de la angiogénesis de cada pase con el humano

3.3.2.1. Análisis de la angiogénesis de los modelos a lo largo de los pases

Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas en la angiogénesis a lo largo de los pases en el modelo subcutáneo e intraabdominal. (*Subcutáneo*: $p=0,049$ e *Intraabdominal* $p=0,069$). Sin embargo estas se encuentran cerca de la significación estadística. Se consideró significativo si $p < 0,016$. (Figura 87 y Figura 88)

Por el contrario el modelo pancreático, presenta diferencias significativas a lo largo de pases observando un aumento de las muestras con baja expresión de CD31 a medida que avanzan los pases ($p=0,001601$) (Figura 89).

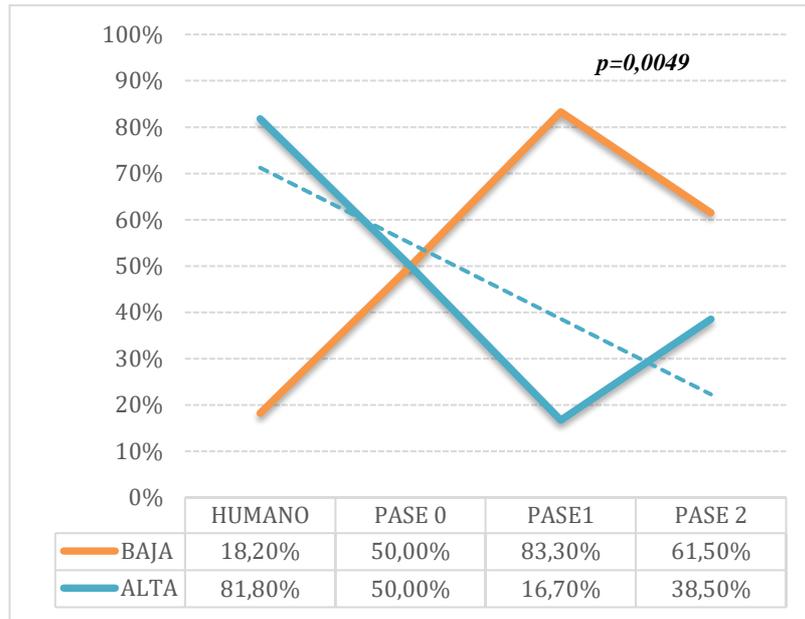


Figura 87. Expresión de CD31 a lo largo de los pases en el modelo subcutáneo. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

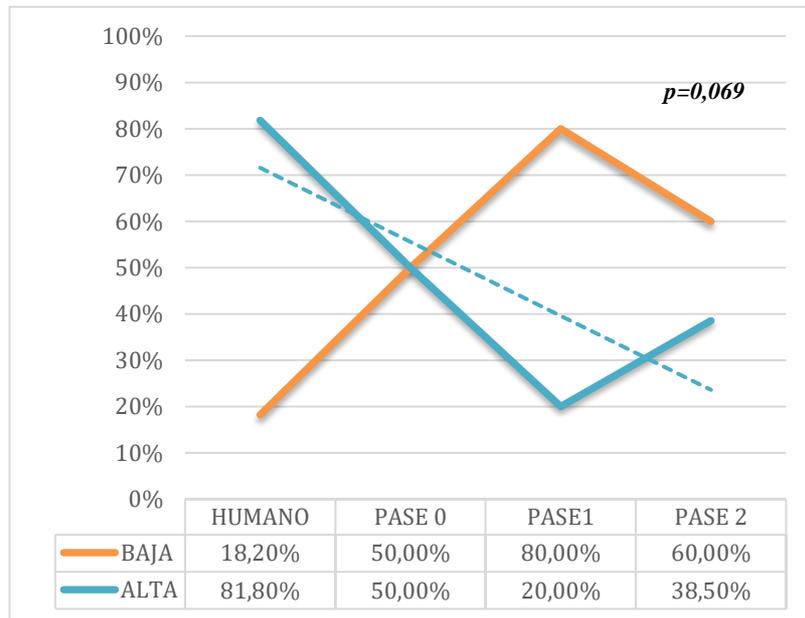


Figura 88. Expresión de CD31 en el modelo intraabdominal a lo largo de los pases. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

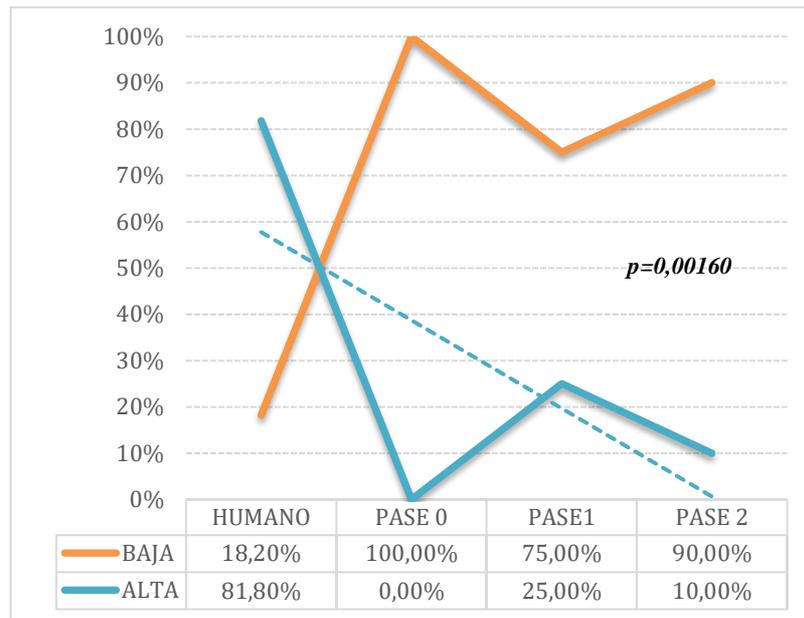


Figura 89. Expresión de CD31 del modelo pancreático a lo largo de los pases. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$.

Se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de CD31 a medida que avanzan los pases en todos los modelos. Pero tan sólo en el modelo pancreático se aprecia una disminución significativa de las muestras con alta expresión de CD31 a lo largo de los pases, es decir, se aprecia una disminución significativa de la angiogénesis.

3.4. TUNEL: APOPTÓISIS

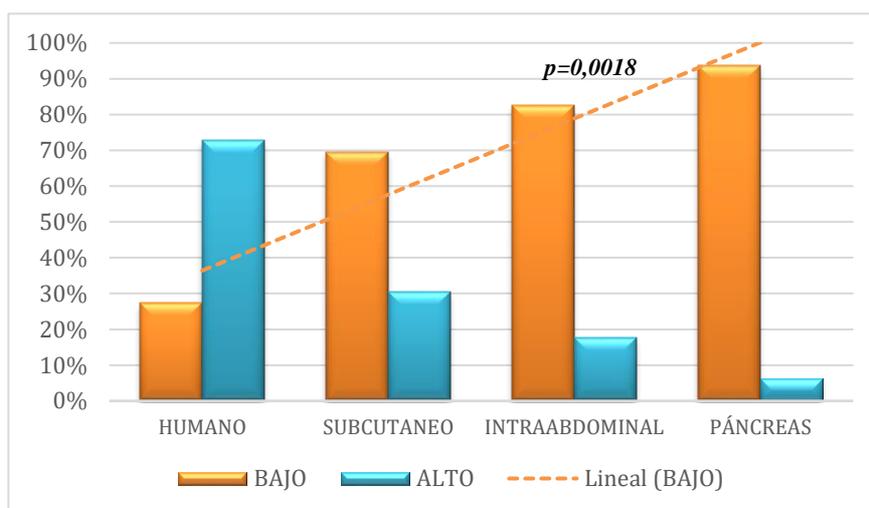
3.4.1. TUNEL y los modelos animales.

Hemos apreciado diferencias estadísticamente significativas entre el grado de apoptosis en el humano y el resto de modelos animales ($p=0,0018$). La mayoría de las muestras humanas presentaros una apoptosis elevada ($n=8$; 72,7%) lo que contrasta con los modelos experimentales en los que la mayoría de las muestras presentaron una apoptosis leve. Además, destaca el modelo pancreático en el que hasta el 93,8% de las muestras presentaron un a apoptosis leve (Tabla 38 y Figura 90).

Tabla 38. Tabla de contingencia. Impacto de la apoptosis en los modelos

		Modelos (%)					p
		HUMANO	SUBCUTANEO	INTRAABDOMINAL	PANCREÁS	TOTAL	
TUNEL	Bajo	3 (27,3%)	16 (69,6%)	14 (82,4%)	15 (93,8%)	48 (71,6%)	0,0018
	Alto	8 (72,7%)	7 (30,4%)	3 (17,6%)	1 (6,3%)	19 (28,4%)	
	Total	11 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	16 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

**Figura 90.** Grado de apoptosis en los modelos animales

Debido a que apreciamos diferencias estadísticamente significativas entre la apoptosis en los distintos modelos y el humano, comparamos la expresión de TUNEL de cada modelo de forma independiente con los humanos. La "p" fue significativa si era $< 0,01667$.

Tras aplicar *Test de χ^2* /*Test exacto de Fisher* se aprecia una disminución de la expresión de TUNEL estadísticamente significativa en los modelos intraabdominales y pancreáticos con respecto a las muestras humanas. Es especialmente llamativa en el caso de los modelos pancreáticos en el que se observa una mayoría de muestras con baja expresión de TUNEL. (Modelo subcutáneo vs humano $p=0,03$; Modelo intraabdominal vs humano $p=0,006$; Modelo pancreático vs humano $p= 0,0005$) (Figura 91).

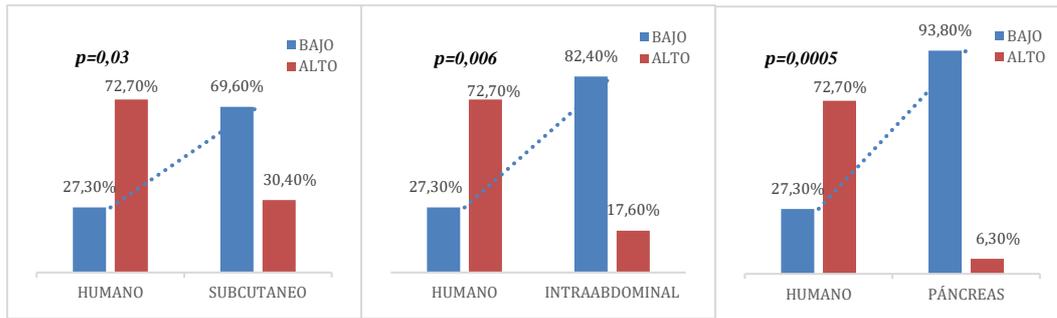


Figura 91. Análisis de la apoptosis de cada modelo con el humano

3.4.2. TUNEL a lo largo de los pases

Se observa un aumento de las muestras con expresión baja de TUNEL. Es decir, a medida que avanzan los pases se aprecia un descenso significativo de la apoptosis. La diferencias encontradas son estadísticamente significativas ($p=0,0042$) (Tabla 39 y Figura 92).

Tabla 39. Tabla de contingencia. Impacto de la apoptosis en los pases

		Pases (%)					p
		HUMANO	PASE 0	PASE 1	PASE 2	TOTAL	
TUNEL	Bajo	3 (27,3%)	6 (75%)	11 (73,3 %)	28 (84,8%)	48 (71,6%)	0,0042
	Alto	8 (72,7%)	2 (25%)	4 (26,7%)	5 (15,2%)	19 (28,4%)	
	Total	11 (100%)	8 (100%)	15 (100%)	33 (100%)	67 (100%)	

El valor de la "p" fue generado a partir del Test de exacto de Fisher. Se alcanzó la significación estadística con una $p < 0,05$

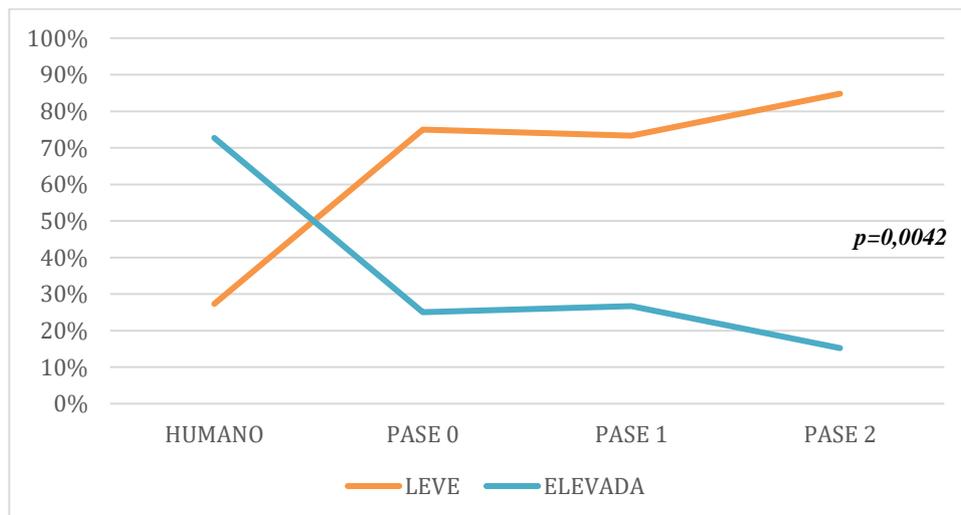


Figura 92. Tendencia de la apoptosis a lo largo de los pases

Debido a que apreciamos diferencias estadísticamente significativas comparamos la expresión de TUNEL de cada pase de forma independiente con los humanos (“p” fue significativa si $< 0,01667$).

Tras aplicar *Test de χ^2 / Test exacto de Fisher* se aprecia un tendencia hacia un aumento de las muestras con expresión baja de TUNEL a medida que avanzan los pases pero tan sólo en el Pase 2 se aprecia una disminución estadísticamente significativa de la apoptosis (Pase 0 vs humano $p=0,07$; Pase 1 vs humano $p=0,045$; Pase 2 vs humano $p= 0,0007$) (Figura 93).

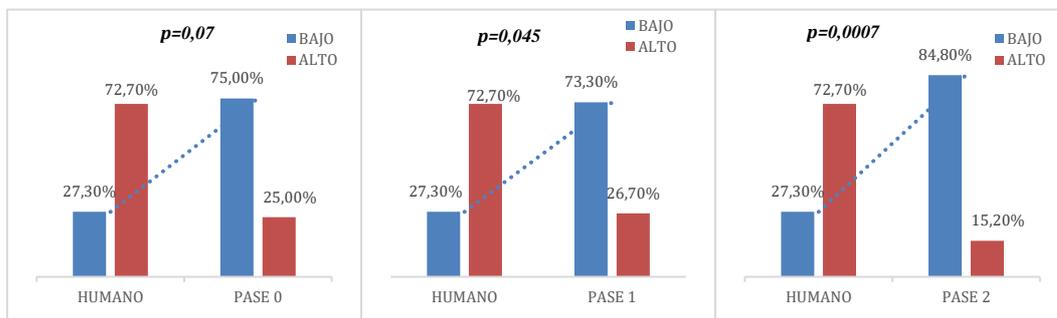


Figura 93. Análisis de la apoptosis de cada pase con el humano

3.4.2.1. Análisis de la apoptosis en los modelos experimentales a lo largo de los pases

Se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de TUNEL a medida que avanzan los pases en todos los modelos. Pero es en el modelo intraabdominal y pancreático donde se aprecia una disminución significativa de las muestras con alta expresión de TUNEL a lo largo de los pases, es decir, se aprecia una disminución significativa de la apoptosis.

No existen diferencias estadísticamente significativas en la apoptosis a lo largo de los pases en el modelo subcutáneo ($p=0,091$). (Figura 94). Por el contrario el modelo intraabdominal y el modelo pancreático, presenta diferencias significativas a lo largo de pases observando un aumento de las muestras con baja expresión de TUNEL a medida que avanzan los pases ($p= 0,0145$ y $p= 0,0030$) (Figura 95 y Figura 96).

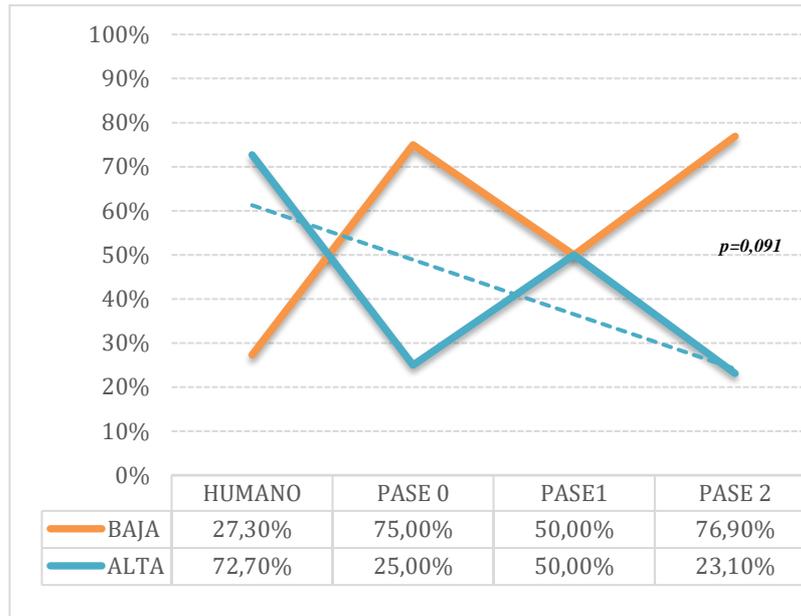


Figura 94. Expresión TUNEL en el modelo subcutáneo a lo largo de los pases. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

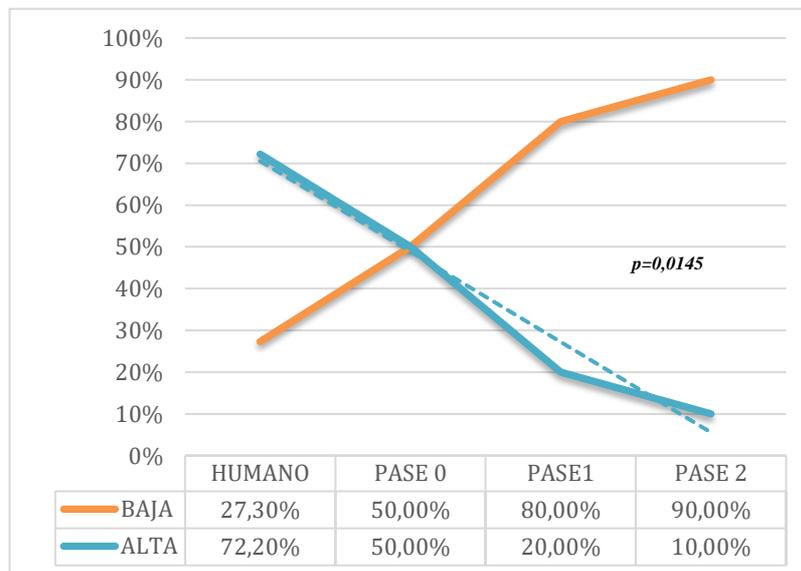


Figura 95. Expresión de TUNEL a lo largo de los pases en el modelo intraabdominal. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

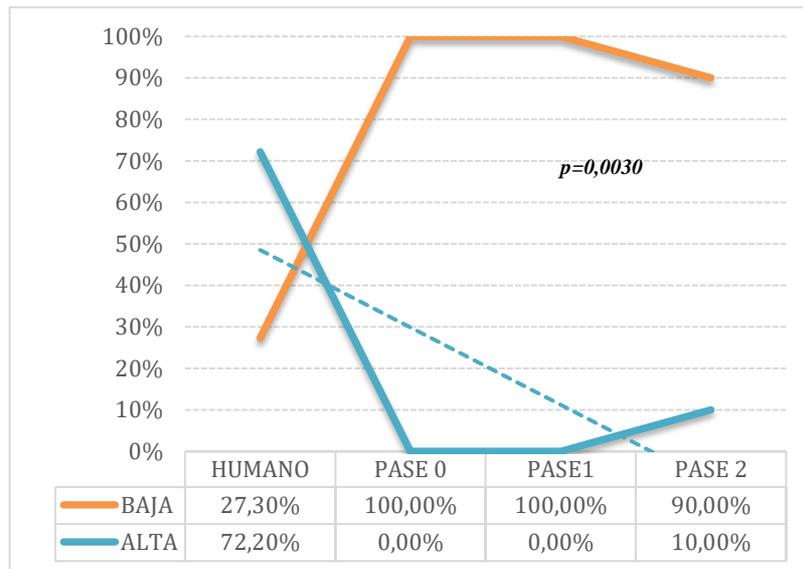


Figura 96. Expresión de TUNEL del modelo pancreático. Línea intermitente azul: tendencia de la muestras con expresión alta. Test de exacto de Fisher. Se consideró significativo si $p < 0,016$

Como resumen del **apartado 3.4 (TUNEL: Apoptosis)** podemos decir que existe una disminución de la apoptosis en todos los modelos. También se aprecia una disminución global de la apoptosis a medida que avanzan los pases.

Por último cuando analizamos de forma individual la expresión de TUNEL en cada modelo a lo largo de los pases se aprecia una disminución de la apoptosis en el modelos intraabdominal y pancreático.

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo surge de la preocupación actual de nuestra sociedad y del mundo científico por uno de los tumores más letales existentes en la actualidad; el ADCP y los carcinomas periampulares.

Con una mortalidad próxima al 100% el ADCP supone la octava causa de muerte por cáncer. Aproximadamente, cerca de un cuarto de millón de personas fallecerán anualmente por esta causa (14).

Como es coincidente en toda la literatura, la cirugía es la única opción curativa del ADCP. Sin embargo la supervivencia a 5 años de los escasos pacientes que pueden beneficiarse de una resección quirúrgica no alcanza el 25% (88).

Ante estos pobres resultados, urge el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar los resultados clínicos para del ADCP y de los carcinomas periampulares. El implante inmediato de xenoinjertos en modelos experimentales puede ser una arma muy útil para definir algunas características inmunohistoquímicas y moleculares de los tumores sólidos humanos como han demostrado distintos grupos en el caso de neoplasias hepáticas, pulmonares o de la mama (45,71,73,74,75,76).

Por otro lado, los xenoinjertos en modelos experimentales se han empleado para identificar quimioterápicos eficaces en el tratamiento contra estos tumores. Desafortunadamente, existen escasos modelos animales sobre los tumores periampulares y en el ADCP que expresen las mismas características que en el humano (89). El objetivo de esta tesis doctoral es desarrollar 3 modelos distintos de carcinoma periampular en ratones inmunodeprimidos y definir la histología e inmunohistoquímica de los tumores generados en cada uno de ellos. De esta manera podremos determinar cuál es el que conserva mejor las características del tumor nativo. Este proyecto forma parte de una línea de investigación más ambiciosa que pretende identificar tratamientos útiles para los tumores periampulares y el ADCP a través de modelos experimentales que reproduzcan las características del tumor humano.

1. MOTIVO POR EL QUE REALIZAMOS ESTE TRABAJO

Por todo ello, es necesario continuar la investigación en la dirección de otros tipos de tratamientos que mejoren los resultados. En nuestro caso, nos hemos dirigido hacia la búsqueda de un modelo experimental generado a partir de un injerto extraído de un tumor humano implantado a tres niveles diferentes en el ratón.

La gran mayoría de los trabajos que se esfuerzan en intentar ampliar nuestro conocimiento sobre el diagnóstico y tratamiento del carcinoma periampular y del ADCP, se basan en xenoinjertos procedentes de líneas celulares cultivadas in vitro. En nuestro caso, hemos establecido tres modelos de implante de tumores periampulares procedentes de distintos pacientes y hemos comparado las características morfológicas e inmunológicas de los xenoinjertos con aquellos tumores de los que procedían. Nuestra intención es seleccionar la mejor vía de implante con el objetivo de utilizar estos modelos en un futuro para detectar biomarcadores del cáncer de páncreas y para desarrollar regímenes terapéuticos quimioterápicos específicos para cada paciente.

2. DISCUSIÓN SOBRE EL MODELO ANIMAL UTILIZADO: EL ROEDOR.

Los modelos experimentales constituidos por roedores de laboratorio son las especies más utilizadas no solo en el área oncológica sino en el estudio de infinidad de patologías. Si bien, los resultados obtenidos en los ratones de laboratorio no son directamente extrapolables al humano, ofrece una serie de ventajas sobre otros modelos de experimentación. Algunas de las ventajas son:

1. Gran parte de los procesos bioquímicos y fisiológicos son muy similares al humano por ser un mamífero.
2. Tiene un tiempo generacional muy corto y un alto índice reproductivo, su talla es pequeña y son relativamente dóciles.

3. Se puede controlar con relativa facilidad las variables ambientales, fundamentales para el desarrollo correcto de los experimentos, permitiendo su fácil reproductividad. Su mantenimiento en cautiverio es fácil y económico.
4. Dentro de los mamíferos, junto con la especie humana es de las más estudiadas.
5. Existe una gran cantidad de líneas definidas genéticamente, como las consanguíneas y congénitas además de cientos de mutaciones y un gran número de reordenamiento cromosómicos disponibles. Podemos producir líneas de individuos genéticamente idénticos.
6. Se conocen los mapas genéticos así como la secuencia completa del genoma; al publicarse el primer mapa detallado del genoma del ratón, se halló que al menos el 80% del ADN de los ratones es idéntico al de los humanos (90,91).

El uso del ratón para la investigación del cáncer tiene ventajas y desventajas (ver Tabla 40). Sin embargo, comprendiendo las desventajas y tomándolas en cuenta durante la interpretación de los resultados de las investigaciones, el ratón sigue siendo una de las herramientas más valiosas para comprender mejor el desarrollo del cáncer.

Tabla 40. Ventajas y desventajas generales de los modelos humanos basados en el ratón

<i>VENTAJAS</i>	<i>DESVENTAJAS</i>
Tamaño pequeño que facilita su cuidado	No necesariamente refleja las características genéticas y epigenéticas de los tumores humanos
Ciclo de vida corta	Mayor rapidez metabólica que el humano
Posibilidad de manipulación y análisis genético	Algunas vías de señalización funcionan de forma diferente al humano
Similitud fisiológica y molecular con el humano	Muchos modelos basados en el ratón son raramente metastásicos
Genes que se derivan de un ancestro común con el humano	
Genoma ya secuenciado	

3. DISCUSIÓN SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

3.1. ELECCIÓN DEL MURINO: RATÓN HSD ATHYMIC NUDE-FOXN1^{NU}

La primera cuestión que se nos plantea es la elección del roedor para la elaboración del modelo experimental. Los murinos (Murinae) son una subfamilia de roedores miomorfos perteneciente a la Muridae, que incluye a los comúnmente llamados ratones y ratas del viejo mundo. Incluye al menos 519 especies.

Roedores como el hámster Sirio o la rata Wistar, han sido ampliamente utilizados en el estudio del cáncer de páncreas dado su rápida cría, fácil manejo en el animalario y sencilla toma de muestras (58,59).

De esta forma, el hámster Sirio y la rata Wistar se reservan para experimentación en el cáncer de páncreas inducida por carcinogénicos. Desafortunadamente, el perfil genético del ADCP inducido por estas sustancias en el ratón no se encuentra bien definido, limitando la aplicación de estos modelos en estudios que abarquen la genética molecular y el estudio de las vías de señalización tumoral. Además, los carcinógenos producen a menudo efectos colaterales en otros tejidos, lo que reduce su valor como modelo animal en los estudios preclínicos (92).

Por último, en estos animales es poco probable el desarrollo del injerto humano debido el probable rechazo por su sistema inmune. Desde los años 70, se han utilizado muestras de cánceres humanos tomados mediante biopsia o mediante cirugía que posteriormente han sido implantados directamente en ratones (22,78). Estos xenoinjertos, también conocidos como “tumorgraft” mantienen la morfología tumoral inicial así como las mutaciones genéticas que le acompañan. Sin embargo, estos modelos fueron inicialmente desechados debido a su alto índice de rechazos.

Recientemente, se ha retomado la línea de investigación de los xenoinjertos, gracias al desarrollo de nuevas cepas de ratones inmunodeprimidos modificadas genéticamente que han minimizado las tasas rechazo. Este es el motivo por el cual, hemos empleado animales de experimentación de la especie *Mus musculus* y la cepa Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}.

Esta cepa es un tipo de ratón atímico e inmunodeprimido que permite el crecimiento de los injertos sin rechazo inmunitario (89,93).

3.2. ELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL: XENOINJERTOS

Actualmente existen una docena de modelos experimentales disponibles. Las características moleculares de estos modelos pueden variar de una manera sustancial con la morfología de la lesión, y así, la selección del modelo no es trivial (94). En los últimos años la ingeniería genética se ha desarrollado ampliamente permitiendo la reproducción de ratones modificados genéticamente (GEMM) que desarrollan toda la gama de lesiones tumorales relacionadas con el cáncer periampular, desde lesiones tempranas hasta adenocarcinomas ductales infiltrantes (94). Los modelos GEMM se establecen gracias a la introducción de un aminoácido que habitualmente se corresponde con un oncogén mutado en un tumor sólido. Las mutaciones en KRAS, TP53, p16 o SMDA4, por ejemplo, producen un amplio espectro de lesiones que van desde lesiones premalignas hasta adenocarcinomas invasores (71,74,76,94,95,96).

Aunque aparentemente los ratones modificados genéticamente pueden ayudarnos a explicar la vía por las cuales se desarrollan los ADCP y a realizar estudios de fármacos preliminares, las características de los tumores que desarrollan los roedores no son idénticos a los humanos. Un ejemplo es el visto en la vía Hedgehog (Hh) efectora de la proteína Gli2 que coopera con KrasG12D para promover la formación de Adenocarcinoma ductal (97). Se ha visto que los tumores desarrollados por la vía Hh desarrollan un estroma tumoral en el que la difusión del fármaco se encuentra incrementada y por tanto la respuesta al quimioterápico es mayor. Tanto el uso en monoterapia de los fármacos inhibidores de la vía Hh o la combinación de los mismos con gemcitabina mostraron un aumento de la supervivencia y una disminución de las metástasis en los modelos animales (94).

Aunque estos modelos nos permiten entender la genética tumoral y nos aportan valiosa información en los estudios preclínicos, los resultados no son extrapolables a los humanos. Por ello algunos autores proponen el uso de modelos animales derivados de

tumores o células humanas que sean idénticos al tumor origen y en el que la quimioterapia pueda ser evaluada con exactitud.

Por esta razón, múltiples laboratorios han establecido modelos de xenoinjertos de mama, cáncer de cabeza y cuello, y tumores hepatocelulares que mantiene las características del tumor primario del que proceden. Algunos de estos modelos han predicho la respuesta clínica de un tipo específico de tumor a distintos agentes quimioterápicos (33,71,75,76,89). La principal ventaja de los injertos tumorales humanos en el ratón es que parecen conservar las características anatomopatológicas e inmunohistoquímica del tumor primario lo que nos puede permitir experimentar con fármacos con modelos de cáncer de páncreas similares al humano.

Sin embargo, el grado en el que los implantes de carcinoma periampular y el ADCP reflejan las características morfológicas e histológicas de sus tumores de origen han sido escasamente estudiadas y existen pocas publicaciones al respecto. Por esta razón, nuestro grupo que cuenta con una amplia experiencia en el campo de los modelos experimentales de ADCP inducidos por medio de sustancias químicas como el BOP, ha investigado en el presente estudio el desarrollo de modelos experimentales de xenoinjertos de tumores periampulares en ratones inmunodeprimidos. El objetivo es reproducir las características de los tumores humanos para conseguir un modelo murino fidedigno del cáncer periampular y el ADCP para en un futuro poder estudiar las vías moleculares así como experimentar con nuevos fármacos quimioterápicos (60,61,62).

3.3. ELECCIÓN DE LA VÍA DE IMPLANTE: SUBCUTÁNEA, INTRAABDOMINAL Y PANCREÁTICA

En el establecimiento de modelos de xenoinjertos derivados del paciente, las muestras de tumores primarios se implantaron en los ratones inmunodeprimidos por vía subcutánea, intraabdominal u ortotópica, sin paso intermedio de propagación in vitro.

Aunque el modelo subcutáneo es fácil de realizar mediante una incisión con el bisturí frío en el dorso del ratón, el microambiente del tumor no es exactamente el mismo. Por ello, nos planteamos un paso más allá mediante el diseño del modelo intraabdominal y del pancreático que pueden reproducir las condiciones naturales del cáncer periampular.

El modelo murino subcutáneo heterotópico es relativamente rápido, coste-efectivo, sin gran dificultad técnica y con buenos resultados a nivel preclínico, pero cuando los regímenes quimioterápicos son probados en humanos, no se reproducen los resultados prometedores obtenidos en los murinos (92). Además, los modelos subcutáneos raramente desarrollan metástasis (73). En contraste, en los modelos ortotópicos en los que las células tumorales son inyectadas directamente en el órgano del que proceden, las metástasis aparecen frecuentemente. Se ha observado que cerca del 60% de los xenoinjertos pancreáticos pueden diseminarse a otros lugares (98). El microambiente de los xenoinjertos ortotópicos es más comparable al humano y por ello estos modelos pueden ser más valiosos en los estudios preclínicos con fármacos para predecir su respuesta clínica en humanos

En un intento de desarrollar un ambiente de crecimiento más idóneo y que se asemeje todo lo posible a las condiciones en el humano, además del modelo subcutáneo hemos desarrollado otros dos modelos más, hasta ahora no publicados en la literatura: el modelo intraabdominal y el modelo ortotópico (pancreático).

En relación a estos dos últimos modelos, aunque las ventajas que ofrecen son numerosas y son más fisiológicos, también son procedimientos más invasivos con mayor morbimortalidad para el modelo murino. Al realizar la laparotomía corremos el riesgo de producir una enterotomía accidental. Por otro lado, la manipulación del páncreas también puede ocasionar morbilidad como sangrados o inflamación de la glándula (pancreatitis). Otra desventaja de este modelo es que a diferencia del modelo subcutáneo resulta difícil medir el crecimiento del tumor. La única manera de hacerlo en los modelos intraabdominal y pancreático es con pruebas de imágenes, muchas veces costosas y que no se encuentran disponibles en todos los laboratorios o bien con una laparotomía antes de proceder al sacrificio del ratón.

A pesar de ello, estos tipos de modelos animales pueden ser un espejo del cáncer en el humano que nos permita desarrollar fármacos más eficaces contra el cáncer de páncreas. Debido a su relevancia clínica los modelos de xenoinjertos ortotópicos han emergido como una herramienta de elección sobre los modelos experimentales subcutáneos, o como un segundo paso para validar los resultados obtenidos con los xenoinjertos subcutáneos (99).

4. DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El advenimiento de los modelos experimentales ha permitido la reevaluación de la fisiopatología celular y molecular del cáncer de páncreas. Hoy en día es posible reclutar e implementar estos modelos para la evaluación de fármacos anticancerosos.

El beneficio limitado pero medible de la quimioterapia adyuvante apoya la premisa de que los tratamientos sistémicos también pueden ayudar a detener la progresión del cáncer de páncreas (100,101) y permitir una resección quirúrgica en un segundo tiempo. Sin embargo, el desafío es identificar el esquema quimioterápico más efectivo basándonos en el modelo más aproximado al humano.

El desarrollo de estos modelo in vivo mediante el implante de xenoinjerto tiene tres objetivos fundamentales en la literatura:

1. Estudiar el desarrollo del ADCP y de los tumores periampulares desde el punto de vista molecular.
2. La evaluación de quimioterápicos existente o de nuevas moléculas (102,103).
3. La identificación del genotipo y/o fenotipo molecular y correlacionarlo con la respuesta de los regímenes de tratamiento y la supervivencia de los pacientes (104).
4. La posibilidad de utilizar este tipo de modelos para diseñar terapias personalizadas (105,106).

El objetivo principal de este estudio es generar modelos animales directamente desde tejido tumoral del paciente, empleando xenoinjertos de ADCP y tumores periampulares. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que los modelos experimentales generados a partir de xenoinjertos humanos guardan las características histológicas e inmunohistopatológicas entre el espécimen humano y el roedor. Para ello, nos hemos basado en la tinción con hematoxilina y Eosina, tricrómico de Masson y la expresión de determinadas proteínas (Ki67, CD31, alfa-SMA y TUNEL).

Para valorar el desarrollo tumoral del xenoinjerto se decide:

1. El análisis de las características que favorecen el desarrollo del xenoinjerto en el ratón.
2. Valoración de la morbimortalidad en los tres modelos propuestos y la evolución del peso del ratón.
3. Comparación de las características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas de los xenoinjertos a lo largo de los pases y de los tres modelos animales desarrollados.

4.1. DESARROLLO DE LOS XENOINJERTOS

En primer lugar, es de desatacar una tasa global de desarrollo tumoral en los roedores implantados del 61,1%, quedando patente la viabilidad de los xenoinjertos tumorales.

Nuestro estudio se diferencia de otros publicados en la literatura en que el tumor fue implantado directamente en el ratón desnudo tras la toma directa de la muestra de la pieza quirúrgica. Las células tumorales no fueron cultivadas in vitro ni se utilizó colagenasa o Matrigel para facilitar su implante. Este punto junto con la rápida implantación facilita el procedimiento y elimina sesgos secundarios al procesamiento de las células tumorales (aberraciones en el ADN y muerte celular).

Aunque controvertido, algunos autores sugieren que puede existir una asociación potencial entre el desarrollo del xenoinjerto y el tiempo entre la resección del tumor y el implante del injerto (107). En nuestra serie el tiempo hasta el implante osciló entre 15 minutos y dos horas. En el estudio de García et al. (77) que emplea xenoinjertos de adenocarcinoma ductal de páncreas, presentó tiempos de implante menores y más homogéneos (menos de una hora) consiguiendo tasas de implante de hasta el 85%. Los tiempos heterogéneos en nuestra serie, podrían justificar una menor tasa de implante respecto a la de García et al. (77)

Cuando comparamos las tasas de desarrollo tumoral y lo correlacionamos con las características clínicas de los pacientes y la anatomía patológica de las muestras tumorales humanas implantadas en el ratón (grado de diferenciación, el grado de fibrosis, la proliferación celular, número de mitosis por campo, fibrogénesis, angiogénesis y la

apoptosis) no encontramos diferencias estadísticamente significativas que indiquen que alguna de estas características clínicas o anatomopatológicas se correlacionara con el desarrollo del xenoinjerto en el murino. La aparente falta de correlación entre cualquiera de estos parámetros y la tasa de implante puede reflejar un fenómeno biológico real o puede ser debido a un número insuficiente de tumores humanos en algunas categorías. Aunque, en nuestra experiencia, no existen diferencias significativas, debemos tener en cuenta que nos encontramos ante un estudio experimental y que los resultados obtenidos indican que existe una tendencia hacia un mayor desarrollo tumoral en aquellos pacientes con tumores que son más indiferenciados, presentan menos fibrosis y más número de mitosis y con una mayor índice de proliferación celular y angiogénesis. También es especialmente llamativo que los dos únicos tumores humanos con una anatomía patológica de adenocarcinoma ampular (H2 y H8) y los xenoinjertos derivados de los mismos presentan una tasa de desarrollo tumoral muy elevada. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas respecto al ADCP, es un aspecto a tener en cuenta en próximos estudios.

4.1.1. Desarrollo tumoral a lo largo de los pases

A medida que avanzan los Pases el desarrollo tumoral de los xenoinjertos aumenta de forma significativa. La tasa de implante entre murinos (Pase 1 y Pase 2) es mayor que la tasa exitosa de xenoinjertos desde el humano hasta el ratón (Pase 0). Es destacable el aumento de implantes exitosos durante el Pase 1, que parece estabilizarse en el Pase 2 aunque persiste una tendencia al alza. Ello sugiere que a medida que avanzan las generaciones de xenoimplantes se produce algún fenómeno que facilita el injerto del tumor. Probablemente, trazas de tejido murino son implantadas junto con el xenoinjerto humano lo que favorecen su desarrollo en el nuevo huésped.

4.1.2. Desarrollo tumoral en los modelos experimentales

Cuando analizamos la tasa de desarrollo tumoral en los tres modelos (subcutáneo, intraabdominal y páncreas) nuevamente observamos un aumento progresivo de la tasa exitosa de implante a medida que avanzan los pases. Pero es el modelo *subcutáneo* el que parece desarrollar mayor número global de implantes a pesar de que no existen diferencias significativas a favor de ninguno de los modelos descritos.

4.2. TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD

4.2.1. Análisis del tiempo libre de tumor a lo largo de los pases

Se observa un desarrollo tumoral más rápido y mayor número de casos en los pases entre ratón-ratón, respecto al pase entre humano-ratón con una diferencia estadísticamente significativa.

El pase entre ratón-ratón (es decir Pase 1 y Pase 2) presenta ciertas ventajas que facilitan el desarrollo más precoz del tumor. Principalmente se produce una murinización del tumor que facilita el implante exitoso del injerto. Probablemente la disminución de la apoptosis y la fibrogénesis a medida que avanzan los pases facilitan el desarrollo tumoral.

4.2.2. Análisis del tiempo libre de tumor en los modelos experimentales

Cuando analizamos el tiempo libre de tumor en los tres modelos (subcutáneo, intraabdominal y páncreas) observamos que no existen diferencias, pero en el modelo subcutáneo existe una tendencia hacia un menor tiempo libre de tumor.

Aunque los tres modelos presentan características similares en cuanto a diferenciación, fibrosis, proliferación celular, fibrogénesis, angiogénesis y apoptosis, el desarrollo tumoral parece ser más precoz en el modelo subcutáneo. Una detección precoz del tumor supone también un mayor ahorro. Cada semana de vida del murino presenta un coste de cinco euros teniendo en cuenta gastos tangible (pienso, agua y personal de mantenimiento) e intangibles. La mediana del tiempo libre de tumor fue de nueve semanas y media en el caso del modelo subcutáneo versus 21 y 19 semanas en el modelos intraabdominal y en el modelo pancreático respectivamente. Esto supone un coste de 47,5 euros por ratón en el modelo subcutáneo antes de que el tumor pueda ser detectado frente a un coste de 105 euros/ratón en el modelo intraabdominal y 95 euros/ratón en el modelo pancreático.

Sin embargo, teniendo en cuenta que los tres modelos tienen rasgos anatomopatológicos e inmunohistoquímicos similares, tiene que existir un factor que favorezca el desarrollo del modelo subcutáneo. Probablemente, el implante en el abdomen y en el páncreas queda oculto durante más tiempo al estar injertado en una cavidad distensible. En caso de contar

con medios de imagen como la resonancia magnética nuclear probablemente se pondría de manifiesto un crecimiento similar al modelo subcutáneo, sin embargo esta prueba encarecería el coste del experimento.

4.3. MORBIMORTALIDAD

4.3.1. Mortalidad por pase

Existe una tendencia hacia la disminución de la mortalidad a medida que avanzan los pases. Probablemente esta tendencia hacia la disminución de la mortalidad puede estar en relación con la curva de aprendizaje de los investigadores. A pesar de que todos eran cirujanos experimentados el modelo animal tiene una estructura anatómica y una consistencia de los tejidos diferentes al humano, que puede hacer que la mortalidad haya sido mayor durante los primeros pases.

4.3.2. Morbimortalidad por modelo

Los modelos intraabdominales y pancreático presentan una mayor tendencia hacia la mortalidad. La ausencia de significación puede ser real o debida a una muestra pequeña.

Dos factores pueden influir en una mayor mortalidad en estos dos últimos modelos. En primer lugar, tanto la laparotomía media practicada en el modelo intraabdominal como la incisión subcostal del modelos pancreático son más agresivas y susceptible de complicaciones (evisceración, enterotomía desapercibida, lesión de vísceras sólidas, pancreatitis...). En segundo lugar como ya hemos comentado anteriormente, a diferencia del modelos subcutáneo tanto en el modelo intraabdominal como en el pancreático, el xenoinjerto se desarrolla dentro de una cavidad en el que el crecimiento tumoral puede pasar inadvertido, por lo que el tumor puede llegar a infiltrar estructuras vitales que conduzcan a la muerte del ratón sin ser apreciado por el investigador.

Esta teoría queda patente al analizar la morbilidad de los tres modelos. Hemos detectado 5 casos de peritonitis distribuidos entre dos modelos intraabdominales y tres modelos pancreáticos. Todos los ratones que sufrieron una peritonitis murieron. En tres casos (ratones T1.I.4A, T3.I.P.S.8 y T2.P.S.8) la peritonitis apareció meses después del implante y durante la autopsia se apreció un gran crecimiento tumoral inadvertido. En los

otros dos casos, uno presentó una enterotomía desapercibida (ratón T2.P.S.2) y el otro caso, se debió a una reacción pancreática (ratón T1.P.3). Además en un modelo intraabdominal observamos ascitis como consecuencia de la infiltración el eje esplenoportal (ratón T3.I.I.S.8).

Otro factor que puede haber influido en la aparición de morbilidad ha sido el sexo. Todos los ratones eran machos para evitar posible interferencias hormonales en el experimento. Sin embargo, estos suelen tener un comportamiento más agresivo. Fue necesario mantener a los ratones en jaulas aisladas para evitar que se lesionaran. Esta agresividad queda patente en los modelos. En el modelo intraabdominal, dos roedores se comieron los puntos de laparotomía y en el modelo subcutáneo detectamos dos casos de aparición de úlceras cutáneas cercanas a la zona del implante. Probablemente estas úlceras fueron provocadas por los propios ratones en un intento de arrancarse el xenoinjerto (murinos T1.S.2 y T1.S.9).

4.4. PESO

En todos los modelos se aprecia un aumento progresivo del peso que probablemente esta en relación con el crecimiento propio del ratón. Entre la 5^o y la 6^o semana el ratón alcanza la madurez. A partir de este momento se continúa apreciando un ascenso del peso menos marcado tendiendo a la estabilización.

4.4.1. Correlación del porcentaje de peso en la semana 10 con el desarrollo tumoral

Analizamos el peso de los ratones en la semana 10 porque en esta semana los murinos son adultos, la mayoría todavía están vivos y es probable que los tumores que se van a desarrollar ya hayan crecido aunque clínicamente no sean evidentes.

Se aprecia un aumento significativo del peso en aquellos ratones que desarrollaran tumor independientemente del modelo empleado. Este dato es relevante porque puede ser un indicador de aquellos ratones que van a desarrollar el tumor de una forma sencilla. Esto es especialmente importante en el modelo intraabdominal y pancreático en los que no contamos con datos visuales para evidenciar el crecimiento.

4.5. ANATOMOPATOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LOS XENOINJERTOS

4.5.1. Hematoxilina y Eosina: Diferenciación celular

4.5.1.1. Diferenciación celular a lo largo de los pases

Cuando analizamos la diferenciación global de los tumores a lo largo de los pases no apreciamos diferencias estadísticamente significativas.

Cuando analizamos la diferenciación celular por pase y por modelo tampoco encontramos diferencias entre ninguno de los modelos desarrollados en ninguno de los pases. De esta forma podemos decir que los tres modelos parecen mantener el mismo grado de diferenciación a lo largo de los tres pases, es decir mantiene el mismo grado de diferenciación del humano.

4.5.1.2. Diferenciación celular y modelos animales

No hemos encontrado diferencias significativas entre el grado de diferenciación de las muestras humanas y ninguno de los modelos experimentales. De esta forma, los xenoinjertos de los modelos experimentales conservan el grado de diferenciación del humano independientemente del modelo en el que se implanta (subcutáneo, intraabdominal o páncreas). Lo que sugiere que los xenoinjertos en ratones inmunodeprimido independientemente del lugar de implantación pueden ser modelos válidos para el estudio de quimioterápicos al reproducir las características humanas.

En cualquier caso, parece existir una tendencia no significativa hacia la indiferenciación de las muestras subcutáneas e intraabdominales, ello podría justificar que exista una mayor tendencia hacia el desarrollo tumoral en los modelos subcutáneos.

4.5.2. Número de mitosis por campo y expresión de Ki67: Proliferación celular

El número de mitosis por campo en la anatomía patológica es una prueba superponible a la expresión de las células tumorales de Ki67 en la inmunohistoquímica. Son dos pruebas que conceptualmente representan la proliferación celular. De esta forma los analizaremos de forma conjunta.

4.5.2.1. Proliferación celular a lo largo de los pases

Tras analizar el número de mitosis no apreciamos diferencias a lo largo de los distintos pases aunque parece existir una tendencia en alza del número de mitosis a medida que avanzan los pases. Tampoco observamos diferencia en la expresión de Ki67. Sin embargo, existe un aumento de la viabilidad de los xenoinjertos a medida que progresan los pases, con lo cual debe de existir otros factores que favorezcan el desarrollo de los tumores injertados. En el estudio de L. García et al. observaron que en 4 de los 6 especímenes en los que falló el desarrollo del tumor en el modelo animal contenían entre 0-10% de células tumorales. Sin embargo en aquellas muestras con más 10% de células tumorales el éxito en el implante se acercaba al 95% (35/37 xenoinjertos) (77).

El número de mitosis y la expresión de Ki67 se mantienen en los xenoinjertos a medida que avanzan los pases en nuestra serie.

4.5.2.2. Proliferación celular a lo largo de los modelos

En cuanto a los modelos animales no hemos observado un aumento de las *mitosis* en ninguno de los modelos estudiados. Tampoco hemos observado diferencias en la expresión de Ki67 en ninguno de los modelos desarrollados y el humano.

De esta forma podemos decir que los xenoinjertos conservan el grado de proliferación celular a lo largo de los pases y que los tres modelos mantienen características similares al humano en cuanto al número de mitosis y de expresión de Ki67.

4.5.3. Masson y expresión de Alfa-SMA: Índice de fibrosis y fibrogénesis.

Algunos autores sugieren que la matriz intersticial puede actuar como una barrera física para la penetración de los quimioterápicos en las zonas más profundas del tumor (108). Estos estudios concluyen que el estroma tumoral de los injertos es mayor y se parece más al tumor humano que aquellos modelos en los que se implantan células aisladas procedentes del tumor humano o de cultivos *in vitro*. Algunos estudios evalúan el estroma perivascular utilizando la distancia entre el vaso hasta la primera célula tumoral y observan que tanto en el tumor humano como en los xenoinjertos existe una amplia distancia, sin embargo cuando el modelo ha sido producido mediante la inyección directa

de células tumorales, se observa que estas se encuentra en contacto directo con los vasos (52). Por ello la difusión de quimioterápicos en este último modelo puede ser mayor que en el humano y es de esperar que los xenoinjertos sean un modelo más parecido a la realidad.

En nuestro caso para el análisis de la fibrosis del estroma empleamos la tinción de Masson y para la fibrogénesis (proliferación de fibroblastos) empleamos la expresión de alfa-SMA en la inmunohistoquímica.

4.5.3.1. Fibrosis y fibrogénesis a lo largo de los pases.

En el análisis de la muestras de Masson, no apreciamos diferencias en el *grado de fibrosis* a lo largo de los pases aunque existe una tendencia hacia la disminución de la fibrosis respecto al humano.

La llegada de los fármacos antitumorales hasta los nichos de cáncer viene determinadas por distintos factores, incluyendo la penetración del fármaco o la difusión a través de la vascularización del tumor por la matriz estromal. Por lo tanto la distancia de células a los vasos va a determinar la eficacia del fármaco quimioterápico. De esta forma, los injertos tumorales muestran características similares a las del cáncer en el humano, y pueden ser considerados como un modelo más exacto para estudios farmacocinéticos.

Sin embargo, cuando analizamos la *fibrogénesis* como expresión de α -SMA. Se observa un descenso progresivo de la fibrogénesis a lo largo de los tres pases. En el Pase 0 no se aprecian diferencias respecto al humano. A lo largo del Pase 1 se alcanza la significación y en el Pase 2 la disminución de la fibrogénesis es evidente.

Este fenómeno puede explicar y correlacionarse con el aumento de la tumorogénesis a medida que avanzan los pases.

Aunque la disminución de la producción de mioblastos y fibroblastos pueda facilitar el implante tumoral, debemos tener en cuenta que también puede traducirse en una disminución de la fibrosis del estroma tumoral que haga que en el modelo animal los quimioterápicos difundan mejor y sean más efectivos que en el humano.

Sin embargo en nuestra serie, la fibrosis en las muestras estudiadas mediante la tinción de tricrómico de Masson no presenta una disminución significativa respecto al humano, aunque parece presentar una tendencia hacia la disminución de la fibrosis con la progresión de los pases. Este hallazgo parece correlacionarse con el descenso progresivo y significativo de alfa-SMA a lo largo de los pases.

Debido a la disminución de la fibrogénesis entendida como expresión de α -SMA y la tendencia hacia la disminución de la fibrosis a medida que transcurren los pases, debemos buscar el pase que presente mayor desarrollo tumoral con menor pérdida de fibrosis y fibrogénesis en el xenoinjerto con la intención de buscar el modelo más parecido al humano.

4.5.3.2. Fibrosis y fibrogénesis en los modelos experimentales.

En cuanto a la evaluación en los modelos utilizado, hemos observado diferencias significativas entre el grado de fibrosis de las muestras humanas y los modelos experimentales teñidos con el tricrómico de Masson. Cuando realizamos el análisis por subgrupos observamos que en ningún caso (subcutáneo, intraabdominal, páncreas) se observan diferencias con el humano, pero las muestras de xenoinjertos intraabdominales presentan una mayor tendencia hacia la disminución de la fibrosis. Esto puede ser debido a un fenómeno real o a un número insuficiente de ratones. Posiblemente el menor índice de fibrosis con la tinción de Masson en los injertos intraabdominales pueda ser debido a que son liberados en la cavidad abdominal sin ser fijados a ninguna estructura ni estroma lo que impide que reciba factores de crecimiento y estímulos procedentes del mismo.

Sin embargo, cuando analizamos la expresión de α -SMA que manifiesta la proliferación de células fibro y mioepiteliales apreciamos un claro descenso en todos los modelos respecto a las muestras humanas. Todas las muestras humanas presentaron una fibrogénesis elevada, lo que contrasta con los modelos experimentales.

Al comparar la fibrosis (tricrómico de Masson) y la fibrogénesis de los modelos animales con el humano se aprecia una disminución de la fibrosis y de la expresión de α -SMA en todos los modelos experimentales.

De esta forma a la hora de probar la farmacocinética de los quimioterápicos debemos ser cautos, ya que pueden tener mayor efectividad que en el humano. Nuevos estudios con fármacos comparando las tres líneas son mandatorios.

4.5.4. CD31: Angiogénesis

Siguiendo esta línea de investigación, una característica bien conocida en el carcinoma periampular, y en concreto del ADCP es la hipovascularización. La valoración de la vascularización tumoral es importante en la investigación del cáncer de páncreas porque la extensión de la red de vasos es fundamental para valorar la respuesta al tratamiento de las drogas antitumorales (52).

4.5.4.1. Angiogénesis a lo largo de los pases

La mayor parte de los autores utilizan un sistema de análisis de la densidad de los microvasos en el xenoinjerto y en el humano similar al nuestro. Es de destacar el estudio de Akashi et al. (52). Los autores de este estudio dividen la muestra en dos regiones bien delimitadas; el área central y periférica. Comparan los injertos extraídos directamente de la pieza quirúrgica con aquellos derivados de líneas celulares. Se apreció una mayor densidad de microvasos en la periferia del xenoinjerto derivado de las líneas celulares. En contraposición los xenoinjertos derivados directamente del humano presentaban áreas de baja densidad guardando una relación muy similar con el tumor basal del humano.

En nuestro estudio, se aprecia un descenso de la angiogénesis en los tres pases siendo más acusado en el Pase 1. En el humano la mayoría de las muestras presentaban una expresión de CD31 más elevada, para disminuir posteriormente a lo largo pases (principalmente en el del Pase 1 y el Pase 2).

Aunque la hipovascularización es una característica fundamental del cáncer de páncreas, debido a la disminución significativa de la angiogénesis en los xenoinjertos murinos, son necesarios más estudios con quimioterápicos para observar cómo se comportan los xenoinjertos ante fármacos anticancerosos.

4.5.4.2. Angiogénesis en los modelos experimentales

En todos ellos, se aprecia una disminución de la vascularización estadísticamente significativa respecto a las muestras humanas. La hipovascularización es una característica conocida del cáncer de páncreas que hace a este tumor quimiorresistente (52).

A diferencia de otros modelos como aquellos derivados de líneas celulares cultivadas in vitro o aquellos producidos genéticamente que presenta una mayor vascularización, en nuestra serie todos los modelos experimentales producidos mediante xenoinjertos y especialmente el modelo pancreático presentan una angiogénesis disminuida. Esta característica que se encuentra potenciada en los xenoinjertos puede convertir a estos modelos en un buen espejo del humano para el ensayo de fármacos o bien, debido a esta hipovascularización respecto al humano, pueden hacer que los quimioterápicos sean quimiorresistentes en los modelos preclínicos.

4.5.5. TUNEL: Apoptosis

En el cáncer páncreas humano, además de una tendencia hacia la hipovascularización y un estroma abundante, este tumor presenta un índice de apoptosis relativamente bajo características que lo hacen quimiorresistente.

4.5.5.1. Análisis de la apoptosis a lo largo de los pases

En nuestro estudio a medida que avanzan los pases se aprecia un descenso significativo de la apoptosis que es especialmente llamativa en el Pase 2.

A medida que avanzan los pases, las células tumorales presentan menor índice de muerte celular, ello, junto con el aumento de tumores viables a lo largo de los pases, hace que la expresión baja de TUNEL en los últimos pases pueda influir en la tasa de implante de los tumores pancreáticos en los modelos preclínicos.

Debido a la disminución de la apoptosis entendida como expresión de TUNEL, debemos buscar el pase que presente mayor desarrollo tumoral con el grado de apoptosis más parecido al humano.

4.5.5.2. Análisis de la apoptosis en los modelos animales

Hemos apreciado diferencias significativas entre el grado de apoptosis en el humano y el resto de modelos animales. La mayoría de las muestras humanas presentaron una apoptosis elevada lo que contrasta con los modelos experimentales en los que la mayoría de las muestras presentaron una expresión de TUNEL baja. Además, destaca el modelo pancreático con un alto porcentaje de muestras con una apoptosis escasa.

Se observa una tendencia hacia la disminución de la expresión de TUNEL a medida que avanzan los pases en todos los modelos. Pero es en el modelo intraabdominal y pancreático donde se aprecia una disminución significativa de las muestras con alta expresión de TUNEL a lo largo de los pases.

De esta forma podemos observar que en todos los modelos se aprecia una disminución de la apoptosis respecto al humano, siendo más llamativa en el modelo pancreático. La disminución de la apoptosis es una característica del cáncer de páncreas humano que hace a este tumor quimiorresistente. En los modelos experimentales este rasgo se encuentra potenciado, especialmente en los modelos intraabdominales y pancreáticos.

4.6. RESUMEN DE LO EXPUESTO

Como resumen de lo expuesto podemos resaltar que a medida que avanzan los pases se aprecia un aumento progresivo de la tasa de implantes exitosos en los tres modelos experimentales y un desarrollo más precoz de los xenoinjertos. De esta forma, queda patente la viabilidad de los xenoinjertos de los tumores periampulares en los modelos experimentales con ratones inmunodeprimidos.

Análisis por modelos

El *modelo subcutáneo* es el que mayor número de xenoinjertos viables presenta a lo largo de los tres pases y el que ofrece una detección más precoz del desarrollo del implante. Aunque no existen diferencias significativas, la mayor morbimortalidad del modelo intraabdominal y pancreático junto con la detección más tardía debido al implante del xenoinjerto en una cavidad distensible, podrían justificar la menor tasa de desarrollo tumoral en estos dos modelos.

Aunque todos los modelos (subcutáneo, intraabdominal y páncreas) presentan características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas similares. En contra de lo esperado al inicio del estudio el modelo pancreático presenta una mayor tendencia hacia la disminución de la fibrogénesis, la vascularización y de la apoptosis.

¿En qué modelo se observan los mejores resultados?

La detección del desarrollo tumoral es más precoz en el modelo subcutáneo lo que puede suponer un coste inferior respecto a los otros modelos. Además el modelo subcutáneo es el que mayor número de xenoinjertos viables desarrolla a lo largo de los tres pases. De esta forma, teniendo en cuenta que los tres modelos presentan características similares en cuanto a diferenciación, fibrosis, proliferación celular, fibrogénesis, angiogénesis y apoptosis, el modelo subcutáneo puede ser la mejor opción para la investigación de fármacos anticancerosos con xenoinjertos.

Análisis por Pases

A medida que avanzan los pases se aprecia un aumento progresivo de la tasa de implantes exitosos en los tres modelos murinos que resulta especialmente llamativa en el Pase 1 (T1 → T2).

Cuando analizamos las muestras de los xenoinjertos por pases no se aprecian diferencias en la diferenciación, la proliferación celular ni la fibrosis entre pases, sin embargo si se aprecia una disminución progresiva de la fibrogénesis, de la vascularización tumoral y de la apoptosis. Todas estas características explican el mayor desarrollo tumoral en los últimos pases.

¿En qué momento se observan los mejores resultados?

Por ello, debemos buscar el pase que presente mayor desarrollo tumoral y con las características inmunohistoquímicas más parecido al humano que en nuestra serie se correspondería al *Pase 1*

IX. CONCLUSIONES

1. La viabilidad de los xenoinjertos de los ADCP y de los tumores periampulares en los animales de experimentación fue del 61,1%.
2. Entre los tres modelos experimentales desarrollados, el subcutáneo es el que presenta un mayor número de xenoinjertos viables y una detección más precoz, si bien las diferencias no son significativas.
3. Los xenoinjertos de los tres modelos mantiene el grado de diferenciación celular, proliferación celular y mitosis por campo en relación al tumor original humano. Presentan una disminución de la fibrosis estromal y de la fibrogénesis. En contraposición, se potencian otras dos características del cáncer de páncreas: la hipovascularización y la ausencia de muerte celular.
4. De los tres modelos experimentales, el modelo subcutáneo es el que mejor conserva las características anatomopatológicas e inmunohistoquímicas de las muestras humanas.
5. En base a lo expuesto, podemos determinar que el modelo subcutáneo, es el modelo experimental que mayor desarrollo tumoral presenta manteniendo las características del tumor humano. Este modelo puede ser la mejor opción para la validación preclínica de fármacos antitumorales en ADCP y tumores periampulares.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European mortality prediction for the year. *Ann Oncology*. 2014; 25: p. 1650-6.
2. García-Borobia F, Fabregat-Prous J. *Manual de la Asociación Española de Cirujanos: Médica Panamericana, S.A.; 2010.*
3. Khosravi Shahi P, Díaz Muñoz de la Espada V. Adenocarcinoma de páncreas: actualizaciones terapéuticas. *Anales de Medicina Interna*. 2005 Agosto; 22(8): p. 390-4.
4. Beger H, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link K. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World Journal of Surgery*. 2003 October; 27(10): p. 1075-1084.
5. Lowenfels A, Maisonneuve P. Pancreatic cancer: development of a unifying etiologic concept. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999 June; 880(1): p. 191-200.
6. Van Cutsem E, Haustermans K, Van Steenberghe W. New treatment possibilities for pancreatic and biliary tumours. *Annals of Oncology*. 2000; 11(Suppl 3): p. 165-169.
7. Boffetta P, Aagnes B, Weiderpass E, Andersen A. Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs. *International Journal of Cancer*. 2005 January; 114(6): p. 992-995.
8. Duell E. Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. *Molecular carcinogenesis*. 2012; 51(1): p. 40-52.

9. Gallus S, Lugo A, La Vecchia C, Boffetta P, Chaloupka F, Colombo P, et al. Pricing policies and control of tobacco in Europe (PPACTE) project: cross-national comparison of smoking prevalence in 18 European countries. 2014 May; 23(3): p. 177-185.
10. Mancuso T, El-Attar A. Cohort study of workers exposed to betanaphthylamine and benzidine. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 1967; 9(6): p. 277-285.
11. Hidalgo-Pascual M, Ferrero-Herrero E, Castillo-Fé M, Guadarrama-González F, Peláez-Torres P, Botella-Ballesteros F. Epidemiology and diagnosis of the pancreatic cancer. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2004 October; 96(10): p. 714-22.
12. Howe G, Burch J. Nutrition and pancreatic cancer. 1996 January; 7(1): p. 69-82.
13. Gold E, Goldin S. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surgical oncology clinics of North America*. 1998; 7(1): p. 67-91.
14. Lowenfels A, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2006 April; 20(2): p. 197-209.
15. Chang K, Parasher G, Christie C, Largent J, Anton-Culver H. Risk of pancreatic adenocarcinoma-Disparity between African Americans and other race/ethnic groups-Author reply. *Cancer*. 2005; 103: p. 349-57.
16. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015 January; 65(1): p. 5-29.
17. Bajetta E, Di-Bartolomeo M, Stani S, Artale S, Ricci S, Bozzetti F, et al. Chemoradiotherapy as preoperative treatment in locally advanced unresectable

- pancreatic cancer patients: results of a feasibility study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1999 September; 45(2): p. 285-9.
18. Brand R, Lynch H. Genotype/phenotype of familial pancreatic cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 2006 June; 35(2): p. 405-15.
 19. Mallinson C, Rake M, Cocking J, Fox C, Cwynarski M, Diffey B, et al. Chemotherapy in pancreatic cancer: results of a controlled, prospective, randomised, multicentre trial. *British Medical Journal*. 1980 December; 281(6255): p. 1589-91.
 20. Glimelius B, Hoffman K, Sjoden P, Jacobsson G, Sellstrom H, Enander L, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Annals of Oncology*. 1996 May; 7(6): p. 593-600.
 21. Geneser F. *Histología*. 3rd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2000.
 22. Klatt E, Aurelio C, Ramzi S. *Robbins y Cotran atlas de anatomía patológica*. 1st ed. Madrid: Elsevier; 2007.
 23. Mayer R. Cáncer de páncreas. In Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser A, Longo S, Jameson J. *Harrison. Principios de Medicina Interna*. 16th ed. Mexico DF: Mac Graw Hill; 2006.
 24. García-Borobia F, Jorba-Martín R, Fabregat-Proas J. Adenocarcinoma de páncreas y del área periampular. In Parrilla-Paricio P, Landa-García J. *Cirugía AEC Asociación española de cirujanos*. 2nd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
 25. Steer M. Páncreas exocrino. In Sabiston D, Townsend D, Beauchamp R, Mattox K, Evers M.: Elsevier; 2009.

26. Hruban R, Klimstra D. Adenocarcinoma of the pancreas. *Seminars in diagnostic pathology*. 2014 November; 31(6): p. 443-51.
27. Rodríguez J. Patogénesis del cáncer de páncreas. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2008 Noviembre; 23(4): p. 391-9.
28. Gao L, Bo H, Wang Y, Zhang J, Zhu M. Neurotrophic factor artemin promotes invasiveness and neurotrophic function of pancreatic adenocarcinoma in vivo and in vitro. *Pancreas*. 2015 January; 44(1): p. 134.
29. Xu Q, Wang Z, Chen X, Duan W, Lei J, Zong L, et al. Stromal-derived factor-1 α /CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway promotes perineural invasion in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2015 March; 6(7): p. 4717-32.
30. Moreno-Planas J, Sánchez-Ortega A, García-Bueno J, Ramírez-Castillejo C. *Avances en cáncer de páncreas, del laboratorio a la clínica*. 1st ed. AECC , editor. Albacete: Universidad de Castilla-La Mancha; 2010.
31. Willett C, Daly W, Warshaw A. CA 19-9 is an index of response to neoadjuvantive chemoradiation therapy in pancreatic cancer. *The American journal of surgery*. 1996 January; 172(4): p. 350-2.
32. Nagaraju G, EI-Rayes B. SPARC and DNA methylation: possible diagnostic and therapeutic implications in gastrointestinal cancers. *Cancer letters*. 2013 January; 328(1): p. 10-17.
33. Jiang YJ, Lee CL, Wang Q, Zhou ZW, Yang F, Jin C, et al. Establishment of an orthotopic pancreatic cancer mouse model: Cells suspended and injected in Matrigel. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014 July; 20(28): p. 9476–9485.

34. Barton CM, Hall PA, Hughes CM, Gullick WJ, Lemoine NR. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *The Journal of pathology*. 1991 February; 163(2): p. 111-6.
35. Iacobuzio-Donahue CA, Hruban RH. Gene expression in neoplasms of the pancreas: applications to diagnostic pathology. *Advances in anatomic pathology*. 2003 May; 10(3): p. 125-134.
36. Sohn TA, Yeo CJ. The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: a review. *Surgical Oncology*. 2000 November; 9(3): p. 95-101.
37. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*. 2002 December; 2(12): p. 897-909.
38. Pour PM, Pandey KK, Batra SK. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Molecular cancer*. 2003 January; 2(1): p. 1.
39. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery-Jr CA, Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but are susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992; 356(19): p. 215-21.
40. Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del-Castillo C, Falconi M, Shimizu M, et al. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology*. 2006 April; 6(1-2): p. 17-32.
41. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Everts BM. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Annals of surgery*. 2004 June; 239(6): p. 763-71.

42. Parikh AA, Liu WB, Fan F, Stoeltzing O, Reinmuth N, Bruns CJ, et al. Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer*. 2003 June; 98(4): p. 720-9.
43. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *The Journal of cell biology*. 1993 April; 121(1): p. 145-54.
44. Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Beger HG, Do DA, Kobrin MS, et al. Increased expression of acidic and basic fibroblast growth factors in chronic pancreatitis. *The American journal of pathology*. 1994 January; 144(1): p. 117.
45. Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo CY, et al. Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget*. 2011 November; 2(11): p. 862-73.
46. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986 June; 83(12): p. 4167-71.
47. Iodice OH. Armadillos y Zarigüeyas como modelos experimentales en la investigación biomédica: Contribuciones a la generalización de su uso. Tesis doctoral. Morón : Facultad de Medicina. Universidad de Morón, Instituto de Neurociencia; 2010.
48. Rosenblueth A, Wiener N. The role of models in science. *Philosophy of science*. 1945 October; 12(4): p. 316-21.

49. Flores J. Modelos animales en el síndrome de Down. www.downciclopedia.org/genetica/peculiaridades-en-el-sindrome-de-down/2926-modelos-animales-en-el-sindrome-de-down. Fundación Down21. Universidad de Cantabria, Farmacología.
50. Fernando Benavides JLG. Modelos murinos en enfermedades humanas. *MEDICINA*. 2001; 61(2): p. 215-231.
51. Rygaard J, Poulsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *APMIS*. 1969 Noviembre; 77(4).
52. Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Hashimoto S, Enomoto T, et al. Histological advantages of the tumor graft: a murine model involving transplantation of human pancreatic cancer tissue fragments. *Pancreas*. 2013 November; 42(8): p. 1275-82.
53. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, et al. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer research*. 1984 February; 44(2): p. 717-26.
54. Zimmerman JA, Trombetta LD, Carter TH, Weisbroth SH. Pancreatic carcinoma induced by N-methyl-N'-nitrosourea in aged mice. *Gerontology*. 1982; 28(2): p. 114-20.
55. Gingell R, Wallcave L, Nagel D, Kupper R, Pour P. Metabolism of the pancreatic carcinogens N-nitroso-bis (2-oxopropyl) amine and N-nitroso-bis (2-hydroxypropyl) amine in the Syrian hamster. *Journal of the National Cancer Institute*. 1976 May; 57(5): p. 1175-8.

56. Pour P, Althoff J, Gingell R, Kupper R, Kruger FW, Mohr U. A further pancreatic carcinogen in Syrian golden hamsters: N-nitroso-bis (2-acetoxypropyl) amine. *Cancer letters*. 1975 December; 1: p. 197-202.
57. Pour P, Mohr U, Cardesa A, Althoff J, Krüger FW. Pancreatic neoplasms in an animal model: morphological, biological, and comparative studies. *Cancer*. 1975 August; 36(2): p. 379-89.
58. Arjona-Sánchez A, Ruiz-Rabelo J, Perea MD, Vázquez R, Cruz A, del C. Muñoz M, et al. Effects of capecitabine and celecoxib in experimental pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2010 December; 10(5): p. 641-647.
59. Ruiz-Rabelo JF, Vázquez R, Perea MD, Cruz A, González R, Romero A, et al. Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer. *Journal of pineal research*. 2007 August; 43(3): p. 270-5.
60. Padillo FJ, Ruiz-Rabelo JF, Cruz A, Perea MD, Tasset I, Montilla P, et al. Melatonin and celecoxib improve the outcomes in hamsters with experimental pancreatic cancer. *Journal of pineal research*. 2010 July; 49(3): p. 264-70.
61. Roebuck BD, Longnecker DS. Species and rat strain variation in pancreatic nodule induction by azaserine. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977 April; 59(4): p. 1273-77.
62. Longnecker DS, Curphey TJ. Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Cancer research*. 1975 August; 35(8): p. 2249-57.
63. Osvaldt AB, Wendt LR, Bersch VP, Backes AN, Rita de Cássia AS, Edelweiss MI, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. *Surgery*. 2006 November; 140(5): p. 803-9.

64. Al-Wadei HA, Schuller HM. Nicotinic receptor-associated modulation of stimulatory and inhibitory neurotransmitters in NNK-induced adenocarcinoma of the lungs and pancreas. *The Journal of pathology*. 2009 February; 218(4): p. 437-445.
65. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 2008 September; 321(5897): p. 1801-1806.
66. Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, Rasheed Z, Solomon A, Zou GM, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Molecular cancer therapeutics*. 2009 February; 8(2): p. 310-314.
67. Baumgarten AJ, Fiebig HH, Burger AM. Molecular analysis of xenograft models of human cancer cachexia-possibilities for therapeutic intervention. *Cancer Genomics-Proteomics*. 2007 April; 4(3): p. 223-231.
68. Quesnelle KM, Wheeler SE, Ratay MK, Grandis JR. Preclinical modeling of EGFR inhibitor resistance in head and neck cancer. *Cancer biology & therapy*. 2012 May; 13(10): p. 935-945.
69. Huynh H, Soo KC, Chow PK, Panasci L, Tran E. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs. *Clinical cancer research*. 2006 July; 12(14): p. 4306-4314.
70. Yamaguchi T, Ikehara S, Nakanishi H, Ikehara Y. A genetically engineered mouse model developing rapid progressive pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Journal of pathology*. 2014 August; 234(2): p. 228-238.

71. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell*. 2003 December; 4(6): p. 437-450.
72. Partecke LI, Sandler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, et al. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *European Surgical Research*. 2011 August; 47(2): p. 98-107.
73. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998 September; 17(3): p. 279-284.
74. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell*. 2005 May; 7(5): p. 469-483.
75. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic Cancer. *Annual review of pathology*. 2008 February; 3: p. 157-188.
76. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, et al. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer research*. 2006 January; 66(1): p. 95-106.
77. Garcia PL, Council LN, Christein JD, Arnoletti JP, Heslin MJ, Gamblin TL, et al. Development and histopathological characterization of tumorgraft models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PloS one*. 2013 October; 8(10): p. e78183.

78. Russell WM, Burch RL. The principles of humane experimental technique London: Methuen & Co. Ltd; 1959.
79. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010 February; 17(6): p. 1471-1474.
80. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed.: World Health Organization; 2010.
81. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyórfy B, Schmitt VD, Darb-Esfahani S, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PloS one*. 2012 December; 7(12): p. e51862.
82. Striefler JK, Sinn M, Pelzer U, Jühling A, Wislocka L, Bahra M, et al. P53 overexpression and Ki67-index are associated with outcome in ductal pancreatic adenocarcinoma with adjuvant gemcitabine treatment. *Pathology-Research and Practice*. 2016 August; 212(8): p. 726-734.
83. Scholzen TaJG. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 2000; 182(3): p. 311-322.
84. Nagamoto T, Eguchi G, Beebe. DC. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000; 41(5): p. 1122-1129.
85. Liu LaGPS. CD31: beyond a marker for endothelial cells. 2012;; p. 3-5.
86. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GCI, Lyman S. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990; 247(4947).

87. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis: Methods and Protocols*. 2012;; p. 41-47.
88. Gillen S, Schuster T, Zum Büschenfelde CM, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS med*. 2010 April; 7(4): p. e1000267.
89. Fogh J, Giovanella BC. *The nude mouse in experimental and clinical research* INC AP, editor.: Elsevier; 1978.
90. Jackson Laboratory. MGD Mouse Genome Database. [Online].; 1998. Available from: <http://www.informatics.jax.org>.
91. Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*. 1996; 380(6570): p. 149-152.
92. Qiu W, Su GH. Challenges and advances in mouse model for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2013 June; 32(1-2): p. 83-107.
93. Fogh J, Giovanella BC. *The nude mouse in experimental and clinical research* INC AP, editor.: Elsevier; 1982.
94. Grippo PJ, Tuveson DA. Deploying mouse models of pancreatic cancer for chemoprevention studies. *Cancer Prevention Research*. 2010 November; 3(11): p. 1382-1387.

95. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 2003 January; 17(24): p. 3112-3126.
96. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, et al. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. 2006 September; 20(22): p. 3130-3146.
97. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 2009 June; 324(5933): p. 1457-1461.
98. Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*. 2004 October; 29(3): p. 193-203.
99. DeRosier LC, Vickers SM, Zinn KR, Huang Z, Wang W, Grizzle WE, et al. TRA-8 anti-DR5 monoclonal antibody and gemcitabine induce apoptosis and inhibit radiologically validated orthotopic pancreatic tumor growth. *Molecular cancer therapeutics*. 2007 December; 6(12): p. 3198-3207.
100. Carter D, Stocken DD, Ghaneh P, Bramhall SR, Olah A, Kelemen D, et al. Longitudinal quality of life data can provide insights on the impact of adjuvant treatment for pancreatic cancer—Subset analysis of the ESPAC-1 data. *International journal of cancer*. 2009 January; 124(12): p. 2960-2965.
101. Neoptolemos JP, Stocken DD, Smith CT, Bassi C, Ghaneh P, Owen E, et al. Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and-3 (v1) trials. *British journal of cancer*. 2009 January; 100(2): p. 246-250.

102. Rajeshkumar NV, De Oliveira E, Ottenhof N, Watters J, Brooks D, Demuth T, et al. MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts. *Clinical Cancer Research*. 2011 May; 17(9): p. 2799-2806.
103. Boven E, Winograd B, Berger DP, Dumont MP, Braakhuis BJ, Fodstad Ø, et al. Phase II preclinical drug screening in human tumor xenografts: a first European multicenter collaborative study. *Cancer research*. 1992 November; 52(21): p. 5940-5947.
104. Garrido-Laguna I, Tan AC, Uson M, Angenendt M, Ma WW, Villarroel MC, et al. Integrated preclinical and clinical development of mTOR inhibitors in pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 2010 July; 103(5): p. 649-655.
105. Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Jesus-Acosta A, Jones S, Maitra A, et al. Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2011 January; 10(1): p. 3-8.
106. Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Oliveira E, Rubio-Viqueira B, et al. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2011 June; 10(8): p. 1311-1316.
107. Monsma DJ, Monks NR, Cherba DM, Dylewski D, Eugster E, Jahn H, et al. Genomic characterization of explant tumorgraft models derived from fresh patient tumor tissue. *Journal of translational medicine*. 2012 June; 10(1): p. 1-18.
108. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*. 2010 November; 7(11): p. 653-664.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Informe del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Sevilla



*Comité Ético de Experimentación Animal
de la Universidad de Sevilla*

ANEXO VIII

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

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

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

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

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

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

INFORMA

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

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

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

Procedimiento: Implante de carcinoma subcutáneo

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

Clasificación: Leve

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



**Comité Ético de Experimentación Animal
de la Universidad de Sevilla**

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

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

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

Excepciones: no

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

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

Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva:

Resultado: No hay bibliografía previa

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

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

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

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

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

Elaborado por: Secretario Órgano Habilitado

Nombre: C. Oscar Pintado Sanjuán

Fecha: 26/02/2015

Firma

Revisado y aprobado por: Presidente Órgano Habilitado

Nombre: Javier Vitorica

Fecha: 26/02/2015

Firma

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

Anexo 2. Modelos de consentimiento informado para el uso de muestras en investigación extraído del paciente

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

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

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

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

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

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

Implicaciones para el donante/paciente:

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

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

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de la Unidad de Cirugía Hepato-Bilio-Pancreática en el teléfono: 955 012 317.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

<TÍTULO>

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

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio < Impacto de la Expresión Diferencial de Marcadores Proteómicos en la Evolución Clínica y Pronóstico del Adenocarcinoma de Páncreas. Estudio Translacional>
- He recibido suficiente información sobre el estudio < Impacto de la Expresión Diferencial de Marcadores Proteómicos en la Evolución Clínica y Pronóstico del Adenocarcinoma de Páncreas. Estudio Translacional> He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informador de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

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

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

Firma del paciente (o representante legal en su caso) Firma del profesional sanitario informador

Nombre y apellidos:..... Fecha: Nombre y apellidos:..... Fecha:

Anexo 3. Estadificación para el cáncer de páncreas según la clasificación de la AJCC (2010)

ESTADIO	Tumor primario T	Ganglios Linfáticos N	Metástasis a Distancia M
0	Tis	0	0
IA	T1	0	0
IB	T2	0	0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Cualquier N	Cualquier M
IV	Cualquier T	Cualquier N	Cualquier M

Tumor primario T
Tx: Tumor indetectable
Tis: Carcinoma in situ
T0: Ausencia de tumor
T1: Tumor limitado al páncreas ≤ 2 cm en su diámetro máximo
T2: Tumor limitado al páncreas > 2 cm en su diámetro máximo
T3: Tumor extendido fuera del páncreas sin infiltración de la AMS ni de eje celíaco
T4: Tumor extendido fuera del páncreas con infiltra de la AMS ni de eje celíaco (Irreseccable)

Ganglios Linfáticos N
Nx: Ganglios indetectables
N0: Ausencia de metástasis en ganglios
N1: Metástasis en un ganglio linfático

Metástasis a Distancia M
M0: Sin metástasis a distancia
M1: Metástasis a distancia

Anexo 4. Resolución de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera para realización del presente proyecto de investigación

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera

RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y GANADERA POR LA QUE SE AUTORIZA A D. JORDI MUNTANÉ RELAT UN PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Examinada la solicitud de autorización de D. Jordi Muntané Relat, con D.N.I. 39331869Y, para la realización de un proyecto de experimentación animal, se han apreciado los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero. Con fecha 07 de Julio de 2015, D. Jordi Muntané Relat, en su condición de responsable del proyecto, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación: "Desarrollo de modelo murino de adenocarcinoma de páncreas a partir de xenoinjerto humanos".

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el informe del Comité Ético, resumen no técnico e informe de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo. La documentación aportada acredita que la interesado/a tiene la titulación y formación específica para desarrollar proyectos experimentales con animales y cuenta con la capacitación específica para ello.

Tercero. El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como centro usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número ES410910008015.

Cuarto. Con fecha 23 de Junio de 2015, el Comité de Ética del centro emiten un informe favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Quinto. Con fecha 22 de Junio de 2015, Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el procedimiento cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero. El artículo 3.2 del Decreto 133/2005, de 24 de mayo, por el que se regula la distribución de las competencias establecidas en la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de protección de los animales, entre las Consejerías de Gobernación y de Agricultura y Pesca, dispone que corresponde a la segunda "la autorización previa de toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte, prevista en el artículo 7.2 de la Ley".

Por su parte, artículo 13 del Decreto 141/2013, de 1 de octubre, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural prevé:

"Corresponde a la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, además de las funciones establecidas en el artículo 30 de la Ley 9/2007, de 22 de octubre, las siguientes:

- i) La ordenación y fomento de la protección y del bienestar animal".

Segundo. El artículo 7.2 de la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, manifiesta que "toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte requerirá autorización previa de la Consejería competente por razón de la materia y supervisión veterinaria".

Por su parte, el artículo 25 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, dispone:

"2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable".

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

"1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:
- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
 - b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva".

Tercero. El artículo 15 del RD 53/2013 de 1 de febrero, establece que el órgano competente podrá autorizar que personas que aún no hayan demostrado su total capacitación desempeñen esas funciones de forma temporal y bajo supervisión responsable. El artículo 11.2 de la Orden ECC/556/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, establece que "siempre que, en el caso de la función de realización de los procedimientos, las actuaciones sobre los animales sean un procedimiento clasificado como leve o sin recuperación. Este período provisional no podrá tener una duración superior a seis meses.

Cuarto. El artículo 19.1 del Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales establece:

"Todos los establecimientos cuyo objeto sea la producción, comercialización o uso de animales con fines experimentales, científicos o educativos ubicados en la Comunidad Autónoma de Andalucía, previo al inicio de la actividad, de conformidad con lo establecido en el artículo 7 de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, deberán inscribirse en el Registro Único de Ganadería de Andalucía, en la sección de Explotaciones Ganaderas de Andalucía, de conformidad con el artículo 33 y deberán contar para su inscripción con la autorización prevista en el artículo 36.1 de la Ley 8/2003, de 24 de abril".

Quinto. El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del tipo II, puesto que implica procedimientos clasificados como leve y moderados y no utiliza primates. Además, el centro donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización y la persona encargada de la realización del proyecto tiene capacitación para ello. A ello se une el carácter favorable de los informes emitidos al respecto, por lo que cumpliendo con los requisitos previstos ha de procederse a su autorización y debe someterse a evaluación retrospectiva.

En consecuencia, de conformidad con los preceptos citados y demás de general aplicación,

RESUELVO

Primero. Autorizar a, D. Jordi Muntané Relat, el proyecto denominado: "Desarrollo de modelo murino de adenocarcinoma de páncreas a partir de senoinjerto humanos", por 12 meses, periodo máximo de 5 años.

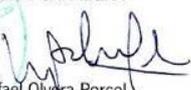
Segundo. Ordenar que se comunique a esta Dirección General, la evaluación retrospectiva, a la finalización de proyecto. La evaluación retrospectiva se realizará conforme a lo indicado por el órgano habilitado que ha evaluado el proyecto.

Tercero. Autorizar a D^a. Daniel Aparicio Sánchez, Mercedes Rubio Manzanare-Dorado y Luis Miguel Marín Gómez, a participar con anterioridad a finalizar su total capacitación en el proyecto bajo supervisión responsable, en actuaciones o procedimientos leve o sin recuperación por periodo no superior a seis meses.

Cuarto. Asignar el número 20-08-15-295, al proyecto a los efectos de cumplir con lo requerido en el art. 41.1 del RD 53/2013 de 1 de febrero y la Decisión 2012/707/UE, sobre la regulación y transmisión de información referente al uso de los animales.

Quinto. Ordenar la notificación de la presente Resolución a la persona interesada, con indicación de que contra la misma, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponer recurso de alzada ante la persona titular de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente al de la notificación, según lo previsto por los artículos 114 y 115 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

Sevilla, 02 de Septiembre de 2015
EL DIRECTOR GENERAL DE LA PRODUCCIÓN
AGRICOLA Y GANADERA



Fdo.: Rafael Olvera Porcel.

