

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús estableties per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**GENERACIÓN DE MODELOS MURINOS DE
ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO CON MAYOR
EFICIENCIA METASTÁSICA PARA EL ESTUDIO DE
AGENTES ANTITUMORALES**



NOA DE LA FUENTE HERNÁNDEZ

Universitat Autònoma de Barcelona

2021

GENERACIÓN DE MODELOS MURINOS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO CON MAYOR EFICIENCIA METASTÁSICA PARA EL ESTUDIO DE AGENTES ANTITUMORALES

TESIS DOCTORAL presentada por la doctoranda

Noa de la Fuente Hernández

Para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía

Barcelona, 2021

Directores:

Dr. Vicenç Artigas Raventós, Profesor Emérito del Departamento de Cirugía,
Universidad Autónoma de Barcelona

Dra. María Virtudes Céspedes Navarro, Investigadora del programa Miguel Servet,
Grupo de Ginecología y Oncología Peritoneal (GOGyP), Instituto de Investigación
Biomédica Sant Pau (IIB Sant Pau)

Tutor:

Dr. Vicenç Artigas Raventós

Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona



Dr. Vicenç Artigas Raventos, Profesor Emérito del Departamento de Cirugía de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dra. M^a Virtudes Céspedes Navarro, Investigadora Miguel Servet del Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado **“Generación de modelos murinos de adenocarcinoma pancreático con mayor eficiencia metastásica para el estudio de agentes antitumorales”** del que es autora Noa de la Fuente Hernández, ha sido realizado bajo nuestra dirección y tutoría, y reúne las condiciones requeridas para su lectura y defensa delante del tribunal designado, para optar al Grado de Doctora en Medicina.

Y para que conste a los efectos que convengan, firmamos el presente certificado

En Barcelona, 1 de Marzo de 2021.



Dr. Vicenç Artigas Raventós



Dra. M^a Virtudes Céspedes Navarro

Mi más sincero agradecimiento va dirigido fundamentalmente a los directores de este proyecto de tesis doctoral, la Dra. M^a Virtudes Céspedes y el Dr. Vicenç Artigas, sin los cuales su realización no hubiese sido posible. Os doy las gracias por haberme guiado en este camino hasta el final, a pesar de todas las dificultades. Os debo vuestro tiempo y dedicación.

Quiero dar las gracias a todos los que han formado parte de los proyectos mencionados en esta tesis. Su esfuerzo y trabajo en la investigación es memorable.

Gracias al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau por su ayuda en este proyecto.

Gracias también a los integrantes del Servicio de Cirugía General y Digestiva del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante mis años de formación y trabajo asistencial.

Y muchas gracias a mi familia, de la que siempre recibo su apoyo incondicional en todas las decisiones de mi trayectoria profesional y personal.

ÍNDICE

CONFLICTOS DE INTERÉS, FINANCIACIÓN Y CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	15- 16
ABREVIATURAS.....	17- 20
RESUMEN/ Introducción del proyecto de tesis.....	21- 24
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>25</u>
1. EPIDEMIOLOGÍA, ANATOMO-PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DEL ACDP.....	27
1.1 Epidemiología.....	27
1.2 Descripción anatómica macro y microscópica del ACDP.....	27- 28
1.3 Diagnóstico y estadaje.....	28- 30
2. BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOPATOLOGÍA DEL ACDP.....	31
2.1. Genética del ACDP.....	31- 34
2.2. Estroma tumoral.....	35
2.2.1. Componente celular.....	35- 37
2.2.2. Componente acelular.....	37- 38
2.3. Células madre tumorales y metastásicas.....	38- 40
2.4. CXCR4 en cáncer de páncreas.....	40
2.4.1. CXCL12/CXCR4.....	40- 41
2.4.2. CXCR4 y EGFR.....	41
2.4.3. CXCR4 y CXCR7.....	42
2.4.4. CXCR4 y relación con el pronóstico en ACDP.....	42- 43
2.4.5. Antagonistas frente a CXCR4.....	43
3. MODELOS ANIMALES EN ACDP.....	44
3.1. Modelos animales de ACDP inducidos químicamente.....	45
3.2. Modelos de ACDP genéticamente modificados (GEMM).....	45-46
3.3. Modelos xenógrafos de ACDP.....	46
3.4. Xenógrafos derivados de pacientes (PDX).....	46- 47
3.5. Modelos xenógrafos humanizados.....	47
4. TRATAMIENTO EN EL ACDP.....	47
4.1. Enfermedad resecable borderline y enfermedad localmente avanzada en ACDP.....	47-48
4.1.1. ACDP resecable.....	48
4.1.2. ACDP resecable borderline.....	48

4.1.3. ACDP localmente avanzado.....	48
4.2. Tratamiento sistémico.....	49
4.2.1.Tratamiento neoadyuvante.....	49-50
4.2.1.1. Terapia neoadyuvante para enfermedad resecable.....	50- 51
4.2.1.2. Tratamiento neoadyuvante en ACDP borderline resecable.....	51- 52
4.2.1.3. Tratamiento neoadyuvante en ACDP localmente avanzado.....	52
4.2.2.Tratamiento adyuvante.....	52- 53
4.2.3.Tratamiento sistémico en ACDP localmente avanzado.....	53-54
4.2.4.Tratamiento sistémico en ACDP metastásico.....	54
4.2.5.Papel de la radioterapia en el ACDP.....	54-55
4.2.6. Inmunoterapia y terapias dirigidas.....	55
4.3. Tratamiento quirúrgico.....	55- 56
5. NANOMEDICINA.....	56- 58
5.1. Nanopartículas.....	58- 60
5.1.1.Nanopartículas utilizadas para el tratamiento del ACDP.....	60- 65
5.1.1.1. Nanopartículas con Gemcitabina.....	61
5.1.1.2. Nanopartículas liposomales con Cisplatino (lipoplatino).....	61
5.1.1.3. Nanopartículas de oro.....	61
5.1.1.4. Nanopartículas con Paclitaxel.....	61
5.2. Nanofibras.....	65- 66

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....67-72

MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
1. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	75
1.1. Cultivo celular.....	75
1.1.1. Líneas celulares.....	75
1.1.2. Subcultivo, congelación y descongelación de las líneas celulares.....	75-76
1.1.3. Contaje y determinación de la viabilidad celular.....	76
1.2. Obtención de las líneas tumorales PANC-1 y MIA PaCa-2 con expresión de CXCR4.....	76
1.2.1. Determinación de los niveles de CXCR4 en las líneas tumorales PANC-1 y MIA-PaCa-2.....	77

1.3. Obtención de la línea tumoral “M2” a partir de un tumor de ACDP derivado de un paciente.....	77-78
2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>.....	78
2.1. Animales.....	78
2.2. Inoculación subcutánea en ratón inmunodeprimido para generar los ratones nodriza.....	79
2.3. Generación del modelo subcutáneo de ACDP.....	79
2.4. Generación del modelo ortotópico de ACDP metastásico después de condicionamiento subcutáneo.....	79
2.5. Resección del tumor y colocación de la membrana CEB-01.....	79- 80
2.6. Administración del régimen de quimioterapia.....	80- 81
2.7. Seguimiento de los animales.....	82
2.8. Seguimiento <i>in vivo</i> del crecimiento tumoral por bioluminiscencia.....	82
2.9. Necropsia y procesado de muestras.....	82- 83
2.10. Determinación de las metástasis a distancia mediante bioluminiscencia.....	83
2.11. Análisis histopatológico e inmunohistoquímico.....	83- 84
2.12. Variables evaluadas y análisis estadístico.....	84- 85
3. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y LA BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i> DE T22-GFP-GEMCITABINA.....	85
3.1. Ensayo de citotoxicidad de T22-GFP-Gemcitabina.....	85- 86
3.2. Ensayos de biodistribución de T22-GFP-Gemcitabina.....	86
3.3. Análisis estadístico.....	86
4. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 EN MUESTRAS DE PACIENTES CON ACDP.....	86- 87
4.1. Características de los pacientes y seguimiento clínico.....	87
4.1.1. Diseño y población de estudio.....	87
4.1.2. Criterios de inclusión.....	87
4.1.3. Criterios de exclusión.....	87
4.1.4. Protocolo de actuación.....	88
4.1.4.1. Pacientes.....	88
4.1.4.2. Recogida de datos clínico-patológicos.....	88
4.2. Recogida y procesamiento de biopsias de tejido fresco para generar los modelos PDXs.....	89
4.3. Inmunohistoquímica y determinación de los niveles de expresión de CXCR4 en las biopsias parafinadas.....	89- 90

4.4. Estudio de la asociación entre niveles de CXCR4 y la supervivencia de los pacientes.....	90
<u>RESULTADOS.....</u>	<u>91</u>
1. EXPRESIÓN DE CXCR4 EN TUMORES DE ACDP.....	93
1.1. Descripción de las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	93- 97
1.2. Asociación entre las características clínico-patológicas de los pacientes del estudio y la expresión de CXCR4.....	97- 101
2. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA METASTÁSICA EN EL MODELO <i>IN VIVO</i> DE ACDP.....	102
2.1. Líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y MIA PaCa-2 con expresión dual de luciferasa y CXCR4.....	102- 103
2.2. Modelos xenógrafos ortotópicos de ratón Swiss <i>nude</i> y NOD-SCID con tumores CXCR4+.....	103- 104
2.3. Generación de los modelos ortotópicos altamente metastásicos.....	105- 107
3. ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA MEMBRANA CEB-01 CARGADA CON SN-38 EN CÁNCER DE PÁNCREAS.....	108
3.1. Evaluación de la actividad antitumoral de CEB-01-SN38 en monoterapia y en combinación con quimioterapia en el modelo subcutáneo MIA PaCa-2.....	108- 110
3.1.1. Estudio de la seguridad y tolerabilidad de CEB-01 cargada con SN-38.....	111-112
3.2. Evaluación de la actividad antitumoral y antimetastásica de CEB-01-SN38 en el modelo ortotópico de cáncer de páncreas PANC-1.....	113- 116
3.2.1. Estudio de seguridad y tolerabilidad de CEB-01 cargada con SN-38.....	116- 117
3.2.2. Estudio de la capacidad de control de la carga tumoral metastásica.....	118- 119
4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA NANOPARTÍCULA T22-GFP-H6 CONJUGADA CON GEMCITABINA.....	119
4.1. Citotoxicidad e inducción de muerte <i>in vitro</i>	119- 120
4.2. Biodistribución <i>in vivo</i> de T22-O-Gemcitabina.....	121- 122

<u>DISCUSIÓN</u>	126
1. GENERACIÓN DE MODELOS MURINOS DE ALTA EFICIENCIA METASTÁSICA PARA EVALUAR NUEVAS TERAPIAS EN ACDP.....	126- 129
2. ESTUDIO DE AGENTES ANTITUMORALES EN LOS MODELOS MURINOS DE ACDP.....	129
2.1. Estudio de la eficacia de la membrana CEB-01 en modelos murinos de ACDP.....	130- 132
2.2. Estudio de la terapia dirigida con T22-O-GEM <i>in vitro</i> y su biodistribución en animales.....	132- 134
<u>CONCLUSIONES</u>	135-138
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	139- 152
<u>Lista de figuras</u>	153- 154
<u>Lista de tablas</u>	155
<u>ANEXOS</u>	157- 162

CONFLICTOS DE INTERÉS, FINANCIACIÓN Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

- Este proyecto de tesis se ha llevado a cabo en el laboratorio de Oncogénesis y antitumorales, en la unidad de experimentación animal y en los servicios de Anatomía Patológica y Cirugía General y Digestiva del Hospital de la Santa Creu i San Pau. Su desarrollo ha tenido lugar en el contexto del proyecto de investigación liderado por la Dra. Céspedes PI17/00150 “Nanoterapia dirigida y Radioterapia SBRT combinada para la eliminación selectiva de células madre tumorales en cáncer de Páncreas” del Instituto de Salud de Carlos III, realizándose con ayudas provenientes de su acción estratégica.
- La nanopartícula de naturaleza proteica con capacidad de unión al CXCR4 se ha desarrollado en el proyecto FIS PS09/00165 (IP: E Vázquez) y Nanocomets del CIBER-BBN (IP coordinador: Dr. Mangues), en colaboración con el grupo del Dr. Villaverde, experto en ingeniería de proteínas de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- Para el estudio de la nanopartícula T22-O-Gemcitabina se ha obtenido financiación pública:
 - CP15/00163, dentro del programa de Miguel Servet de la Dra. Céspedes, centrado en el estudio *in vitro* de su capacidad de internalización, liberación de Gemcitabina e inducción de muerte en distintas líneas tumorales pancreáticas.
 - Proyecto coordinado FIS PI17/00150 (IP. Dra. Céspedes) y PI17/00553 (IP. Dr. Cochero), para evaluar *in vivo* la potencial utilidad de las sistemas de entrega dirigida de Gemcitabina a células CXCR4+ y el estudio del efecto antitumoral en xenógrafos ortotópicos CXCR4+ de ACDP y modelos xenógrafos CXCR4+ derivados de muestras de pacientes con ACDP.
- Se han incluido, además, los resultados de dos estudios preclínicos, liderados por la Dra. Céspedes (CEB-01-Panc-01-2018 y CEB-01-Panc-02-2019) para la evaluación de la eficacia terapéutica de la membrana CEB-01 portadora del citotóxico SN-38 en monoterapia o en combinación con 5-FU en el tratamiento del cáncer de ACDP. Esta membrana ha sido desarrollada por la empresa

biotecnológica CEBIOTEX Biomedical nanofibers, resultado de la interacción entre la Universitat Politècnica de Catalunya y el Hospital Sant Joan de Déu.

- El proyecto de tesis cumple con la normativa vigente en relación a las consideraciones éticas. Ha sido presentado al Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) y al Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC). El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los pacientes participantes en el estudio se ha ajustado a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.
- Como requerimiento de la CEIC se ha creado una hoja de información y consentimiento que ha sido entregada, explicada y firmada por los pacientes (anexo I) previo a la recogida de muestras. Las muestras humanas y los datos recogidos para el estudio han sido identificados mediante un código sólo accesible para el personal investigador autorizado.

ABREVIATURAS

ACDP: adenocarcinoma ductal de páncreas

PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico)

T22-O-GEM: T22-O-Gemcitabina

TC: tomografía computarizada

NMPI: neoplasia mucinosa papilar intraductal

RMN: resonancia magnética nuclear

DCP: duodenopancreatectomía cefálica

PS: *Performance status*

Ca 19.9: antígeno carbohidrato 19.9

RT: radioterapia

MMR: *Mismatch Repair genes* (genes de reparación del ADN)

PanINS: *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia* (neoplasia intraepitelial pancreática)

ICGC: *International Cancer Genome Consortium*

ADEX: *Aberrantly Differentiates Endocrine Exocrine* (exocrino endocrino con diferenciación aberrante)

CSF1R: *Colony Stimulating Factor 1 Receptor* (receptor del factor estimulante de colonias1)

CXCR2: receptores de quimioquinas CXC2

TME: *Tumor Microenvironment* (microambiente tumoral)

PSCs: *Pancreatic stellate cells* (células estrelladas pancreáticas)

IL8: interleuquina 8

MCP1: *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (proteína 1 quimioatravente de macrófagos)

RANTES: *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted* (quimoquina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación)

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor* (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

TGF α y β : *Transforming Growth Factor* (factor de crecimiento transformante)

CAFs: *Cancer-associated fibroblasts* (fibroblastos asociados al tumor)

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (factor estimulante de colonias de monocitos-macrófagos)

MDSCs: *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (células supresoras derivadas de mieloides)

HIF: *Hipoxia-Inducible Factors* (factores inducibles por hipoxia)

ROS: *Reactive Oxygen Species* (especies de oxígeno reactivas)

PD-L1: *Programmed Death-Ligand 1* (ligando 1 de muerte programada)

PD-1: *Programmed Death-1 protein* (proteína 1 de muerte programada)

TAMs: *Tumor-associated macrophages* (macrófagos asociados al tumor)

ICAM 1: *Intercellular Adhesion Molecule 1* (molécula 1 de adhesión intracelular)

CSF-1: *Colony Stimulating Factor 1* (factor estimulador de colonias 1)

IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1* (factor de crecimiento insulínico 1)

MMP: *Matrix Metalloproteinase* (metaloproteinasas de la matriz extracelular)

CMTs: células madre tumorales

HH: HedgeHog

GPCR: *G-protein-coupled receptors* (receptor acoplado a proteínas G)

SDF-1: *Stromal cell-Derived Factor 1* (factor 1 alfa derivado de las células estromales)

MAPK: *Mitogen-Activated Protein kinase* (proteína quinasa activada por mitógeno)

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor* (factor de crecimiento epidérmico)

GEMM: *Genetically engineered mouse models* (modelos de ratón modificados genéticamente)

SCID: *Severe Combined Inmunodeficiency* (inmunodeficiencia combinada severa)

PDXs: *Patient Derived Xenografts* (xenógrafos derivados de pacientes)

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

FOLFIRINOX: FOL (ácido folínico o leucovorina), F (5-Fluorouracilo), IRIN (Irinotecán) y OX (Oxaliplatino)

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

5- FU: 5- Fluorouracilo

QT-RT: quimiorradioterapia

SBRT: *Sterotactic Body Radiotherapy* (radioterapia estereotáctica corporal)

FOLFIRI: FOL (ácido folínico o leucovorina), F (Fluorouracilo), IRI (Irinotecán)

FOLFOX: FOL (ácido folínico o leucovorina), F (Fluorouracilo), OX (Oxaliplatino)

IMRT: *Intensity-modulated radiotherapy* (radioterapia de intensidad modulada)

EPR: Efecto de permeabilidad y retención

rhTNF α : *Tumor Necrosis Factor- α , Human, Recombinant* (factor de necrosis tumoral α recombinante humano)

Nab-P+Gem: Nab-Paclitaxel+ Gemcitabina

FdU: Flloxuridina

SBF: Suero bovino fetal

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (buffer fosfato salino)

DMSO: dimetilsulfóxido

IFM: intensidad de fluorescencia media

SPF: *Specific-pathogen-free* (ambiente libre de patógenos)

Vía intraperitoneal: ip

HE: Hematoxilina-eosina

XTT: sales de tetrazolium

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

EPCC: esplenopancreatectomía corporo-caudal

ACR: Árboles de clasificación y regresión

RESUMEN/ Introducción del proyecto de tesis

El adenocarcinoma ductal de páncreas (ACDP) es un tumor agresivo, de biología tumoral y genética compleja. Presenta un mal pronóstico por su diagnóstico tardío y quimiorresistencia. El receptor de quimiocinas, CXCR4 es un marcador de células madre tumorales metastásicas. Varios estudios lo han asociado con un aumento de la invasión, la diseminación tumoral y la quimiorresistencia en tumores pancreáticos. Este receptor sería, por tanto, una diana excelente para el direccionamiento de una terapia antitumoral y antimetastásica.

La motivación para la realización de este proyecto de tesis ha sido la necesidad de desarrollar trabajos de investigación que permitan encontrar nuevas herramientas para mejorar el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del ACDP. En este trabajo se han generado modelos en ratón con una mayor eficiencia metastásica que permiten ampliar el estudio de esta patología. Estos modelos se han utilizado, además, para validar dos tratamientos del ámbito de la nanomedicina: una membrana constituida por nanofibras que permite una liberación local y controlada de fármaco en el tumor primario tras la resección quirúrgica, y una nanopartícula para la entrega dirigida de un citotóxico hacia las células madre tumorales CXCR4⁺, implicadas en el proceso de metástasis, permitiendo, en ambas estrategias, un aumento de la concentración farmacológica del compuesto antitumoral, y disminuyendo la toxicidad sistémica asociada al tratamiento.

Los objetivos específicos de este proyecto han sido: la obtención de muestras de ACDP humano y el estudio de la expresión de CXCR4; la creación de modelos en ratón de ACDP de alta eficiencia metastásica a partir de líneas celulares de ACDP y muestras tumorales humanas con alta expresión de CXCR4; la evaluación, en xenógrafos ortotópicos pancreáticos, de la eficacia terapéutica de una membrana de nanofibras producida por la polimerización de ácido poli (láctico-co-glicólico, PLGA) y cargada en su matriz con el citotóxico SN-38 (CEB-01-SN38) en tratamiento único o en combinación con quimioterapia, y finalmente, el estudio de la citotoxicidad y biodistribución *in vivo* de la nanopartícula T22-O-Gemcitabina (T22-O-GEM), dirigida a la eliminación selectiva de las células madre metastásicas.

Para ello, la metodología ha incluido experimentos *in vitro* (cultivo celular y la obtención de líneas tumorales PANC-1 y MIA PaCa-2 con expresión de CXCR4 y la obtención de una línea tumoral a partir de un tumor de ACDP de paciente), y experimentos *in vivo*: la

generación de modelos subcutáneos de ACDP y modelos ortotópicos metastásicos, la implantación de membranas CEB-01, la administración de quimioterapia, el seguimiento del crecimiento tumoral y evaluación de las metástasis por bioluminiscencia), y finalmente, la evaluación de la citotoxicidad y biodistribución *in vivo* de T22-GFP-Gemcitabina y el análisis de la expresión de CXCR4 en muestras de pacientes con ACDP.

Nuestras conclusiones son que la implantación de células tumorales con sobreexpresión de CXCR4 aumenta significativamente la diseminación tumoral y es útil para la evaluación preclínica de compuestos antitumorales, que la implantación ortotópica de biopsias humanas con alta expresión de CXCR4 es un modelo más predictivo para la clínica, que la implantación de la membrana CEB-01 cargada con el fármaco SN-38 permite el control del crecimiento tumoral local y su combinación con quimioterapia puede controlar la progresión tumoral y disminuir la carga tumoral metastásica, y que la nanopartícula T22-O-GEM presenta direccionamiento hacia células madre tumorales metastásicas e induce muerte celular. Este tratamiento podría conseguir un mayor efecto antitumoral comparado con el tratamiento estándar con Gemcitabina, disminuyendo, además, la toxicidad dependiente de dosis observada en los quimioterápicos utilizados habitualmente, no sólo en ACDP sino en otras neoplasias.

RESUM

L' adenocarcinoma ductal de pàncrees (ACDP) és un tumor agressiu, de biologia tumoral i genètica complexa, amb mal pronòstic per el seu diagnòstic tardà i quimioresistència. El receptor de quimiocines, CXCR4 és un marcador de cèl·lules mare tumorals metastàtiques, associat amb un augment de la invasió, la disseminació tumoral i la quimioresistència en tumors pancreàtics. Aquest receptor seria, per tant, una diana excel·lent per al adreçament d'una teràpia antitumoral i antimetastàtica.

La motivació per a la realització d'aquest projecte de tesi ha estat la necessitat de desenvolupar treballs de recerca per millorar el diagnòstic, el pronòstic i el tractament de l'ACDP. En aquest treball s'han generat models en ratolí amb una major eficiència metastàtica que permeten ampliar l'estudi d'aquesta patologia i que s'han utilitzat, a més, per validar dos tractaments de l'àmbit de la nanomedicina: una membrana constituïda per nanofibres que permet un alliberament local i controlada de fàrmac cap al tumor primari i una nanopartícula per al lliurament dirigida d'un citotòxic cap a les cèl·lules mare tumorals CXCR4+, implicades en el procés de metàstasi.

Els objectius específics d'aquest projecte han estat: l'obtenció de mostres de ACDP humà i l'estudi de l'expressió de CXCR4; la creació de models en ratolí de ACDP d'alta eficiència metastàtica a partir de línies cel·lulars de ACDP i mostres tumorals humanes amb alta expressió de CXCR4; l'avaluació, en xenògrafs ortotòpics pancreàtics, de l'eficàcia terapèutica d'una membrana de nanofibres produïda per la polimerització d'àcid poli (làctic-co-glicòlic, PLGA) i carregada en la seva matriu amb el citotòxic SN38 (CEB-01-SN38) en tractament únic o en combinació amb quimioteràpia, i finalment, l'estudi de la citotoxicitat i biodistribució *in vivo* de la nanopartícula T22-O-Gemcitabina (T22-O-GEM), adreçada a l'eliminació selectiva de les cèl·lules mare metastàtiques.

Per a això, la metodologia ha inclòs experiments *in vitro* (cultiu cel·lular i l'obtenció de línies tumorals PANC-1 i MIA PaCa-2 amb expressió de CXCR4 i l'obtenció d'una línia tumoral a partir d'un tumor de ACDP de pacient), i experiments *in vivo* (la generació de models subcutanis de ACDP i models ortotòpics metastàtics, la implantació de membranes CEB-01, l'administració de quimioteràpia, el seguiment de l' creixement tumoral i avaliació de les metàstasis per bioluminescència), i finalment, l'avaluació de la citotoxicitat i biodistribució *in vivo* de T22-GFP-GEM.

Les nostres conclusions són que la implantació de cèl·lules tumorals amb sobreexpressió de CXCR4 augmenta significativament la disseminació tumoral i és útil per a l'avaluació preclínica d' antitumorals, que la implantació ortotòpica de biòpsies humanes amb alta expressió de CXCR4 és un model més predictiu per a la clínica, que la implantació de la membrana CEB-01 amb SN-38 permet el control de l' creixement tumoral local i la seva combinació amb quimioteràpia pot controlar la progressió tumoral i disminuir la càrrega tumoral metastàtica, i que la nanopartícula T22-O-GEM presenta adreçament cap a cèl·lules mare tumorals metastàtiques i induceix mort cel·lular. Aquest tractament podria aconseguir un major efecte antitumoral comparat amb el tractament estàndard amb Gemcitabina, disminuint, a més, la toxicitat dependent de dosi.

SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive neoplasia with a complex tumor behaviour and genetics. It has a poor prognosis due to its late diagnosis and chemo-resistance. CXCR4, a marker of metastatic tumor stem cells, has been associated with an increase in invasion, tumor spread and chemoresistance in pancreatic tumors. This receptor could be a good target for the addressing of an anti-tumor and antimetastatic therapy.

The motivation to perform this thesis has been the need to develop research work that will allow to find new tools that improve the diagnosis, prognosis and treatment of PDAC. In this work, mouse models have been generated with greater metastatic efficiency to expand the study of this pathology. They have also been used to validate two treatments in the field of nanomedicine, which allow a local controlled release of the drug in the primary tumor after surgical resection, and targeted administration of cytotoxic to CXCR4+ tumor stem cells, associated with metastasis, allowing an increase in pharmacological concentration and decreasing systemic toxicity.

The specific objectives of this project have been to obtain samples from human PDAC and to study the expression of CXCR4, the development of high-efficiency metastatic mouse models of PDAC from PDAC cell lines and human tumor samples CXCR4+. Those models were used to evaluate the therapeutic efficacy of a nanofiber membrane produced by poly acid polymerization (lactic-co-glycolic) loaded with cytotoxic SN-38 (CEB-01-SN38) and treated alone or in combination with chemotherapy, and the study of *in vivo* cytotoxicity and biodistribution of the nanoparticle T22-O-Gemcitabine (T22-O-GEM), aimed at selective elimination of metastatic stem cells.

To this end, the methodology has included conducting *in vitro* experiments: cell culture and obtaining PANC-1 and MIA PaCa-2 tumor lines with high CXCR4 expression and a tumor line from a patient's PDAC tumor, as well as *in vivo* experiments developing subcutaneous PDAC models and metastatic orthotopic models, implantation of CEB-01 membranes, administration of chemotherapy, monitoring of tumor growth and determination of metastases by bioluminescence, and finally, the evaluation of cytotoxicity and *in vivo* biodistribution of T22-GFP-GEM.

Our conclusions are that implantation of tumor cells with CXCR4 overexpression significantly increases tumor spread being usefulness for preclinical evaluation of antitumor compounds. The orthotopic implantation of human biopsies with high expression of CXCR4 is a more predictive and translational model for preclinical assays. The implantation of the CEB-01 membrane loaded with the drug SN-38, can control the local tumor growth alone or combined with chemotherapy, decreasing metastatic tumor spread, and finally, the T22-O-GEM nanoparticle could be used to eliminate metastatic cancer stem cells and it might induce greater antitumor effects than the standard treatment with Gemcitabine, reducing the side effects of standard chemotherapeutic treatments.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA, ANATOMO-PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DEL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

1.1. Epidemiología

El ACDP es el tumor maligno más frecuente en el páncreas. Representa el 85% de todas las neoplasias pancreáticas y es la cuarta causa de muerte por cáncer en Europa. Se estima que en 2030 en nuestro medio será la segunda causa de muerte por cáncer si no se desarrollan nuevos métodos que mejoren su diagnóstico y tratamiento.¹

Su incidencia se ha mantenido estable en el tiempo, no obstante, el aumento en la aplicación clínica de las técnicas de imagen como la ecoendoscopia y la tomografía computarizada (TC) ha incrementado el hallazgo incidental de lesiones quísticas en el páncreas. Algunas de ellas presentan un alto potencial de malignización, de hasta el 30-40% (como sucede en la neoplasia mucinosa papilar intraductal- NMPI). Otras lesiones quísticas de características benignas también son susceptibles de una resección quirúrgica y una evaluación anatomo-patológica definitiva para descartar malignidad.²

Desde un punto de vista epidemiológico, los factores de riesgo asociados con una mayor incidencia en el desarrollo del adenocarcinoma ductal de páncreas son el tabaco, la obesidad, la diabetes mellitus, los antecedentes familiares y la historia previa de pancreatitis crónica.³

1.2. Descripción anatómica macro y microscópica del ACDP

La mayoría de los ACDP se presentan como masas blanco-grisáceas que no se encuentran circunscritas al páncreas y que tienen un tamaño medio de 3-5cm. Muchos de los ACDP provienen de pequeños conductos situados en la periferia del órgano y la mayoría se originan en la cabeza pancreática, por lo que al crecer pueden causar tanto obstrucción del conducto pancreático principal dando lugar a pancreatitis crónica en el segmento obstruido, como del conducto biliar principal dando lugar a una ictericia obstructiva indolora.⁴

Cuando el ACDP debido a su crecimiento presenta invasión locorregional, las estructuras adyacentes como el duodeno, la vena porta o los vasos mesentéricos superiores pueden verse afectados. Generalmente el tumor se asocia a afectación metastásica de los nódulos linfáticos peripancreáticos mesentéricos, aunque otras regiones ganglionares linfáticas como la perigástrica, mesentérica, omental y/o portahepática también pueden estar involucradas. Si bien es frecuente la invasión vascular y perineural, aún en la actualidad no se conocen bien sus implicaciones clínicas en el ACDP.⁴

La anatomía patológica generalmente describe el ACDP como un tumor de tipo moderado o pobremente diferenciado, con estructuras semejantes a los conductos pancreáticos y con producción de mucina. La gradación histológica se basa en la prevalencia de células mitóticas (G1, G2, G3).⁴

Es característico del ACDP contener un estroma fibroso denso, con reacción desmoplásica. Esta reacción consiste en una proliferación celular fibroblástica extensa en la que intervienen también proteínas de la matriz extracelular, células pancreáticas estrelladas miofibroblásticas y células del sistema inmunitario. Todo ello contribuye a la fisiopatología del ACDP facilitando el crecimiento de células tumorales pancreáticas, así como la secreción de factores de crecimiento y moduladores inmunes. El papel de la reacción desmoplásica en el ACDP ha tomado una importancia creciente porque podría explicar los mecanismos de resistencia a los tratamientos y con los consecuentes malos resultados en los pacientes afectos de cáncer de páncreas.⁵

1.3. Diagnóstico y estadaje

Los ACDP localizados en la cabeza de páncreas tienden a diagnosticarse antes que los de cuerpo y cola de páncreas, ya que lesiones más pequeñas pueden producir una sintomatología de forma más manifiesta y más temprana. El diagnóstico del ACDP debe establecerse mediante biopsia o resección quirúrgica, especialmente en lesiones quísticas con alto potencial de malignidad, y sobre todo ante la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial frente a masas pancreáticas por pancreatitis. Además se hace necesario confirmar el diagnóstico de ACDP en caso de diseminación e irresecabilidad a fin de descartar la operabilidad de estos pacientes.

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico y estadaje del ACDP son la TC, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la ecoendoscopia. De todas ellas, la TC con contraste endovenoso es la mejor para establecer el diagnóstico y la resecabilidad con una

fiabilidad hasta del 80%. La ecoendoscopia tiene el valor añadido de la posibilidad de realizar biopsias tumorales altamente eficaces.^{6,7}

La estadificación del ACDP tiene en cuenta tres escenarios: resecable, localmente avanzado y/o enfermedad metastásica. Los factores considerados en el estadiaje preoperatorio son el tamaño tumoral, la afectación vascular, la edad y la comorbilidad. Partiendo de estos factores y teniendo en cuenta los casos resecables se debe decidir el procedimiento quirúrgico, pues el único tratamiento potencialmente curativo es la cirugía radical con intención curativa y márgenes negativos. Según la localización del tumor se realiza una duodenopancreatetectomía cefálica (DPC), según técnica de Whipple, una panreatectomía distal o una panreatectomía total.^{8,9}

Sólo un 15-20% de los ACDP son resecables al diagnóstico. Es decir, presentan tumores localizados resecables sin enfermedad metastásica, en el contexto de un paciente con buena calidad de vida medida según escalas de estado funcional (*Performance Status [PS]*). La irresecabilidad se debe a la presencia de invasión local y/o vascular (enfermedad localmente avanzada o resecable borderline) y a la presencia de metástasis a distancia.^{8,10} Los márgenes afectos suponen un factor pronóstico negativo y se ha visto que aquellos pacientes intervenidos con afectación macroscópica de los márgenes no presentan ningún beneficio en la supervivencia, siendo similar a la de pacientes no intervenidos.¹¹

Los datos aportados por la bibliografía actual muestran una supervivencia del 24% a los 5 años tras una cirugía R0 en casos resecables, en casos localmente avanzados es del 9% y del 2% para ACDP metastásico. En tumores de menos de 2cm y resecables la supervivencia a los 5 años puede llegar hasta un 50%, y cercana al 100% en tumores menores a 1cm. Sin embargo, si existe afectación ganglionar, aún en los casos resecables la supervivencia disminuye hasta el 7-8% a los 5 años.^{1,10}

La mortalidad hospitalaria tras la resección de un ACDP suele ser, en centros con experiencia, inferior al 2%, mientras que la morbilidad postoperatoria es alta, generalmente superior al 60%. Las complicaciones incluyen el vaciado gástrico, infecciones de heridas, abscesos abdominales y fistulas pancreáticas. Además el concepto actual del *fast-track* (recuperación rápida) como protocolo perioperatorio estandarizado y coordinado ha ayudado a manejar estos pacientes, permitiendo reducir el estrés quirúrgico, acelerando la recuperación postoperatoria y mejorando la seguridad. El

curso postoperatorio sin complicaciones está asociado a mejor supervivencia.^{10, 12} La existencia de equipos médicos experimentados capaces de detectar y tratar las complicaciones postoperatorias de manera temprana y adecuada es básico para obtener buenos resultados.¹³

El mejor marcador sérico para el seguimiento del ACDP es el Ca 19.9 (antígeno carbohidrato 19.9). Este marcador presenta una sensibilidad y especificidad del 80% al diagnóstico, aunque también puede estar elevado en condiciones benignas como la presencia de colestasis o pancreatitis. Por ello, se utiliza más como marcador pronóstico que diagnóstico, siendo necesario encontrar marcadores específicos que ayuden a detectar estadios tempranos de ACDP. Aunque se están evaluando un número importante de potenciales biomarcadores para uso en el diagnóstico y screening del ACDP, de momento ninguno ha demostrado suficiente precisión, siendo necesarios más estudios en este campo.¹⁴

El pronóstico del ACDP depende tanto del grado histológico como de la extensión de la enfermedad y suele ser malo debido a varios motivos: diagnóstico en estadios avanzados, naturaleza agresiva con invasión neurovascular y metástasis tempranas, resistencia a tratamientos convencionales de quimioterapia y radioterapia (RT), y presencia de múltiples alteraciones genéticas y/o epigenéticas y del microambiente tumoral.

Para aumentar la supervivencia de los pacientes afectos de un ACDP es necesario optimizar el diagnóstico de la enfermedad, así como perfeccionar las estrategias terapéuticas neoadyuvantes y adyuvantes a la cirugía. El objetivo sería por un lado incrementar el número de casos resecables con intención curativa, y por otro, focalizar su acción sobre las células tumorales y del estroma circundante, y así mejorar su pronóstico tras la resección quirúrgica.

2. BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOPATOLOGÍA DEL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

Aproximadamente un 5-10% de los pacientes afectos de un ACDP tienen una predisposición genética para su desarrollo.¹⁵ No obstante, la mayoría de los ACDP tiene carácter espontáneo (95%) y se han asociado con una serie de factores de riesgo ambientales. El más relacionado con el desarrollo de ACDP es el hábito tabáquico, aunque existen otros como la obesidad, el consumo de alcohol, historia de diabetes o de pancreatitis previa y factores relacionados con la alimentación.³

2.1. Genética del ACDP

El ACDP presenta múltiples mutaciones genéticas, detectándose unas 12 vías de señalización molecular alteradas, y que se están investigando para el posible desarrollo de una terapia génica y/o inmunológica dirigida. Entre estas señalizaciones son muy prevalentes las mutaciones del oncogén KRAS, que acontecen en un 80-95% de los tumores, los genes supresores de tumores como CDKN2A (85-98%) que contienen además presencia de delecciones e hipermetilaciones, mutaciones en TP53 (55%) y delecciones homocigotas o mutaciones en SMAD4 (figura 1).^{15, 16}

Algunas de estas mutaciones se pueden encontrar también en patologías precursoras de cáncer de páncreas, por ejemplo la pancreatitis crónica, donde un 30% de los pacientes tienen mutaciones detectables en p16 y un 10% tienen mutaciones en KRAS.¹⁷

Existen multitud de mutaciones con una incidencia individual por debajo de 10%. Son genes que pertenecen a vías de señalización comunes, e incluye la vía TGFβ, mutaciones en proteínas del ciclo de control celular y la señalización WNT/NOTCH. El 1% de los ACDP presentan inactivación somática de genes de reparación del ADN (*Mismatch Repair genes [MMR]*), como MLH1 y MSH2.¹⁸

Numerosos estudios confirman el incremento de frecuencia de las mutaciones KRAS, CDKN2A, TP53 y SMAD4 con el incremento de atipia de neoplasia intraepitelial pancreática (PanINs).¹⁹ Las mutaciones en KRAS están presentes en más del 99% de las lesiones PanIN1 y en la mayoría de los estadios de PanIN, pero la proporción de células que contiene KRAS aumenta con el grado de PanIN. La pérdida de la proteína p16INK4A

aparece en PanIN2 y PanIN3 y el acúmulo nuclear de TP53 o la pérdida de SMAD se ha demostrado en PAnIN3 y cánceres invasivos. La frecuencia de estas alteraciones somáticas es mayor en adenocarcinomas.²⁰

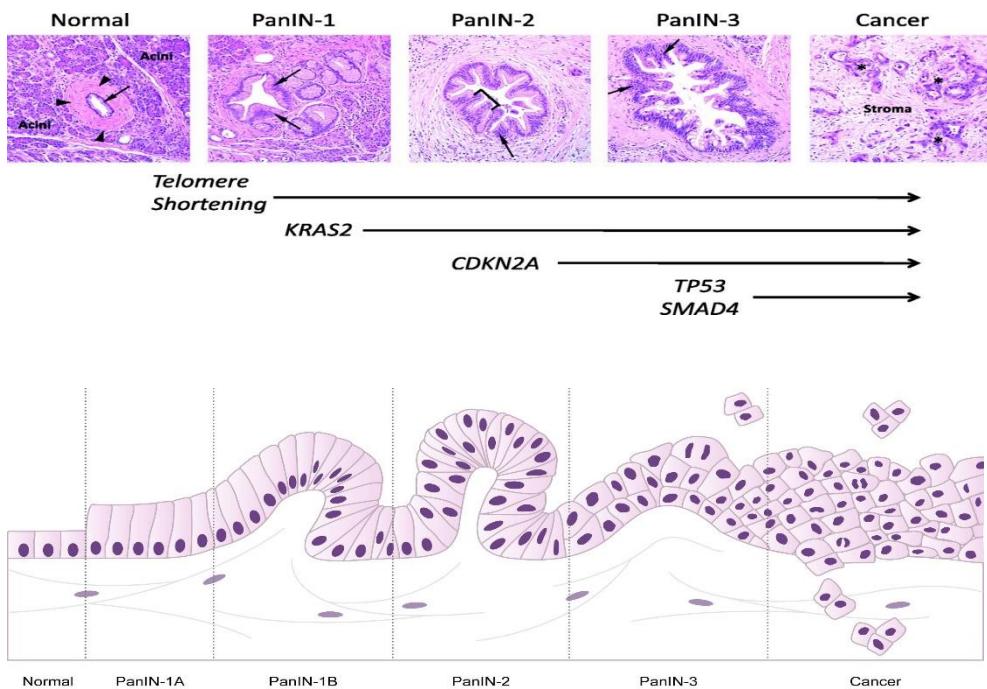


Figura 1. Iacobuzio-Donahue 2012; Chang D et al. 2008

La naturaleza clonal de mutaciones compartidas entre PanIN y tumores avanzados soportan el modelo de progresión del ACDP, aunque también puede ocurrir que una única alteración en un cromosoma lleve a múltiples mutaciones genéticas que den lugar a la transformación neoplásica de las células precursoras del ACDP. Si esto es cierto, la progresión puede ser más corta de lo inicialmente estimado, pero es necesaria su validación en modelos *in vivo*.^{18, 20, 21}

A pesar de que se ha identificado a KRAS como oncogén principal para el desarrollo del ACDP, las mutaciones del oncogén KRAS se pueden encontrar en células pancreáticas de individuos que no presentan PanIN, lo que significa que esta mutación es necesaria pero no suficiente para iniciar la carcinogénesis pancreática. Además, las personas con mutaciones germlinales en KRAS no presentan mayor desarrollo de adenocarcinoma ductal de páncreas u otras secuelas pancreáticas ni neoplásicas. Por otra parte, KRAS no es siempre la mutación promotora de carcinogénesis pancreática sino que otras mutaciones como CDKN2A pueden actuar aumentando el número de eventos genéticos

perjudiciales dando lugar a inactivación genética y a la promoción de carcinogénesis en el páncreas.²⁰⁻²²

Un hecho importante en la carcinogénesis del ACDP ha sido la identificación de mutaciones somáticas recurrentes en genes que codifican reguladores epigenéticos, específicamente miembros del complejo SWI/SNF y de la familia de la N-metiltransferasa histona-lisina. Los genes más frecuentemente mutados son ARID1A y SMARCA2, y a diferencia de las mutaciones producidas en CDKN2A, TP53 y SMAD4, en estas familias de genes sólo se requiere la pérdida de función de un alelo para sus efectos en la carcinogénesis pancreática.²⁰

Muchos pacientes intervenidos presentan recurrencia del ACDP debido a que algunas poblaciones de células cancerígenas no son eliminadas locorregional ni sistemáticamente. La dinámica a partir de la cual estas poblaciones de células cancerosas sobreviven, generan clones resistentes o se contribuye a alteraciones genéticas, todavía es desconocido, a pesar de la quimioterapia y de los diferentes estudios sobre mecanismos de resistencia en cáncer.

En diferentes estudios se ha comprobado que la diseminación ocurre en los estadios iniciales del ACDP y que ésta no es un paso limitante para la formación de metástasis. La genética heterogénea intratumoral se define por la existencia de múltiples subclones con distintas mutaciones pasajeras o conductoras, pero análisis recientes indican que estas mutaciones subcloniales no son relevantes comparadas con las mutaciones clonales conductoras. No se han encontrado mutaciones genéticas específicas de metástasis, sin embargo una proporción de la eficiencia metastásica está determinada por el aumento de alteraciones genéticas en KRAS, CDKN2A, TP53 y SMAD4 que se produce durante la expansión clonal y antes del momento de la invasión. Estudios sobre el ACDP metastásico han permitido demostrar que los diferentes subclones del tumor primario comparten la misma mutación clonal conductora.²⁰ Estudios recientes utilizando estirpes en modelos murinos de ACDP han evidenciado que se requiere la diseminación multiclonal para iniciar metástasis órgano-específicas.¹⁸

Recientemente, los análisis transcriptómicos han definido al ACDP en subtipos moleculares, confirmados por la *International Cancer Genome Consortium* (ICGC): progenitor, escamoso y exocrino endocrino con diferenciación aberrante (*Aberrantly Differentiates Endocrine Exocrine* [ADEX]). También se ha identificado un nuevo subtipo

inmunogénico, parcialmente superpuesto con el descrito previamente como progenitor o clásico.¹⁹

Se ha sugerido que el subtipo escamoso tiene peor pronóstico y mayor resistencia a quimioterapia. Además los análisis de secuenciación de ARN en células del ACDP han identificado distintos subtipos de células neoplásicas epiteliales. No se ha asociado ninguna alteración genómica específicamente con los subtipos transcriptómicos, aunque en el subtipo escamoso se han identificado más mutaciones en TP53, indicando que existen mecanismos no genéticos detrás de la formación de subtipos.²⁰

Se han identificado algunos programas de transcripción como iniciadores de la formación de subgrupos de células tumorales: GAT6 para el subtipo progenitor/clásico, y pérdida de KDM6A y regulación a la alza de ΔNP63/YAP1/GLI2 para el subtipo escamoso.²⁰

Las células mieloides que infiltran el tumor en el microambiente tumoral son capaces modificar la transcripción de células tumorales hacia el subtipo escamoso. La disminución de estas células mediante la inhibición del CSF1R o CXCR2 modifica la expresión del tumor evitando su configuración como el subtipo escamoso. Esto es un ejemplo de la dinámica de la expresión de la señalización tumoral y la relación con el microambiente tumoral en definir la identidad molecular tumoral.^{18, 23}

2.2. Estroma tumoral

El estroma en el ACDP conforma el microambiente tumoral (*Tumor Microenvironment* [TME]) y constituye el 80% del total de la masa del tumor. Está formado tanto por un componente celular como acelular (figura 2).²⁴

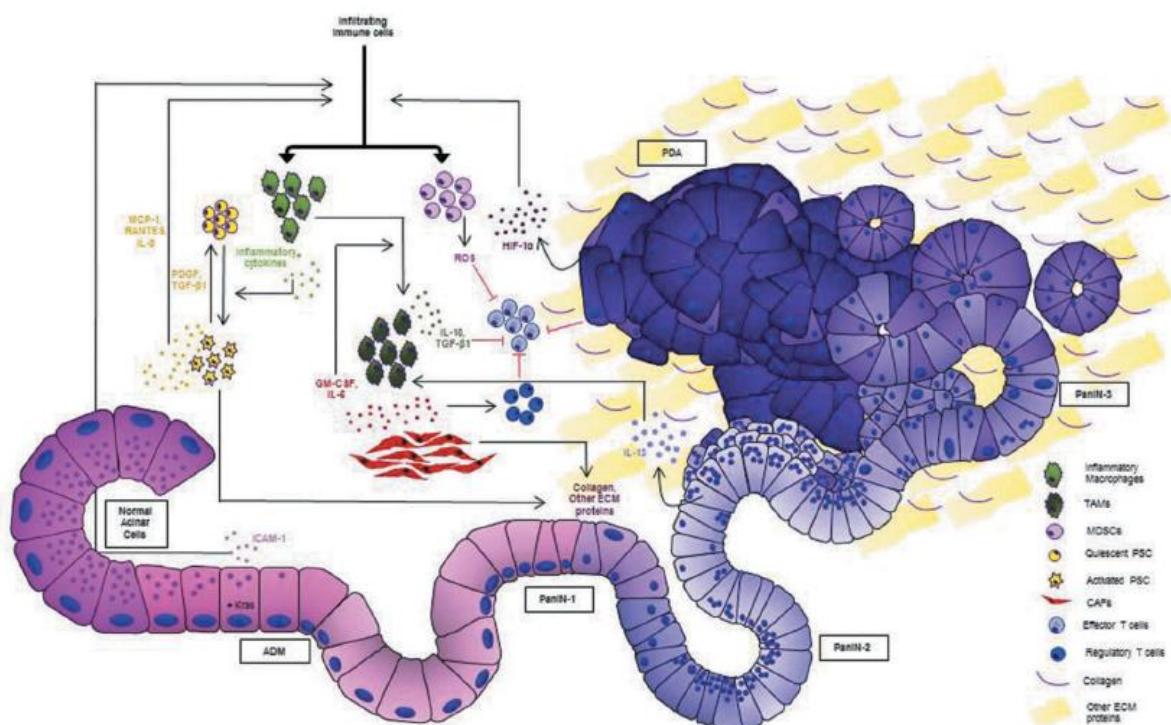


Figura 2. Pandey V. et al. 2019

Los componentes del TME son:

2.2.1. Componente celular

- Células estrelladas pancreáticas (Pancreatic stellate cells [PSCs])

Son las células más abundantes del estroma tumoral. Se encuentran en el páncreas exocrino, generalmente en los espacios periacinarios, perivasculares y en regiones

periductales del páncreas, y presentan un estado quiescente. Participan en la patogénesis de la enfermedad al transformarse a un estado activado (estado fibroblástico), inducido a través de la exposición de citoquinas y factores de crecimiento secretados por células acinares, células inflamatorias, plaquetas, células endoteliales, células tumorales y las propias células estrelladas pancreáticas, mediante mecanismos de regulación paracrina y autocrina.²⁵ A partir de este estado de activación proliferan, migran y producen proteínas de la matriz extracelular, citoquinas inflamatorias como IL-8, quimioquinas (MCP-1 y RANTES) y factores de crecimiento (PDGF, TGF α y TGF β) contribuyendo en su propia proliferación y activación.²⁶ También producen metaloproteinasas y sus inhibidores que participan en el recambio del TME.^{24, 27}

Existen evidencias de una interrelación entre las células tumorales y las células estrelladas pancreáticas que resulta en un incremento en el crecimiento tumoral y en la generación de metástasis.²⁴ Las células estrelladas pancreáticas segregan factores solubles que inducen un fenotipo determinado de células tumorales pancreáticas que protegen a éstas, disminuyendo la efectividad de la radiación y la quimioterapia (como la Gemcitabina).²⁸

- Fibroblastos asociados al tumor (*Cancer-associated fibroblasts [CAFs]*)

La función primaria de los fibroblastos es facilitar la regeneración tisular. Generalmente se encuentran en estado quiescente, y una vez activados producen factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular. La heterogeneidad de los fibroblastos depende de su interacción con células tumorales a través de señales paracrinas, facilitando el crecimiento y la proliferación de las mismas, así como la invasión celular (mediante la expresión de Laminina-332 y $\alpha 3\beta 1$ Integrina). También segregan citoquinas como GM-CSF e IL-6, importante en la diferenciación de monocitos hacia macrófagos pro-tumorales, que contribuyen a la progresión tumoral.^{24, 27}

- Células supresoras derivadas de mieloides (*Myeloid-derived suppressor cells [MDSCs]*)

Son un tipo de células inmaduras derivadas de la médula ósea que tienen como función primaria la inmunorregulación y la reparación tisular y que presentan plasticidad ya que no están totalmente diferenciadas. En el contexto del TME, crean un ambiente inmunosupresor. En el ACDP se han identificado MDSCs circulantes que se correlacionan con el estadio de la neoplasia. A medida que crece el tumor primario y se genera un ambiente hipóxico, factores inducibles por hipoxia (*Hipoxia-Inducible Factors*

[HIF]) como HIF α se regulan a la alza permitiendo el reclutamiento de MDSCs al TME. Las MDSCs pueden liberar especies de oxígeno reactivas (*Reactive Oxygen Species [ROS]*) que inducen estrés en otras células inmunitarias presentes en TME, como las células T, obstaculizando su proliferación. También pueden regular a la alza el PD-L1, que se une a la proteína PD-1 presente en células T activadas, inactivándolo. Las MDSCs en un ambiente hipóxico pueden diferenciarse en macrófagos a través de la activación de la fosfatasa CD45 y la inhibición de STAT3.^{24, 29}

- Macrófagos asociados al tumor (*Tumor-associated macrophages [TAMs]*)

Surgen de dos fuentes principales: 1) la quimioatracción producida en el estroma del ACDP (IL-4, IL-13 e ICAM-1) y CSF-1, y 2) son generados de la polarización de macrófagos M1 proinflamatorios a un fenotipo M2-like. Los macrófagos M2-like se detectan principalmente en los estadios avanzados del ACDP y se correlacionan con invasión neoplásica, con las metástasis tempranas y una disminución en la supervivencia global.

Los TAM segregan IL-10 y TGF- β y promueven la progresión tumoral creando un ambiente inmunosupresor y fibrótico. El TGF- β inhibe el crecimiento celular en estadios tempranos pero tiene un papel inmunosupresor a medida que el ACDP progresiona. Las células tumorales, a su vez, pueden modular la polarización al fenotipo M2-like mediante la secreción de IL-13 y condiciones hiperglucémicas.^{23, 24}

2.2.2. Componente acelular

- Proteínas de la matriz extracelular

La matriz extracelular es producida principalmente por los fibroblastos y las células estrelladas pancreáticas y está formada principalmente por colágenos de tipos I, III, IV, ácido hilaurónico, fibronectina y laminina. Estas proteínas construyen una matriz que favorece la interacción con las células tumorales directamente para aumentar su crecimiento, promover la proliferación y migración de células tumorales, creando una barrera física frente a quimioterápicos y células inmunes.³⁰

La laminina, fibronectina y el IGF-1, mediante la interacción con los receptores de integrina de las células tumorales promueven su supervivencia, protegen de la apoptosis y regulan la adhesión y migración de las células tumorales pancreáticas.³¹

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano secretado por las células tumorales. Forma una matriz elástica gel-*like* entre las fibras de colágeno y ayuda a retener los factores de crecimiento y citoquinas en el estroma. Además, favorece la captación de agua, aumentando la presión intersticial, lo que lleva a hipoperfusión, hipoxia y colapso vascular, impidiendo la llegada de quimioterápicos a las células tumorales.^{24, 32}

- Metaloproteinasas de la matriz extracelular (*Matrix Metalloproteinase [MMP]*)

Son enzimas proteolíticas encargadas de degradar las proteínas de la matriz extracelular promoviendo el crecimiento, la invasión y la diseminación tumoral. Algunas metaloproteinasas como la MMP-9 están sobreexpresadas en el ACDP y son esenciales para la invasión tumoral.^{24, 33}

2.3. Células madre tumorales y metastásicas

Las células madre tumorales (CMTs) se describen como una población celular en el tumor con capacidad de autorrenovarse y producir clones heterogéneos de células cancerosas (cohorte de células hijas transitorias) que mantienen el crecimiento del tumor.³⁴ Las CMTs tienen propiedades como plasticidad celular (habilidad de una célula para diferenciarse en una línea celular), potencial fenotípico (capacidad de una célula de adoptar una nueva identidad o destino en respuesta a diferentes condiciones ambientales), tumorigenidad y potencial clónico. También tienen capacidades metabólicas, autofágicas, invasivas y quimiorresistentes que permiten su continua autorrenovación y favorecen su evasión y resistencia a los tratamientos quimioterápicos.³⁴

La teoría más admitida es que las CMTs se originan por la acumulación de mutaciones que ocurren en una célula madre normal desencadenando finalmente una transformación maligna.³⁵ Otros estudios muestran que las mutaciones en células más diferenciadas pueden promover la capacidad de autorrenovación no regulada y con propiedades similares a las células madre.³⁵

Las CMT pancreáticas con capacidad de iniciación tumoral pueden ser identificadas mediante la expresión de distintos marcadores proteicos, como CD44, CD24, CD133 o c-Met. Estas CMT pueden autorrenovarse y diferenciarse en varios tipos de células para generar la heterogeneidad del tumor primario.³⁵

Inductores del TME como TGF- β , HedgeHog (HH) o Notch hacen que las células tumorales puedan adquirir un fenotipo reminiscente al de las CMT pancreáticas, con marcadores CD44+CD24+ESA+.³⁶

Los marcadores CD44 y CD24 promueven las interacciones célula-célula.³⁶ Las CMT pancreáticas CD133+ con expresión concomitante de CXCR4+ presentan mayor habilidad migratoria y contribuyen a la capacidad metastásica.³⁷ Aquellas células que expresan c-Met responden a la secreción de ligandos para la activación de vías del desarrollo en CMT pancreáticas, como β -catenina, Notch y Stat3. Estas vías estimulan la expresión de genes que influyen en propiedades de las células madre como la autorregulación.³⁸

Las CMTs residen en los llamados “nichos”, que contienen además otras células (células endoteliales, inflamatorias, fibroblastos, etc.) que conforman un microentorno adecuado para la función de las CMTs, regulándolas mediante la interacción celular y la liberación de factores de señalización. Gracias a sus propiedades plásticas las células progenitoras, las células madre, hijas, y las células de transición pueden moverse en una jerarquía continua mediante señalización extracelular, por lo que aquellas células que no son células madre pueden entrar en el proceso de diferenciación celular cuando se necesite.
^{37, 39, 40} Se han descrito varias vías de señalización como la Notch y HH que regulan la actividad de las CMTs.³⁷

La vía de Notch se necesita para la función de las CMT de ACDP. La señalización Nodal/Activina (que pertenecen a la superfamilia TGF- β) es importante para el mantenimiento celular en el embrión humano y es fuertemente expresada en CMTs de ACDP. La vía Nodal/Activina puede afectar la capacidad autorrenovadora y promover la invasión de las CMTs en ACDP.³⁷

Comparado con las células epiteliales pancreáticas normales, la expresión de HH fue elevada en células CD44+CD24+ESA+, lo que sugiere que el ligando de señalización HH está expresado significativamente en las CMTs.³⁵

Las CMTs parecen activar mecanismos celulares que les otorgan quimiorresistencia. Se han identificado algunas subpoblaciones de células madre resistentes a tratamientos: resistencia a Gemcitabina en subpoblación CD133+ en la línea L3.6pl de cáncer pancreático metastásico³⁷, resistencia a Gemcitabina en la subpoblación

CD44+CD24+EpCAM+ con sobreexpresión de vimentina y reducción de E-cadherina⁴¹, resistencia a tratamiento en subpoblaciones CD133+ con transportadores ABC o dependientes de ATP como ABCG2+.⁴²

2.4. CXCR4 en cáncer de páncreas

Las quimioquinas son una familia de citoquinas quimioatrayentes proinflamatorias que funcionan como ligandos activando a receptores específicos 7-transmembrana acoplados a proteínas G (*G-protein-coupled receptors [GPCR]*). Son los reguladores principales en el tráfico y adhesión celular, supervivencia, proliferación y transcripción de genes. Estos receptores están presentes en casi todos los tipos celulares.

Una de estos receptores es CXCR4, que ha sido identificado hasta en 23 neoplasias epiteliales, mesenquimales y hematopoyéticas, y en líneas celulares de cáncer de páncreas y muestras de ACDP humano.^{43, 44}

En el metaanálisis publicado por *Ding et al.* se analizaron un total de 327 estudios, donde se había evaluado la tasa de expresión CXCR4 en ACDP frente a tejido pancreático normal revelando que en ACDP los niveles de expresión eran mayores que en tejido pancreático normal, sugiriendo que el CXCR4 puede ser un marcador molecular para el diagnóstico y pronóstico de ACDP y para una futura terapia antitumoral.

2.4.1. CXCL12/CXCR4

El CXCR4 es el receptor predominante de unión al factor 1 alfa derivado de las células estromales (*Stromal cell-Derived Factor 1 [SDF-1α]*) o también llamado CXCL12. El CXCL12 es quimioatrayente para células hematopoyéticas maduras e inmaduras.⁴³ Varios tejidos humanos expresan SDF/CXCL12, como pulmones, hígado, cerebro, nódulos linfáticos, células epiteliales, médula ósea y células estromales. La expresión de CXCL12 podría producirse por los fibroblastos en áreas hipóxicas tumorales situadas en el microentorno tumoral, y la expresión de CXCR4 por las células tumorales⁴⁵, formando un eje de señalización CXCL12/CXCR4.⁴³

El eje CXCL12/CXCR4 activa diferentes cascadas de señalización en el proceso de carcinogénesis, incluyendo Ras, PI3K (quinasa reguladora de señal extracelular), fosfolipasa C/, MAPK, p38 MAPK, y la quinasa C-Jun N-Terminal/ proteína quinasa activada por estrés.⁴³

Está implicado en los procesos de proliferación tumoral, la neo-angiogénesis, la invasión, la migración (mediante degradación de la matriz) y la diseminación de las células cancerosas.⁴³

Se ha visto que puede promover la progresión de ACDP mediante la activación de vías de señalización como AKT, MAPK, NF- κ B, HIF-1 α . La señalización CXCL12/CXCR4 es crítica en la regulación de CMT y protege de la apoptosis. *Hermann et al.* descubrieron que de dos subgrupos diferentes de células madre cancerosas CD133+ basadas en su habilidad de formar metástasis, sólo aquella con expresión adicional de CXCR4 fue capaz de producir metástasis.³⁷

Datos de distintos ensayos clínicos de modelos murinos *in vitro* e *in vivo* subrayan el papel del receptor y ligando CXCR4/CXCL12 para incrementar la malignidad de células tumorales pancreáticas.^{45, 46}

Los tejidos con expresión de CXCL12 (nódulos linfáticos, hígado...) pueden facilitar el direccionamiento de células tumorales pancreáticas con expresión de CXCR4 mediante la interacción ligando-receptor. Esta interacción influye en la adhesión, la migración y la invasión de células tumorales, reflejando la fuerte asociación entre CXCR4 con las metástasis tumorales. *Ding et al.* concluyen que todos estos hallazgos muestran que el CXCR4 juega un papel importante en el proceso de metástasis en el ACDP.⁴³

2.4.2. CXCR4 y EGFR

El CXCR4 se ha relacionado con el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor [EGFR]*), altamente expresado en ACDP y que está relacionado con la carcinogénesis y su desarrollo. Sin embargo, la expresión de EGFR sola tiene significación clínica y pronóstica limitada. Se ha visto que la coexpresión EGFR/CXCR4 identifica a un subgrupo de pacientes con ACDP con características tumorales más agresivas y pronóstico significantemente peor. Estos estudios sugieren una importante relación/diálogo entre CXCR4 y las vías intracelulares de EGFR e indican que la inhibición simultánea de estas vías puede suponer una estrategia terapéutica atractiva para el ACDP.⁴⁷

2.4.3. CXCR4 y CXCR7

Otras quimioquinas como CXCR7 pueden jugar un papel en la patogénesis de ACDP en relación con el HIF-1 α , que induce la transcripción de quimiorreceptores como CXCR4, CXCR7, CXCR1 y CXCR2. Algunos estudios analizaron el impacto de estas quimioquinas y el HIF-1 α en el resultado de pacientes intervenidos de ACDP y en factores clínico-patológicos, sin resultados concluyentes.^{47, 48} Algun estudio ha propuesto que CXCR7 puede modular la señalización de CXCR4 mediante el secuestro de CXCL12 y actuando en la quimioatracción y migración de las células CXCR4+.⁴⁹

En el estudio publicado por *Marechal et al.* se describe que CXCR4 y CXCR7 tienen diferentes dominios de unión de CXCL12 y los ejes de CXCL12/CXCR4 y CXCL12/CXCR7 tienen distintas funciones en el desarrollo tumoral. Según este estudio, el análisis combinado de la coexpresión de CXCR4 y CXCR7 nos permite identificar un subgrupo de pacientes ACDP con sobreexpresión de estas quimioquinas con peor pronóstico.⁴⁵

Otros estudios proponen que CXCR7 puede modular la señalización de CXCR4, pero debido al escaso número de estudios que analizaron la coexpresión de CXCR4, CXCR7 y CXCL12 en ACDP no se encontraron hallazgos concluyentes en la regulación de estas vías ni en la supervivencia global o libre de enfermedad.^{50, 51}

2.4.4. CXCR4 y relación con el pronóstico en ACDP

Distintos estudios publicados han reportado que la expresión elevada de CXCR4 en células tumorales de ACDP puede constituir un factor pronóstico adverso, relacionado con peor pronóstico y menor supervivencia.^{44, 45, 52}

El metaanálisis publicado por *Krieg et al.* analiza datos de 9 estudios y un total de 1183 pacientes, y observa una asociación entre la expresión de CXCR4 y pronóstico pobre, con una mayor expresión de CXCR4 en tumores con ganglios positivos, sugiriendo que el CXCR4 es un biomarcador pronóstico en ACDP y que puede ser evaluado como orientación terapéutica en el tratamiento de enfermedad metastásica en el páncreas. Debido a la heterogeneidad de algunos estudios incluidos, no se pudieron establecer asociaciones significativas entre la presencia de CXCR4 y metástasis distante, ni una correlación entre la supervivencia global y CXCR4.⁵¹

El metaanálisis publicado recientemente por *Ding et al.* concluye que la sobreexpresión de CXCR4 es un factor pronóstico robusto asociado al riesgo de afectación ganglionar, al ACDP de alto grado y estadio tardío y a las metástasis a distancia.⁴³

Los autores creen que la importancia clínica de la expresión de CXCR4 en ACDP es controvertida y que la asociación entre sobreexpresión de CXCR4 y características clínico-patológicas no son concluyentes debido a que la mayoría de estudios incluidos son retrospectivos y a que el número de muestras testadas en cada estudio es pequeño.

2.4.5. Antagonistas frente a CXCR4

Algunos estudios han tenido como objetivo evaluar la asociación entre la sobreexpresión de CXCR4 y supervivencia libre de enfermedad y global, sugiriendo que el desarrollo de estrategias contra el CXCR4 puede ser un abordaje terapéutico prometedor y de relevancia importante para la salud pública.⁵¹

Muchas terapias anti-CXCR4 todavía están en desarrollo debido a que no está claro el factor pronóstico de la sobreexpresión de CXCR4 en diferentes tumores y muchos de ellos han dado lugar a una asociación no significativa entre la expresión de CXCR4 y los resultados oncológicos.

La expresión de CXCR4 se ha asociado con resistencia a Gemcitabina *in vitro* y en modelos animales. El uso de un anticuerpo monoclonal frente a CXCR4 fue capaz de reducir la invasión y metástasis de ACDP en modelos murinos.⁴³ Recientemente, se ha revelado que las células que expresan CXCR4+ dentro de la población de CD33+ son las que aportan la capacidad de diseminación y resistencia a Gemcitabina en el cáncer de páncreas, por lo que este receptor supone una diana excelente para el direccionamiento de una terapia antitumoral y antimetastásica.⁵²

El eje CXCL12/ CXCR4 también ha surgido como nuevo objetivo para terapia en ACDP. Distintos ensayos clínicos están testando antagonistas de CXCR4 en terapia combinada con otros agentes quimioterápicos como Gemcitabina.⁴³

Algunas publicaciones sugieren que la tinción inmunohistoquímica positiva para CXCR4 puede ser utilizada para seleccionar a aquellos pacientes que requieran terapia adyuvante con antagonistas de CXCR4.⁴⁵

3. MODELOS ANIMALES EN ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

Los modelos animales en el ACDP son válidos para la identificación de marcadores y dianas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas que nos permitan una mejor comprensión de la fisiopatología de la carcinogénesis y la progresión tumoral en el ACDP. También son válidos para la evaluación de la eficacia terapéutica y la respuesta a terapias experimentales previamente a ser evaluadas en ensayos clínicos con humanos y aprobadas para su utilización en salud humana (figura 3).⁵³

Para que los modelos animales sean útiles deben reproducir los patrones de alteración genética y fisiopatología del ACDP humano.

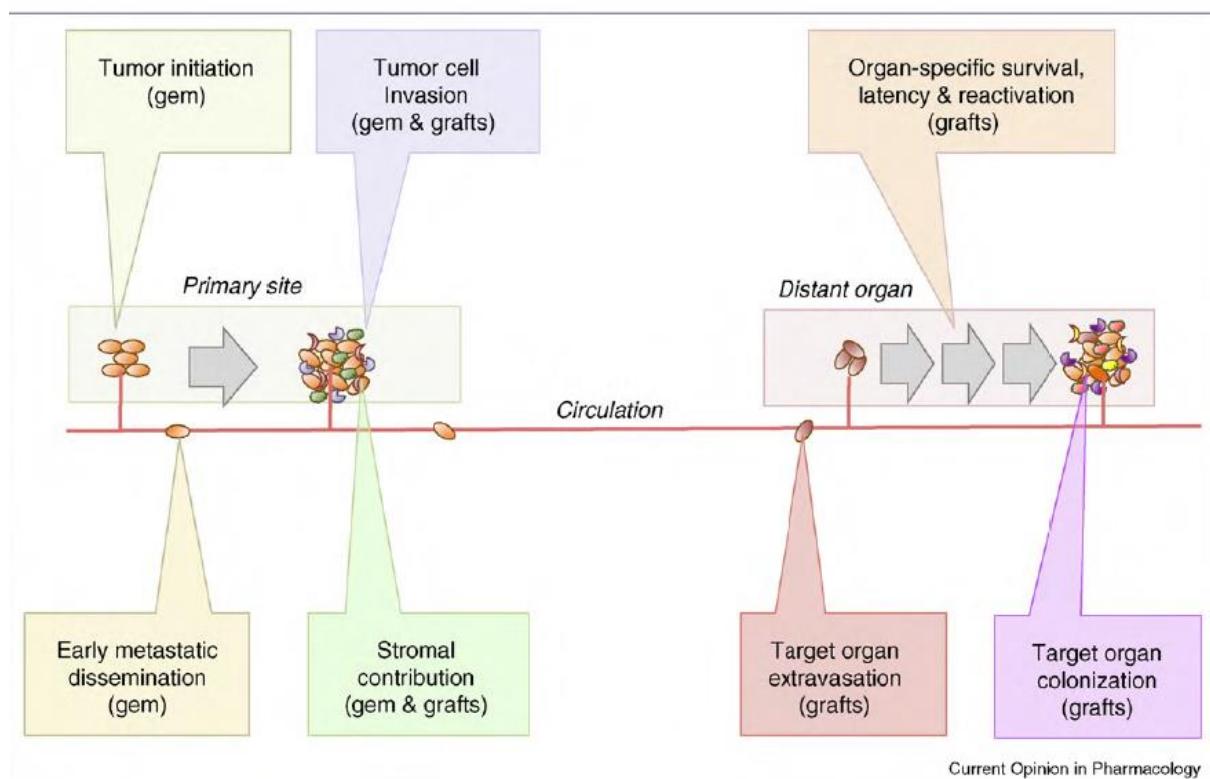


Figura 3. Bos PD et al. 2010

GEM: Genetically engineered mouse models

grafts: xenograft or allograft transplantation.

3.1. Modelos animales de ACDP inducidos químicamente

Una de las primeras estrategias utilizadas para generar modelos animales de ACDP fue la exposición a químicos carcinogénicos. El carcinógeno ADN alquilante azaserina y la implantación quirúrgica de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) se ha utilizado para inducir carcinogénesis pancreática y metástasis en ratas. En estos casos las células tumorales no presentan la mutación oncogénica de KRAS, por lo que no representan de manera adecuada al ACDP humano, teniendo poca capacidad traslacional. Los agentes alquilantes de ADN N-nitroso-bis (2-oxipropil) amina (BOP) y N-nitrosobis-(2-hidroxipropil) amina (BHP) en hámsteres promueven la metilación de la guanina llevando a la mutación de nucleótidos e induciendo la mutación del gen KRAS, por lo que morfológicamente presentan mayor semejanza con el cáncer pancreático humano.

3.2. Modelos de ACDP genéticamente modificados (GEMM)

Los modelos de ratones genéticamente modificados (GEMM) se crean a partir de la introducción de mutaciones genéticas específicas en oncogenes y genes supresores de tumores característicos del ACDP humano, activándolos (knock-in) o bien inactivándolos (knock-out). Son útiles para estudiar los mecanismos de carcinogénesis temprana pero el inconveniente es que son poco metastásicos.⁵⁴ Los modelos GEMM simulan la carcinogénesis pancreática a través de lesiones precursoras malignas como PanIN o NMPI, incorporando aberraciones genéticas conductoras tempranas (KRAS) o tardías (TP53). Otros tipos de modelos GEMM son los modificados con promotores P48/Ptf1a o Pdx1 que controlan la expresión de oncogenes mutados o genes supresores de tumores en el páncreas. Estos, representan de manera más adecuada rasgos clínicos del ACDP humano.⁵⁵ Sin embargo, debido a la baja frecuencia de carcinogénesis pancreática en estos ratones, se cree que son necesarias mutaciones adicionales como la del oncogén KRAS para una transformación maligna completa.⁵⁵

En este sentido, los GEMM han evolucionado a fenotipos con mayor malignidad como los modificados con el genotipo Kras (G12D); trp53 (R172H); Pdx-1Cre (modelo KPC) descrito por *Tuveson*, que incorpora mutaciones del oncogén KRAS y del gen supresor de tumores tp53, conducidos por una Cre recombinasa específica del páncreas y el transgén Pdx1-Cre, se ha considerado uno de los modelos murinos más avanzados, presentando rasgos de ACDP humano muy similares a la clínica, como el estroma tumoral y respuesta a terapia muy similar.⁵⁶⁻⁵⁹

Otra ventaja es que contienen el sistema inmune intacto, permitiendo el estudio de la vigilancia inmunológica y la evaluación de tratamientos inmunoterápicos.⁵⁶⁻⁵⁹

A pesar de esta ventaja, los modelos GEMM contienen una baja celularidad neoplásica lo que dificulta aislar y caracterizar las células malignas. Esto consume más tiempo para su generación y encarece la experimentación.⁶⁰

3.3. Modelos xenógrafos de ACDP

Para el desarrollo de estos modelos se utilizan ratones inmunodeprimidos, ya que se generan mediante la implantación de células tumorales humanas o tejido tumoral humano. La cepa de ratón más utilizada es la de ratones desnudos atípicos, (carentes de células T) o los NOD- SCID, con inmunodeficiencia combinada severa (*Severe Combined Inmunodeficiency [SCID]*) y que son carentes de linfocitos T y B.⁶¹

Se pueden generar mediante implantación subcutánea quirúrgica de fragmentos de tejido tumoral o células tumorales establecidas en ratones inmunodeprimidos, y habitualmente se emplea matriz celular (matrigel) para aumentar la tasa de injerto de las células tumorales y obtener mayor éxito de crecimiento tumoral, incrementando la eficiencia.^{61,62} Estos modelos xenógrafos subcutáneos generalmente no metastatizan y, además, no replican con exactitud el crecimiento neoplásico intrapancreático.^{61,63} Estas limitaciones pueden ser solventadas por los modelos ortotópicos de implantación intrapancreática que replican el crecimiento intrapancreático y además metastatizan, pudiéndose estudiar la fisiopatología de la metástasis mediante la ayuda de técnicas de imagen como la bioluminiscencia, fluorescencia o técnicas de imagen avanzadas como la ultrasonografía, TC o RMN.^{61,63}

Estos modelos xenógrafos ortotópicos se pueden generar mediante la inyección intrapancreática de células tumorales aisladas o mediante la implantación quirúrgica de fragmentos tumorales en el páncreas. Éste último procedimiento, de implantación de tejido, aumenta la tasa de injerto, limita las variaciones en el tamaño del tumor primario y reduce el riesgo de fuga intraperitoneal.⁶⁴

3.4. Xenógrafos derivados de pacientes (PDX)

Los xenógrafos generados a partir de líneas tumorales comerciales suelen presentar alteraciones genéticas y epigenéticas y no representan la heterogeneidad tumoral. Estos

modelos sólo representan el contenido celular neoplásico tumoral (de 10%) sin tener en cuenta los efectos de estroma o de las células inmunes infiltrantes.^{65, 66} Para paliar estas deficiencias, se desarrollaron los xenógrafos derivados de muestras de pacientes (*Patient Derived Xenografts [PDX]*) mediante la implantación subcutánea o ortotópica, en ratones inmunodeprimidos, de tejido tumoral resecado procedente del paciente. Estos modelos presentan una latencia variable de semanas a meses, y el índice de implantación tumoral varía de 10 a 100%. Estos xenógrafos tienen la capacidad de mantener la fidelidad genómica, los rasgos histopatológicos, el potencial metastásico, en el caso de los ortotópicos, y la respuesta a intervenciones terapéuticas.⁶⁷⁻⁷¹

3.5. Modelos xenógrafos humanizados

Una de las mayores deficiencias de los modelos PDX es la necesidad de utilizar ratones inmunodeprimidos, lo que limita su uso para la evaluación del efecto del sistema inmune y la evaluación de tratamientos inmunoterápicos. Actualmente, se están desarrollando diferentes modelos xenógrafos humanizados que reproducen la respuesta inmune innata y en los que se pueden estudiar clínicamente las interacciones entre células tumorales e inmunológicas. Algunos ejemplos son los creados a partir de la implantación de células madre CD34+ del cordón umbilical a nivel intrahepático y el trasplante de sangre periférica humana con células mononucleares en ratones atípicos.⁷²⁻⁷⁴

4. TRATAMIENTO EN EL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

4.1. Enfermedad resecable borderline y enfermedad localmente avanzada en ACDP

El ACDP se divide en tres categorías de acuerdo a su extensión local: resecable, resecable borderline y localmente avanzado. Estas definiciones no son uniformes en todos los estudios debido a las diferentes técnicas quirúrgicas utilizadas y a que algunos autores proponen su redefinición con la inclusión de conceptos moleculares y factores dependientes del paciente.^{75, 76} La clasificación del ACDP en una de estas categorías tiene implicaciones de vital importancia en su tratamiento quirúrgico, sistémico y en la supervivencia y pronóstico. Aunque existen controversias en estas definiciones, la

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) en la Guía del ACDP de 2019⁷⁷ establece las siguientes:

4.1.1. ACDP resecable

Sin contacto tumoral arterial (tronco celíaco, arteria mesentérica superior, arteria hepática común), sin contacto con la vena mesentérica superior o la vena porta, o contacto ≤180°, sin irregularidad en el contorno de la vena.

4.1.2. ACDP resecable borderline

❖ Cabeza pancreática/proceso uncinado:

- Contacto tumoral sólido con la arteria hepática común, sin extensión hacia el tronco celíaco, o bifurcación de la arteria hepática permitiendo una resección y reconstrucción completa y segura.
- Contacto tumoral sólido de la arteria mesentérica superior ≤180°.
- Contacto tumoral sólido con una variante anatómica arterial (por ejemplo arteria hepática derecha accesoria, arteria hepática derecha reemplazada, arteria hepática común reemplazada, y el origen de la arteria reemplazada o accesoria) y la presencia y grado de contacto tumoral debe ser anotado si está presente, ya que puede afectar al planteamiento quirúrgico.
- Contacto tumoral sólido con la vena mesentérica superior o la vena porta de >180°, contacto ≤180° con irregularidad del contorno de la vena o trombosis de la vena, pero con vaso proximal y distal adecuado permitiendo resección completa y segura y reconstrucción venosa.
- Contacto tumoral sólido con la vena cava inferior.

❖ Cuerpo/ cola pancreática:

- Contacto tumoral sólido con el tronco celíaco de ≤ 180°.
- Contacto tumoral sólido con el tronco celíaco > 180° sin afectación de la aorta y con arteria gastroduodenal intacta y no involucrada.

4.1.3. ACDP localmente avanzado

❖ Cabeza/proceso uncinado:

- Contacto tumoral sólido con la arteria mesentérica superior >180°.
- Contacto tumoral sólido con el tronco celíaco >180°.

❖ Cuerpo/ cola pancreática:

- Contacto tumoral sólido de >180°C con la arteria mesentérica superior o tronco celíaco.
- Contacto tumoral sólido con el tronco celíaco y afectación aórtica.
- Vena mesentérica superior o vena porta no reconstruible debido a afectación tumoral u oclusión (debido a tumor o trombo).

4.2. Tratamiento sistémico

La terapia sistémica se utiliza en todos los estadios de ACDP y se clasifica en terapia neoadyuvante (en ACDP resecable o borderline resecable), terapia adyuvante y primera línea de tratamiento, o terapia posterior para pacientes con ACDP localmente avanzado, metastásico y recurrente.

Existen múltiples estudios que demuestran el beneficio en la supervivencia tras tratamiento quimioterápico, por lo que la administración de tratamiento neoadyuvante o adyuvante tras la intervención quirúrgica es crucial en el abordaje del ACDP.⁷⁸

El papel de la neoadyuvancia es importante en el ACDP dado que sólo el 20% de los casos son resecables al diagnóstico. La resección quirúrgica para ACDP localmente avanzado siguiendo a neoadyuvancia continúa en discusión. La decisión debe establecerse en un comité multidisciplinar y considerando hallazgos radiológicos (reasegurando hallazgos como enfermedad estable y respuesta parcial) así como niveles de Ca 19.9.⁷⁹

Los regímenes preferidos en el ámbito de la neoadyuvancia/adyuvancia en el ACDP y la primera línea de tratamiento para el ACDP localmente avanzado y metastásico es el FOLFIRINOX o FOLFIRINOX modificado, o Gemcitabina y Nab-Paclitaxel.⁷⁷

4.2.1. Tratamiento neoadyuvante

La aplicación del tratamiento neoadyuvante en el ACDP supuso hasta hace unos años una limitación debido a la baja respuesta a tratamientos quimioterápicos, lo que implicó una baja aceptación en ensayos clínicos aleatorizados, aunque actualmente ha sido mitigado gracias a la mejora en los regímenes de quimioterapia. Otra limitación es la baja predictibilidad de los hallazgos por imagen de resecabilidad y respuesta patológica tumoral tras tratamiento neoayuvante.⁸⁰

El objetivo de la neoadyuvancia en el ACDP borderline resecable y en el localmente avanzado es más que reducir el tamaño tumoral y facilitar la resección quirúrgica, seleccionar a aquellos candidatos que no han tenido progresión tumoral, lo que indicaría que presentan una enfermedad biológicamente menos agresiva. Un marcador de efectividad tras el tratamiento neoadyuvante es la valoración del porcentaje de pacientes que son candidatos a cirugía. Muchos estudios han mostrado resultados favorables tras resección quirúrgica después de neoadyuvancia, a pesar de que la imagen postneoadyuvancia sugiriese enfermedad irresecable persistente.^{81, 82} Algunos centros especializados han incluso descrito aumento de supervivencia a largo plazo en pacientes en los que se realizó una pancreatectomía con resección arterial concomitante y reconstrucción vascular.^{83, 84}

Los resultados favorables en estos estudios se deben al control de potenciales micrometástasis y a la selección de pacientes que pueden beneficiarse de una resección quirúrgica radical tras tratamiento neoadyuvante.⁸⁵

4.2.1.1. Terapia neoadyuvante para enfermedad resecable

El tratamiento estándar para el ACDP resecable según la guía de 2019 de la NCCN es la cirugía seguida de tratamiento adyuvante. Este concepto se basa en los hallazgos de múltiples ensayos clínicos como CONKO-001, ESPAC-4, y estudios PRODIGE-24, que han demostrado que la terapia sistémica adyuvante incrementa la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia a largo plazo. Desafortunadamente existe un porcentaje de pacientes significativo que se somete a cirugía y no recupera el estatus funcional de manera adecuada para recibir adyuvancia.⁸⁶⁻⁸⁹

Los beneficios de un tratamiento neoadyuvante en el ACDP borderline resecable y/o localmente avanzado plantean que la administración de quimioterapia antes de la intervención quirúrgica puede conferir beneficios similares para los pacientes afectos de un ACDP inicialmente resecable. Los argumentos a favor de quimioterapia neoadyuvante en el ACDP resecable son varios. En primer lugar podría permitir el tratamiento temprano de la enfermedad micrometastásica. En segundo lugar permitiría que más pacientes recibiesen un ciclo completo de quimioterapia antes del estrés fisiológico producido por la cirugía. Finalmente, al igual que en el caso del ACDP borderline resecable y localmente avanzado, puede permitir una selección quirúrgica de los pacientes más adecuada, ya que en el caso de una enfermedad biológicamente agresiva ésta puede progresar durante la quimioterapia, y el paciente podría no beneficiarse de un procedimiento

invasivo como es una intervención quirúrgica. Algunos estudios defienden que el tratamiento neoadyuvante previo a la intervención quirúrgica puede ser más efectivo que en el postoperatorio porque el lecho del tumor resecado se asocia con peor entrega tumoral y baja sensibilidad a la RT.⁸⁹

Existen argumentos contra la terapia neoadyuvante para la enfermedad resecable. En primer lugar, esta estrategia retrasa la intervención quirúrgica, sobre todo cuando los pacientes experimentan complicaciones significativas como la presencia de una ictericia obstructiva provocada por la compresión tumoral de la vía biliar principal, permitiendo de manera potencial la progresión tumoral hasta la irresecabilidad. En segundo lugar y a diferencia de la cirugía, el inicio de quimioterapia requiere un diagnóstico certero anatopatológico de ACDP mediante una biopsia positiva. Esto puede ser difícil de obtener debido a la localización anatómica del tumor y por su estructura con un gran contenido estromal y poca celularidad, y consecuentemente puede posponer el tratamiento.^{90, 91}

Existen múltiples ensayos clínicos prospectivos que evalúan diferentes regímenes de tratamiento neoadyuvante en la enfermedad resecable (por ejemplo *Tienhoven et al.* en la fase III de PREOPANC-1). Si bien en la actualidad existe una clara tendencia a indicar una quimioterapia neoadyuvante en estos tumores pancreáticos resecables, en el futuro sus resultados deberán ser discutidos para valorar si esto ofrece beneficios significativos.⁹²

4.2.1.2. Tratamiento neoadyuvante en ACDP borderline resecable

De acuerdo con las guías de la NCCN de 2019, la terapia neoadyuvante es la estrategia aceptada actualmente para el ACPD borderline resecable: permite evaluar la respuesta biológica tumoral preoperatoria, permite el tratamiento quimioterápico que puede no ser tolerado tras la intervención y puede contribuir a la infraestadificación tumoral.⁷⁵⁻⁷⁷

Los conocimientos sobre el tratamiento neoadyuvante provienen de estudios heterogéneos y sobre la administración en ACDP metastásico, por lo que existe una evidencia limitada para recomendar tratamientos neoadyuvantes al margen de un ensayo clínico. Existen diferentes tipos de tratamientos aceptados como preferidos o alternativos, por lo que es altamente recomendable su administración en un centro de referencia con un gran volumen de casos y la participación dentro de un ensayo clínico.⁷⁸

Tras terapias neoadyuvantes efectivas la posibilidad de realizar una resección quirúrgica R0 es alta en pacientes con ACDP borderline resecable. En estos pacientes la supervivencia es mayor que en aquellos en los que tan solo se puede realizar una cirugía sin criterios de radicalidad oncológica (R1-2).⁷⁸

Los tratamientos actuales de elección son FOLFIRINOX o FOLFIRINOX modificado (que se debe limitar a pacientes con ECOG-01) asociado o no a quimiorradioterapia (QT-RT) adyuvante tras la cirugía, o tratamiento con Gemcitabina y Nab-Paclitaxel asociado o no a QT-RT posterior. En aquellos pacientes que presentan mutación en BRCA 1 / 2 o PALB2 se recomienda FOLFIRINOX o FOLFIRINOX modificado asociado o no a QT-RT, o tratamiento con Gemcitabina y Cisplatino (\geq 2-6 ciclos) asociado o no a QT-RT posterior.^{77, 93, 94}

4.2.1.3. Tratamiento neoadyuvante en ACDP localmente avanzado

En el ACDP localmente avanzado todavía está por demostrar que la neoadyuvancia asociada a la cirugía conlleve un beneficio en la supervivencia.⁷⁵ La guía de la NCCN de 2019 recoge el tratamiento quirúrgico como posible terapia de segunda línea en pacientes con buen PS y sin progresión tumoral tras tratamiento sistémico de primera línea con quimioterapia sola o asociada a QT-RT.⁷⁷

Durante estos últimos años se han desarrollado ensayos clínicos aleatorizados para mejorar la terapia sistémica en casos de ACDP localmente avanzado. Algunos de estos estudios defienden la realización de resecciones vasculares, especialmente del eje vascular porto-mesentérico asociadas a una terapia multimodal para conseguir una mejoría de la supervivencia. A pesar de ello, en la actualidad todavía es necesaria la realización de ensayos clínicos aleatorizados para establecer las bases quirúrgicas del ACDP localmente avanzado.⁹⁵⁻⁹⁸

4.2.2. Tratamiento adyuvante

La recomendación de tratamiento adyuvante tras la resección quirúrgica de un ACDP está dirigida a aquellos pacientes que no han recibido previamente tratamiento neoadyuvante. Para aquellos que han recibido tratamiento neoadyuvante, la adyuvancia va a depender del tratamiento previo administrado, de la radicalidad quirúrgica y de las condiciones clínicas del paciente.⁷⁷

Distintos ensayos clínicos han estudiado la combinación de tratamientos con 5-Fluorouracilo (5-FU) y leucovorina versus Gemcitabina y el tratamiento con Gemcitabina en monoterapia o combinado, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas.

86-88

En la actualidad, los regímenes recomendados son FOLFIRINOX modificado (limitado a ECOG 01) o Gemcitabina en combinación con Capecitabina.^{77, 86-88}

Otros tratamientos alternativos recomendados son los siguientes:

- Gemcitabina en monoterapia
- 5- FU y leucovorina
- Infusión continua de 5- FU
- Capecitabina en monoterapia
- Quimioterapia de inducción (Gemcitabina, 5-FU y leucovorina o infusión continua de 5-FU), seguido de QT-RT, seguido o no del mismo tratamiento de quimioterapia posterior (Gemcitabina, 5-FU y leucovorina o infusión de 5-FU).^{77, 86-88}

4.2.3. Tratamiento sistémico en ACDP localmente avanzado

Como terapia de primera línea, si el paciente tiene un buen PS se recomienda FOLFIRINOX o FOLFIRINOX modificado (para ECOG 0-1) o Gemcitabina y Nab-Paclitaxel (para ECOG 0-2). En pacientes con mutaciones BRCA 1/ 2 o PALB2: FOLFIRINOX o FOLFIRINOX modificado, o Gemcitabina asociada a Cisplatino. Como terapias alternativas se recomiendan la administración de Gemcitabina en monoterapia o combinada con Capecitabina y Erlotinib, Capecitabina en monoterapia, 5-FU en monoterapia; Gemcitabina, Docetaxel y Capecitabina, Fluoropirimidina (5-FU o Capecitabina) y Oxaliplatinio.^{77, 99, 100}

En algunos casos seleccionados sin enfermedad metastásica se pueden utilizar combinaciones con QT-RT o quimioterapia con RT estereotáxica corporal (*Sterotactic Body Radiotherapy [SBRT]*).⁷⁷

Como terapia de primera línea, si presenta pobre PS se recomienda Gemcitabina, Capecitabina o 5-FU en monoterapia. Como terapia de segunda línea existen diferentes opciones según el PS: terapias de 5-FU y leucovorina con Irinotecan liposomal, FOLFIRI; FOLFIRINOX, FOLFOX, Capecitabina con o sin Oxaliplatinio, 5-FU, Gemcitabina (con diferentes combinaciones como albúmina ligada a Paclitaxel, Cisplatino, Erlotinib), y

diferentes anticuerpos monoclonales e inmunomoduladores como Pembrolizumab, Entrectinib y Larotrectinib, y quimiorradiación.^{77, 99, 100}

4.2.4. Tratamiento sistémico en ACDP metastásico

Como primera línea para enfermedad metastásica el tratamiento sistémico sería el mismo que para enfermedad localmente avanzada salvo por los tratamientos con RT, que no se recomiendan a no ser que se indiquen con propósito paliativo.

En caso de pacientes con buen PS, los tratamientos aprobados para el mantenimiento de enfermedad metastásica serían FOLFIRI si previamente se administró FOLFIRINOX, siendo otros recomendados FOLFOX y Capecitabina en forma de ensayos clínicos si previamente se administró tratamiento con FOLFIRINOX. Para mutaciones de BRCA 1/ 2 puede administrarse Olaparib.^{77, 101-103}

4.2.5. Papel de la radioterapia en el ACDP

Los tratamientos recomendados por la guía NCCN de 2019 han sido principalmente Capecitabina, infusión continua de 5FU o Gemcitabina con RT. Si bien los estudios sugieren que la RT en el ámbito de la neoadyuvancia puede mejorar la probabilidad de márgenes negativos en la resección quirúrgica, estos datos aún son limitados en la actualidad. Deben realizarse más ensayos clínicos que puedan confirmar esta afirmación. Así mismo, se está evaluando en diversos ensayos clínicos el papel de la RT como tratamiento adyuvante. Puede ser recomendada la RT en aquellos pacientes con alto riesgo de recurrencia local (márgenes positivos o nódulos linfáticos afectados).¹⁰⁴

En el ACDP localmente avanzado el objetivo de la RT consiste en prevenir o retrasar la progresión local y sus manifestaciones clínicas de dolor o síntomas obstructivos. Los datos para apoyar la RT en este caso son limitados, y puede utilizarse QT-RT o la SBRT. Se puede administrar la misma pauta en recurrencias de ACDP. En casos paliativos metastásicos o no metastásicos el objetivo de la RT es disminuir el dolor y el sangrado y mejorar los síntomas obstructivos.¹⁰⁵

La utilización de la RT concomitante a la quimioterapia o posterior a la misma es controvertida, y todavía no se han evidenciado diferencias significativas en la resecabilidad y supervivencia.¹⁰⁵ Debido a la falta de evidencia en ensayos clínicos aleatorizados, la RT neoadyuvante está todavía en debate, aunque en casos

seleccionados y dentro de ensayos clínicos se están utilizando técnicas para minimizar la dosis de RT en tejidos radiosensibles mediante el uso de SBRT y RT de intensidad modulada (*Intensity-modulated radiotherapy [IMRT]*).^{75, 92, 106}

4.2.6. Inmunoterapia y terapias dirigidas

Existen datos limitados para apoyar el uso fármacos inmunoterápicos en el ACDP. Comprender el perfil genómico del ACDP puede permitir la identificación de pacientes con alteraciones específicas y administrar terapias dirigidas en un futuro. Actualmente se ha encontrado que las mutaciones en BRCA1/2 y las deficiencias en los genes de reparación del ADN, MMR, son susceptibles a algunos tratamientos inmunoterápicos, aunque tienen baja incidencia en el ACDP (7% y 1% respectivamente). Así, Pembrolizumab se ha aprobado como segunda línea de tratamiento para aquellos pacientes con deficiencia en MMR, por lo que se recomienda testar a los pacientes para saber si presentan estas mutaciones.⁷⁸

Actualmente se están investigando combinación de terapias que ayudan a reprogramar el microambiente de inmunosupresión tumoral, por lo que la inmunoterapia podría tener un papel en el tratamiento del ACDP y en la neoadyuvancia en un futuro.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

4.3. Tratamiento quirúrgico

El objetivo del tratamiento quirúrgico en el ACDP es la realización de una resección oncológica del tumor primario y los nódulos linfáticos regionales con márgenes libres (resección R0). Durante la cirugía se debe descartar la presencia de nódulos linfáticos metastásicos distantes, peritoneales y en el hígado. La resección quirúrgica se fundamenta en la relación del tumor con las estructuras vasculares afines al páncreas y su contacto/invasión con el tumor. De forma intraoperatoria se deben analizar los márgenes de resección pancreática a fin de descartar invasión tumoral de los mismos y conseguir una resección oncológica R0 del cuello pancreático y vía biliar.^{77, 110}

Para tumores situados en la cabeza y proceso uncinado la técnica quirúrgica consiste en una DPC y para tumores en el cuerpo y cola de páncreas la resección consiste en una pancreatectomía distal asociada a una esplenectomía.^{77, 110}

En ocasiones, alcanzar un margen de resección negativo de tumor puede exigir la necesidad de una resección y reconstrucción vascular, generalmente venosa, así como la

necesidad de una resección de órganos extrapancreáticos invadidos por el propio tumor, como pueden ser el duodeno, el colon u otro órgano. En cuanto a la infiltración tumoral de estructuras vasculares arteriales, se necesitan más datos sobre la supervivencia en ACDP tras resección arterial, pero en poblaciones seleccionadas, en manos quirúrgicas experimentadas pueden incluirse resecciones arteriales, idealmente tras una terapia multimodal y en el contexto de un ensayo clínico.¹¹¹

La diferencia entre una infiltración tumoral de la pared venosa versus una desmoplasia reactiva relacionada con el tumor puede ser imposible de discernir, por lo que en esta situación se recomienda un abordaje agresivo con una escisión parcial o completa de la vena, generalmente la vena porta, si se sospecha infiltración tumoral de la misma.^{77,110,112} Finalmente comentar que la propia biología tumoral del ACDP puede no permitir realizar una resección R0, incluso en las cirugías más meticulosas.

5. NANOMEDICINA

El nacimiento de la nanobiotecnología ha permitido la producción de diferentes nanomateriales (materiales con al menos alguna dimensión menor a 100 nm) con aplicaciones diversas. En el caso de la terapia oncológica, la administración de quimioterapia sistémica requiere una alta dosificación debido a la pérdida significativa de efectividad hasta alcanzar las células tumorales. Ésta da lugar a una cantidad importante de efectos adversos. La nanobiotecnología, sin embargo, ha permitido vencer esta limitación mediante el desarrollo de nanovehículos activos (mediante unión ligando-receptor) y pasivos (mediante el efecto de permeabilidad y retención [EPR]) de distintas naturalezas.¹¹³ Incluyen (figuras 4 y 5):

- Nanotransportadores lípidicos como liposomas, nanopartículas sólido-lípido, portadores de lípidos nanoestructurados, preconcentrados de micro/nanoemulsiones [drogas conjugadas en lípidos].
- Nanotransportadores poliméricos como nanopartículas poliméricas (nanoesferas, nanocápsulas), micelas poliméricas, dendrímeros (transporte de drogas conjugadas o encapsuladas) [drogas conjugadas en polímeros].
- Nanotransportadores inorgánicos: metálico/no metálico y de manera opcional cubierta acorazada, ligando, droga o prueba diagnóstica.^{114, 115}

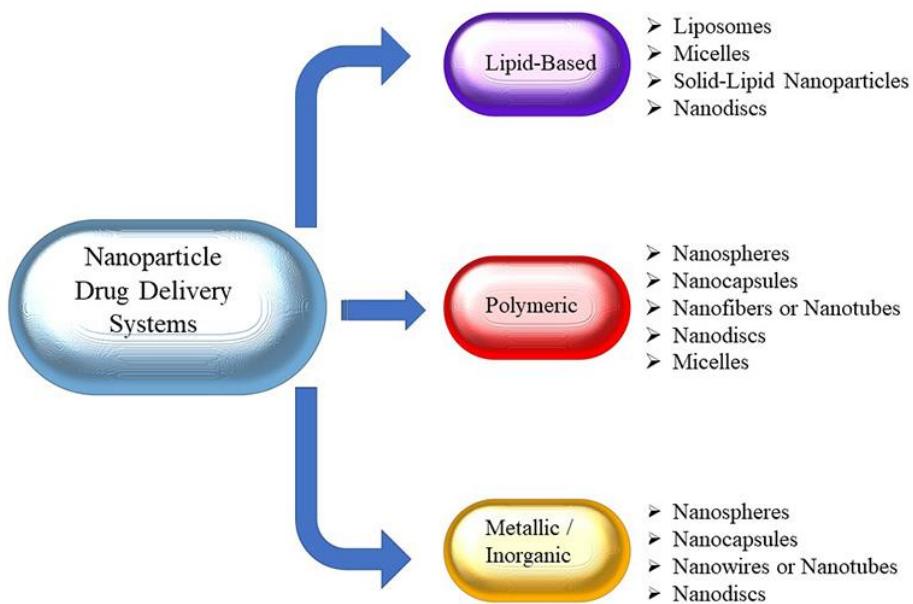
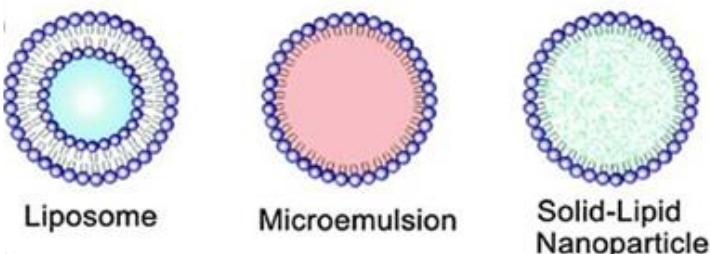


Fig 4. Volpedo G et al. 2019

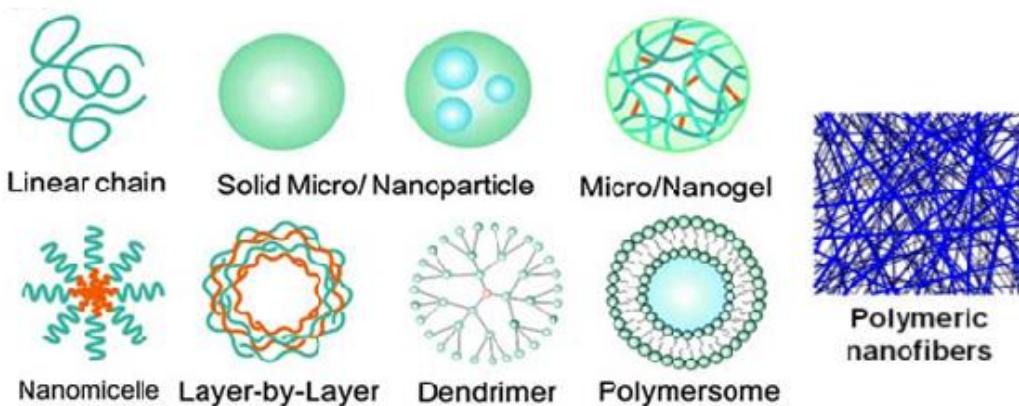
La nanotecnología ha permitido, además, crear sistemas inteligentes de liberación de drogas, de manera continua y prolongada, dirigidos específicamente a la población de células tumorales.¹¹⁵

De entre todos los nanomateriales, destacaremos las nanopartículas y nanofibras por ser el tipo de nanomedicinas que hemos evaluado con nuestros modelos preclínicos.

A) NANOTRANSPORTADORES BASADOS EN LÍPIDOS



B) NANOTRANSPORTADORES POLIMÉRICOS



C) NANOTRANSPORTADORES INORGÁNICOS

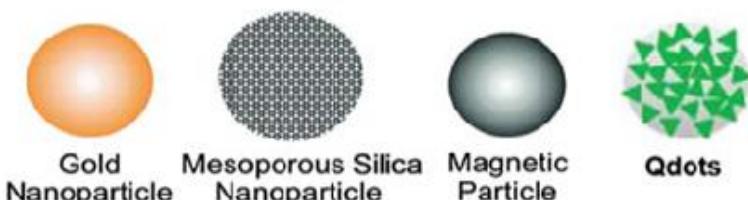


Fig 5. Adaptación de Mo R et al. 2014

5.1. Nanopartículas

Las nanopartículas son de 100 a 10000 veces más pequeñas que las células humanas y pueden interactuar con moléculas intra y extracelulares. Pueden tener estructuras y naturalezas variadas pero las más abundantes son las de estructura proteica o lipídica. Estas nanopartículas pueden unirse a distintos fármacos o agentes citotóxicos, confiriéndoles nuevas propiedades como puede ser el aumento de la permeabilidad, la solubilidad y el direccionamiento hacia células diana (figura 6). Además, permite el

aumento de la concentración del fármaco, disminuyendo la toxicidad sistémica, y por tanto incrementando la eficiencia terapéutica.¹¹⁵

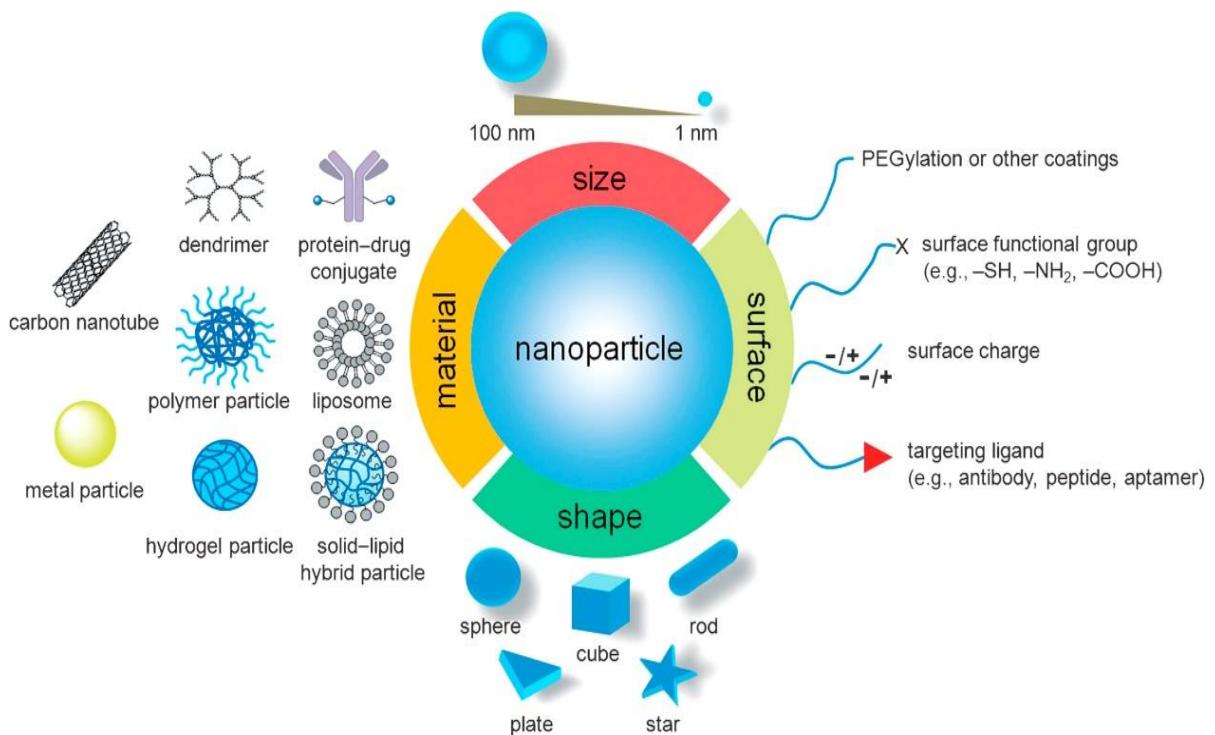


Fig 6. Heinz H. et al. 2017.

Las nanopartículas pueden dirigirse a las células de manera activa o pasiva:

-Direccionamiento pasivo: el menor tamaño de éstas permite que se extravasen más fácilmente a los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales, que presentan una alta permeabilidad en comparación con aquellos tejidos sanos, por lo que las nanopartículas se acumulan en los capilares de los tejidos tumorales. Este efecto es conocido como EPR. Su tamaño nanométrico permite evitar la filtración renal y evadir la fagocitosis de las células de Kupffer. Sin embargo, la mayor parte se acumula en el hígado o sistema retículo-endotelial y sólo el 2-10% de la dosis administrada llega al tumor, por lo que su toxicidad sistémica continúa limitando su dosificación.

La mayoría de nanopartículas en el mercado oncológico usan el direccionamiento pasivo (por ejemplo conjugados polímero-fármaco, Doxorubicina liposomal o Paclitaxel unido a albúmina).¹¹⁶

-Direccionamiento activo: se consigue mediante la combinación de marcadores de reconocimiento específicos ligando-receptor (anticuerpos, receptores de superficie celular, moléculas de glúcidos, etc.). La evidencia sugiere que esta direccionalidad activa de las nanopartículas es eficiente en tumores pobremente vascularizados, mientras el direccionamiento pasivo produce mejores resultados en tumores muy vascularizados.¹¹⁵

Principalmente, su toxicidad se debe a la composición, el tamaño o la carga. Su superficie química no fisiológica puede causar un direccionamiento celular no específico y precipitación, originando daño celular. Debido a la larga diversidad de los materiales utilizados en la generación de las nanopartículas, hay un número infinito de combinaciones, de las cuales algunas pueden ser negativas y se deben tener en cuenta a la hora de formular estos nanomateriales.¹¹⁷

De entre todas las nanopartículas, las de naturaleza proteica presentan una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y plasticidad y a diferencia de los vectores de origen viral inicialmente utilizados como vectores terapéuticos, no inducen mutagénesis insercional. Estas nanopartículas tienen una ventaja y es que disminuyen la disponibilidad de fármaco en células normales reduciendo los efectos adversos, lo que las hace muy seguras y eficaces.¹¹⁸

5.1.1. Nanopartículas utilizadas para el tratamiento de ACDP

En la última década el interés por la nanomedicina ha permitido el estudio de la acción de diferentes nanomateriales en modelos de ACDP. El direccionamiento pasivo producido por el EPR no es relevante en el ACDP debido al colapso de la vascularización tumoral producido por el denso estroma desmoplásico, pero se ha propuesto el direccionamiento activo hacia las células madre cancerosas, las células tumorales circulantes, a exosomas tumorales y sobre la remodelación de la transición epitelio- mesenquimal.¹¹⁹

Existen un número importante de estudios que recogen diferentes nanomateriales combinados con el tratamiento quimioterápico estándar en ACDP, cuya descripción excede el objetivo de esta tesis, por lo que se mencionarán los más significativos.

5.1.1.1. Nanopartículas con Gemcitabina

La primera línea de tratamiento quimioterápico para el ACDP es la Gemcitabina (2',2'difluoro-2'deoxicitidina; dFdC), un antimetabolito que presenta una vida media corta en plasma debido a la acción de la enzima citidina deaminasa. Para ser más efectiva requiere dosis altas por lo que presenta toxicidad que es dependiente de dosis. Además, su naturaleza hidrofílica le confiere resistencia a tratamiento ya que no puede atravesar las membranas de manera pasiva, sino a través de transportadores de nucleósidos. Para lograr la protección y liberación controlada de Gemcitabina se han desarrollado macromoléculas y nanovehículos que han mejorado su biodisponibilidad, aumentando la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos adversos. Se han probado en experimentación micelas, cargadas de Gemcitabina, Gemcitabina conjugada con metales, nanogeles, liposomas, nanopartículas de albúmina, y partículas con direccionamiento activo ligando-receptor.¹²⁰

5.1.1.2. Nanopartículas liposomales con Cisplatino (lipoplatino)

La eficacia de la nanopartícula de Cisplatino liposomal (lipoplatino) fue investigada por Stathopoulos *et al.* evidenciando una estabilidad de la enfermedad (<50% de reducción y <25% de incremento de tamaño de las lesiones por lo menos durante 8 semanas) en 14 de 24 pacientes con una supervivencia media de 4 meses.¹²¹

5.1.1.3. Nanopartículas de oro

Libutti *et al.* llevó a cabo un ensayo clínico en 30 pacientes con adenocarcinoma de páncreas localmente avanzado utilizando CYT-6091, una nanodroga construida mediante la unión simultánea del rhTNF- α y polietilenglicol tiolado a la superficie de una nanopartícula de oro coloidal, evidenciándose una reducción tumoral y un perfil de seguridad adecuado con reducción de la toxicidad sistémica.¹²²

5.1.1.4. Nanopartículas con Paclitaxel

La nanoconjugación de albúmina y Paclitaxel (comercialmente conocida como Abraxane) es la única nanopartícula aprobada de momento para el tratamiento del ACDP metastásico.⁷⁷

En un ensayo clínico aleatorizado en fase III llevado a cabo por Von Hoff *et al.* fueron comparados pacientes que habían recibido tratamiento con Nab-Paclitaxel más Gemcitabina (Nab-P+Gem) o Gemcitabina sola, evidenciando un aumento significativo en la supervivencia media global, y concluyendo que la combinación de Gemcitabina con

Nab-Paclitaxel aumenta el efecto del Paclitaxel, actuando de manera sinérgica con la Gemcitabina y reduciendo significativamente su toxicidad.¹²³⁻¹²⁵

A pesar de este buen resultado, no existen parámetros clínicos claros que puedan identificar los pacientes adecuados para el tratamiento. La Agencia Europea del Medicamento recomienda precaución cuando se considere utilizar la combinación Nab-P+Gem para tratar pacientes con 75 años o más debido a la falta de evidencia de eficacia clínica a largo plazo y a los posibles efectos adversos.¹²³⁻¹²⁵

Por otra parte, una revisión sistemática publicada por *Pusceddu et al.* concluye que la elección entre FOLFIRINOX y Nab-P+Gem como tratamiento de primera línea en el ACDP se basa en diferentes factores como la edad, el estatus funcional, la administración previa de terapias adyuvantes, la toxicidad y el coste del tratamiento, ya que no se mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia global, índice de mortalidad y la progresión de la enfermedad.¹²⁶

En este contexto, el Dr. Mangues y la Dra. Céspedes, en colaboración con el Dr. Villaverde, publicaron recientemente en EMBO Molecular Medicine la generación de un nanoconjunto con efecto antitumoral dirigido a la eliminación de células tumorales metastásicas colorrectales CXCR4+. Este nanoconjunto (T22-GFP-H6-FdU) formado por la conjugación de 5-FU a la nanopartícula T22-GFP-H6 es capaz de entregar selectivamente la Flouxuridina (FdU) a células CXCR4+, sobreexpresado en la población de células madre tumorales responsables de la migración celular y la iniciación de metástasis. A diferencia de la FdU libre, la nanopartícula T22-GFP-H6-FdU es capaz de internalizarse de manera selectiva liberar 5-FU y provocar daño en el ADN y apoptosis en la célula tumoral CXCR4+. Comparativamente a la FdU libre, esta nanopartícula también induce una regresión metastásica dependiente de la expresión de CXCR4 en número y tamaño en los focos metastásicos, y sin toxicidad en tejidos normales.¹²⁷

Se incluye una tabla resumen de las nanopartículas investigadas en el tratamiento del ACDP más representativas (tabla 1).^{114, 11}

Tabla 1. Ejemplos de nanopartículas investigadas en el tratamiento del ACDP.

Sistema de liberación de drogas	Estrategia dirigida	Droga
Nanovehículos lipídicos		
Liposoma B-cyclodextrina adaptado	Péptido RGD, Liposoma de respuesta a MMP2	Pirfenidona y Gemcitabina
Liposomas	Ácido hialurónico	Prodroga lipofílica de Gemcitabina [4-(N)-lauroil-Gemcitabina, C12GEM]
Liposomas	Ácido hialurónico	Gemcitabina
NLC (vehículos lipídicos nanoestructurados)	Ácido hialurónico	Prodroga ácido esteárica de Gemcitabina y Conjugado baicalina-ácido hialurónico
Nanovesículas lipídicas	Apolipoproteína A-II	
Nanoconjungado lípido-péptido	Lípido sensible a hipoxia	
Nanovehículos poliméricos		
Nanopartículas de chitosan	Herceptina	Gemcitabina
Nanopartículas de chitosan de núcleo sólido	Direccionamiento al receptor de folato utilizando ácido fólico	Gemcitabina
Micelas Ácido poliláctico-PEG	Folato	Curcumina
Nanopartículas de albúmina	TRAIL	Paclitaxel
Nanopartículas poliméricas (poli(poli(etilen glicol) metacrilato)-poli(caprolactona)-poli(poli(etilen glicol) metacrilato))	Ácido fólico y el aptámero AS1411	Doxorubicina
Nanopartículas de albúmina	Folato	Gemcitabina
Dendrímero	Péptido de direccionamiento tumoral	Paclitaxel y TR3 si ARN

Dendrigraft poli-L-Lisina de tercera generación	Péptido infiltrante de células	Entrega de terapia génica
Dendrímeros PAMAM PEG-cored	Anticuerpo Flt-1 (receptor VEGF)	Gemcitabina
Dendrímero PAMAM	Ácido hialurónico	3, 4-Difluorobenzilideno Curcumina
Nanovehículos inorgánicos		
Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro	Anticuerpo anti-CD47	Gemcitabina
Nanopartículas de ferritina	Direccionamiento del receptor 1 de tranferrina con efecto EPR	Carbachol (activador de la actividad neural) y atropina (depresor de la actividad neural)
Nanocompuestos quantum grafeno-plata con carboximetil inulina	Ácido hialurónico	5-Flurouracilo
Nanoclúster de oro	Péptido U11	Catepsina E
Nanopartículas de oro	Direccionamiento de Plectina-1 y péptido KTLLPTP	Gemcitabina
Conjugados de drogas		
Nanopartículas conjugadas de escualeno	Péptido CKAAN	Prodroga Gemcitabina -escualenoil
Nanovehículos híbridos		
Dendrímero PAMAM dirigido frente ácido retinoico recubierto con nanopartículas magnéticas	Ácido retinoico, nanopartículas magnéticas	Gemcitabina
Nanopartículas de sílice mesoporosas dirigidas recubiertas de doble capa lipídica (silicasomas)	Péptido iRGD penetrante en el ciclo tumoral	Irinotecán

Nanovehículo híbrido dendrítico PEGilado sensible a pH que incluye sílice mesoporoso, óxido de grafeno y magnetita	Ácido fólico	Gemcitabina
Nanopartículas híbridas	Ruptura del trazador inducida por radiación láser	Gemcitabina
Nanopartículas de sílice mesoporosas rod-like nanorevestidas de oro	Nanorevestimiento de oro que permite el efecto fototérmico sobre irradiación infrarroja cercana	Gemcitabina

5.2. Nanofibras

Las nanofibras son materiales de dos dimensiones de nanoescala entre 0-100nm y una tercera dimensión significativamente mayor. Pueden ser producidas a partir de polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros naturales biodegradables como colágeno, gelatina, alginato y chitosan, y los polímeros sintéticos biodegradables como policaprolactona, ácido poliéster poliglicólico, ácido poliláctico y ácido poliláctico-poliglicólico han sido utilizados como fibras electrohilantes para liberación de sustancias. Se caracterizan por presentar una larga superficie altamente específica, una gran cantidad de poros por unidad de masa y un gran rendimiento mecánico.

Las nanofibras permiten inmovilizar enzimas, péptidos antimicrobianos, antibióticos y hormonas de crecimiento. La matriz de las nanofibras proporciona una estructura similar a la matriz extracelular nativa con gran porosidad interconectada (60-90%), gran absorbancia, humedad equilibrada y permeabilidad. Esta habilidad de cargar componentes bioactivos es la que permite, a su vez, la liberación controlada de drogas, previniendo la liberación repentina de éstas y disminuyendo la solubilización de las mismas. De manera experimental se han desarrollado formulaciones implantables que permiten aumentar la liberación de drogas durante periodos incluso de meses.¹²⁸

En el caso concreto del ACDP se ha publicado, a nivel experimental, algún estudio en el que determinadas composiciones de nanofibras permiten la reorganización del

citoesqueleto de líneas celulares de ACPD.¹²⁹ En comparación con otros nanovehículos, las nanofibras tienen mayor coste-efectividad, facilidad de producción, una gran eficiencia en la encapsulación, de naturaleza biodegradable, biocompatibilidad para regeneración tisular, una alta capacidad de carga de drogas, alto índice de alcance terapéutico, entrega localizada y control de la cinética de liberación de drogas.¹²⁸

Las propiedades de las nanofibras han permitido su aplicación en biomedicina, como sistemas de liberación de drogas, permitiendo aumentar la dosis de tratamiento en un lugar específico o también disminuir su dosificación, reduciendo los efectos adversos descritos en las terapias convencionales basadas en moléculas de bajo peso molecular, como los agentes citotóxicos libres.¹²⁸

Para concluir, remarcar por tanto la importancia de la actualización y desarrollo de modelos de experimentación animal de ACDP para el estudio de nuevos tratamientos como nanopartículas y nanofibras como vehículos de fármacos frente al ACDP. Su mejora podría permitir la aplicación en la asistencia clínica de nuevas terapias dirigidas que aumenten la supervivencia de los pacientes con un ACDP y mejoren su calidad de vida.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La evaluación preclínica de la actividad antitumoral y antimetastásica de cualquier compuesto antineoplásico en ACDP, requiere la generación de un modelo en ratón de ACDP que desarrolle fielmente la progresión tumoral y la diseminación metastásica. Para ello es fundamental que presente un patrón de diseminación similar al observado en clínica y alcanzar una tasa de metástasis mayor a la conseguida con los modelos animales de ACPD transgénicos, o los utilizados en la actualidad por la industria farmacéutica, los cuales se generan a partir de implantación subcutánea, que no son, o son escasamente metastásicos.

Nuestra **primera hipótesis de trabajo** se basa en que el uso de la cepa más inmunodeprimida NOD-SCID, el precondicionamiento subcutáneo, y la implantación de células tumorales con niveles de expresión altos del receptor de quimioquinas CXCR4, aumenta significativamente la diseminación tumoral y es una herramienta útil para la evaluación preclínica de compuestos antitumorales y antimetastásicos. Además, el receptor de quimiocinas CXCR4 se expresa diferencialmente en las células madre tumorales metastásicas de ACDP, por lo que CXCR4 es una excelente diana para el posible direccionamiento en una terapia antimetastásica.

Entre los distintos tipos de modelos xenógrafos ortotópicos, los llamados PDXs derivados de biopsias de ACDP procedentes de pacientes, mantienen el microentorno tumoral original, conservan la variabilidad genética observada en los pacientes y, además, presentan mejor predicción de la respuesta a terapia. Esto permite una mayor traslación de los resultados a la clínica, a diferencia de los modelos xenógrafos generados a partir de la implantación con líneas tumorales pancreáticas comerciales.

Nuestra **segunda hipótesis de trabajo** se basa en que el uso de la cepa NOD-SCID, y la implantación ortotópica quirúrgica de biopsias humanas con elevada expresión de CXCR4, es un modelo más predictivo para la evaluación preclínica de compuestos antitumorales, permitiendo una mejor translación clínica de los resultados obtenidos.

En el contexto del desarrollo de compuestos antitumorales, durante los últimos veinte años se han producido importantes avances de la mano de la nanobiología, y creándose la nueva área de nanomedicina, que ha llevado al estudio experimental de

compuestos en nanoscala utilizados como sistemas de liberación de agentes terapeúticos en distintos tumores. Nanoestructuras como las nanofibras y las nanopartículas han sido empleadas como terapia de entrega de compuestos y se han evaluado en numerosas publicaciones. Las nanofibras son un tipo de nanomaterial dispuesto en forma de retículo, que combinan una gran área superficial, flexibilidad, y porosidad, y permiten la incorporación a su matriz de distintos compuestos para su liberación local y controlada en una gran variedad de tejidos.

Las nanopartículas pueden ser de múltiples tipos, aunque las más prometedoras son las de autoensamblaje proteico. Presentan una alta estabilidad y biocompatibilidad, una eficiente penetrabilidad celular para ser utilizadas como vehículos de drogas. Además pueden ser direccionadas hacia células específicas a través de la expresión, por parte de las células diana, de receptores específicos. Esta ventaja frente a los tratamientos convencionales permite disminuir la toxicidad sistémica. Ambas estrategias son de gran interés en su aplicación en el ámbito oncológico.

Nuestra **tercera hipótesis de trabajo** es que el uso de las nanofibras CEB-01 cargadas con el fármaco SN-38, metabolito activo del Irinotecán, van a permitir una liberación lenta y sostenida de SN-38, controlando el crecimiento del tumor a nivel local. Además, su aplicación en combinación con la terapia clásica de 5-FU y leucovorina puede aumentar significativamente el efecto antitumoral. Por otra parte, el compuesto T22-O-GEM es un nanoconjunto de naturaleza proteica que ha sido generado a partir de la conjugación de Gemcitabina a la nanopartícula T22-GFP-H6, producida en bacterias mediante ingeniería de proteínas. T22-O-GEM se ha diseñado, producido y caracterizado en el proyecto CP15/00167 (IP. Dra. Céspedes). Este nanovehículo contiene el ligando T22, que dirige hacia CXCR4, sobreexpresado en las células madre tumorales, y al tener naturaleza peptídica, puede ser biodegradable y es menos tóxico para las células normales, pudiéndose alcanzar concentraciones terapéuticas mayores a las utilizadas con Gemcitabina libre.

Nuestra **cuarta hipótesis de trabajo** es que T22-O-GEM será un vehículo útil para el transporte, internalización a través de CXCR4 y entrega de Gemcitabina a células tumorales metastásicas CXCR4+, y que puede tener un efecto antitumoral mayor que el tratamiento estándar basado en Gemcitabina, al presentar direccionamiento hacia las células madre tumorales metastásicas, que mantienen la diseminación tumoral.

OBJETIVO PRINCIPAL

Desarrollo de modelos de ACDP con una alta eficiencia metastásica a partir de líneas tumorales establecidas y biopsias tumorales de ACDP con expresión elevada de CXCR4, utilizando la implantación ortotópica quirúrgica y la cepa de ratones inmunodeprimida NOD-SCID. Estos modelos se utilizarán posteriormente para la **evaluación de la eficacia terapéutica** de dos nanocomuestos: una membrana de nanofibras cargada con el citotóxico SN-38 y una nanopartícula dirigida y conjugada con Gemcitabina, ambas generadas mediante nanobiotecnología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtención y criopreservación de muestras quirúrgicas de ACDP, y análisis inmunohistoquímico de la expresión de CXCR4 en una cohorte de 34 tumores de ACDP humano.
2. Análisis de la expresión de CXCR4 en una cohorte de 176 pacientes obtenidos en el proyecto TCGA y en los 34 tumores obtenidos en el Hospital de Sant Pau.
3. Desarrollo y estudio comparativo, utilizando diferentes estrategias experimentales, de modelos de ACDP de alta eficiencia metastásica. Estas estrategias consisten en la implantación ortotópica en la cepa de ratón NOD-SCID de tejido tumoral derivado de las líneas tumorales de adenocarcinoma de páncreas PANC-1 y MIA PaCa-2, además de muestras de piezas quirúrgicas tumorales de pacientes afectados por ACDP. Ambos tipos de matriz con alta expresión de CXCR4.
4. Evaluación de la eficacia terapéutica seguridad y toxicidad local y sistémica de la membrana CEB-01 (membrana de polímero de nanofibra de PLGA biocompatible) cargada con SN-38, metabolito activo del Irinotecán (CEB-01-SN-38) en combinación con el régimen 5-FU y leucovorina en un modelo xenógrafo subcutáneo de cáncer de páncreas. Evaluación de la eficacia terapéutica, seguridad y toxicidad local y sistémica de CEB-01-SN-38 en un modelo xenógrafo ortotópico de ACDP.
5. Caracterización funcional de la nanopartícula T22-O-GEM que incluye la evaluación de su capacidad de internalización y de inducción de muerte celular *in vitro*.

6. Estudio de la biodistribución en tejidos tumorales y no tumorales de T22-O-GEM y capacidad antitumoral en un modelo xenógrafo subcutáneo de cáncer de páncreas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

1.1. Cultivo celular

1.1.1. Líneas celulares

Para generar los modelos animales de metástasis utilizamos las líneas celulares de cáncer pancreático humano PANC-1 y MIA PaCa-2. Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% Suero bovino fetal (SBF, Sigma-Aldrich), 1% glutamina, 0.25% fungizona y 1% penicilina/estreptomicina (Life Technologies), hasta obtener el número de células necesario. La línea celular PANC-1 es una línea establecida de un carcinoma pancreático primario ductal de un varón caucásico de 56 años (J. Nat. Cancer Inst. 1975). La línea celular MIA PaCa-2 se estableció de un carcinoma pancreático primario ductal de un varón de 65 años (Wu M, et al. Biochemistry 16: 1908-1913, 1977).

1.1.2. Subcultivo, congelación y descongelación de las líneas celulares

Para la ampliación y mantenimiento de las células, éstas se sembraron en flacones de 75cm² de superficie, en un volumen de 10 mL de medio de cultivo. Cuando las células alcanzaron el 75% de confluencia, se pasaron a un nuevo flacón. Al tratarse de células en adhesión, se realizó retirando el medio por decantación, se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) atemperado y después se añadieron 3mL de tripsina (0.05% trypin-EDTA, Life Technologies). Tras una incubación de 2-6 minutos a 37°C en tripsina, las células se desprendieron y se resuspendieron en su medio general para bloquear la acción de la tripsina. A continuación se centrifugaron durante 5 minutos a 300g y el pellet obtenido se repartió en tantos flascos como se quisieron obtener.

Para su conservación, las células obtenidas en el pellet, se congelaron en una solución de 10% dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) en SBF y se almacenaron a -80°C en un *frosty* (Nalgene, Waltham, USA) durante 24h. Esto permite una congelación progresiva de las células evitando la formación de cristales. Pasadas las 24h, se conservaron en nitrógeno líquido.

Para la obtención de las células congeladas, se sacaron los criotubos y se descongelaron, rápidamente, en un baño 37°C durante 2-3 minutos. Una vez descongelados, se diluyó la suspensión celular en su medio general, se homogenizó evitando la formación de acúmulos celulares, y se centrifugó durante 5 minutos a 300g. El pellet obtenido se resuspendió en el medio general en un flascón de 75cm².

1.1.3. Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para el contaje de las células se empleó el contador automático *countess* (Life Technologies). El contaje se realizó diluyendo una pequeña parte de la suspensión celular en PBS en un rango de 1x10⁴-1x10⁷ cel/mL. Esta suspensión diluida se mezcló en una proporción (1:1) con *trypan blue* al 0.4% (Life Technologies) y 10 uL de esta mezcla se introdujo en cada uno de los reservorios de una lámina de contaje. Mediante el *countess* determinamos la concentración celular total de la suspensión, que se calculó multiplicando la concentración celular por la inversa de la dilución aplicada.

1.2. Obtención de las líneas tumorales PANC-1 y MIA PaCa-2 con expresión de CXCR4

Las dos líneas tumorales, PANC-1 y MIA PaCa-2, se transfecaron con un plásmido dual que contenía el gen de luciferasa y el gen de CXCR4 (pCMV-CXCR4-IRES-Luc, Biotechne). El método y protocolo utilizado fue el de lipofectamina (Invitrogen; ref. 15338100). Esta técnica permite la formación de complejos entre los lípidos catiónicos del reactivo y el ADN, lo que permite su paso a través de la membrana hasta el citosol. Para ello, las células se sembraron en placa de 6 pocillos a una densidad de 2,5x10⁵ células/pocillo. A las 24h, se cambió el medio a Opti-MEM (Gibco) y se añadió el plásmido (4ug) siguiendo las instrucciones del kit. Testamos dos diferentes ratios de ADN: lipofectamina (1:2 y 1:3) para encontrar la condición más eficiente. El grupo control se trató igual, pero sin añadir ADN. Veinticuatro horas después de la transfección se seleccionaron las células transfecadas utilizando 2ug/ml de puromicina (Life Technologies) durante 10 días. Se eligió esta concentración al ser la concentración mínima que producía una muerte del 100% en las células transfecadas. Posteriormente se crecieron en el medio de cultivo, reduciendo a la mitad la concentración de antibiótico utilizada para la selección. Adicionalmente, confirmamos la expresión de luciferasa utilizando el sistema IVIS Spectrum (Perkin Elmer) y la expresión de CXCR4 mediante citometría de flujo. Cuando obtuvimos un número suficiente de células, se congeló una

alícuota en SBF con 10% DMSO a -80°C para mantener el clon como se describe en la sección 1.1.2.

1.2.1. Determinación de los niveles de CXCR4 en las líneas tumorales PANC-1 y MIA PaCa-2

Para confirmar la expresión de CXCR4 en las líneas celulares, se determinó su expresión mediante citometría de flujo. Para ello, marcamos 1×10^6 de células en 100ul de PBS con 5 ul de anticuerpo monoclonal PE-Cy5 anti-CD184 (BD Bioscience 555974) y 1×10^6 con 100ul de PBS con 5 ul del anticuerpo isotipo PE-Cy5 idG2a (BD Bioscience, 555574) como control negativo. Las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C en agitación, y tras dos lavados con PBS, fueron pasadas por el equipo de citometría FACSCalibur (BD Bioscience). Se midió tanto el porcentaje de células que expresaban el receptor CXCR4 como la intensidad de la expresión que se expresó como intensidad de fluorescencia media (IFM).

1.3. Obtención de la línea tumoral “M2” a partir de un tumor de ACDP derivado de un paciente

Realizamos el proceso de obtención de las *tumor line* a partir de las muestras de ACDP recogidas de los pacientes intervenidos en nuestro hospital durante la duración del trabajo de tesis. Una vez obtenido el tumor del paciente y con la ayuda de unas tijeras, un bisturí y pinzas quirúrgicas, se limpió de zonas necróticas y se desechó el material no viable. El material viable, se disgregó para obtener una suspensión celular. Para ello, se sumergieron aproximadamente 300 mg del tejido tumoral “limpio” en una solución de 3 ml de tripsina 0.05% y 30 ul de ADNs (concentración final 100 microg/ml). A continuación, se realizaron pipeteos sucesivos utilizando pipetas de distinto calibre, y el producto se incubó durante 20 minutos a 37°C en agitación. A continuación, se filtró utilizando una malla estéril de 40 um de tamaño de poro, para excluir los fragmentos tumorales no digeridos y el producto filtrado, se centrifugó a 2400 rpm durante 10 min. El pellet se reconstituyó con 10 ml de medio de cultivo, transfiriéndose a un flascón de baja adherencia (Sarstedt), para cultivarse, posteriormente, en condiciones de suspensión, suplementando el medio con FGFβ (1 ug/ml, Sigma-Aldrich) y B27 (50:1, Sigma-Aldrich). Tras un mes de cultivo, las células se transfirieron a condiciones de adhesión. El origen epitelial se determinó mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo EPCAM (BV421 mouse anti-human CD326, BD Bioscience, 563180) y su correspondiente isotipo

(BV421 mouse IgG1, K isotype control, BD Bioscience, 562438) utilizando los protocolos convencionales (apartado 1.2.1).

2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

2.1. Animales

Se utilizaron ratones inmunodeprimidos de las cepas *Swiss nude* (Crl: UN (Ico)-Foxn1^{nu}) y NOD-SCID (NOD.CB17-Prkdc^{sc id} /NcrCrl) hembras, de 5-6 semanas de edad y pesos comprendidos entre 18-20g obtenidos de Charles River.

Los ratones *Swiss nude* carecen de timo y sus linfocitos T no son funcionales. Los ratones NOD-SCID tienen una mutación en el gen SCID que altera la función de los linfocitos T y B. El background NOD, además, es responsable de la falta de función de los linfocitos NK, aunque conservan parte de su función.

Los animales se estabularon a una temperatura de 22-24°C y un fotoperíodo de 12:12h, en un ambiente libre de patógenos (SPF), en racks ventilados y jaulas protegidas con tapa y filtro, con viruta esterilizada, comida irradiada y agua estéril *ad libitum*.

Los procedimientos a los que fueron sometidos los ratones fueron aceptados por el Comité ético del Institut de recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y aprobados por la Generalitat de Catalunya (Ref. P1115_9721).

Previamente a cualquier intervención quirúrgica, los ratones se anestesiaron con una solución de ketamina (Ketolar, Parke Davis SL, Pfizer, 100 mg/Kg) y xilacina (Rompun, Bayer, 10 mg/kg) por vía intraperitoneal (ip). Cada ratón se marcó con un número para su identificación y posterior seguimiento en cuanto a la evolución del peso corporal y crecimiento tumoral.

2.2. Inoculación subcutánea en ratón inmunodeprimido para generar los ratones nodriza

Cada ratón, previamente anestesiado fue inyectado con 20 millones de células en 200 ul de medio de cultivo, utilizando una jeringa de tuberculina (23G). En todas las condiciones las células provenían de células en cultivo *in vitro*, las cuales se tripsinizaron. El pellet obtenido de la centrifugación, se resuspendió en 400 ul de medio de cultivo. Las inoculaciones se distribuyeron en dos flancos (anterior derecho y posterior izquierdo), implantando 10 millones de células en cada inoculación de 200 ul.

2.3. Generación del modelo subcutáneo de ACDP

Este procedimiento consistió primero en la obtención de tumores de los ratones nodriza, tras la inyección subcutánea de células PANC-1 o MIA PaCa-2 como se detalla en el apartado 2.2. Cuando el tumor alcanzó un volumen aproximado de 1000 mm³, se extrajeron, se limpiaron de necrosis macroscópica, y se cortaron fragmentos de 10mg. Estos fragmentos se implantaron subcutáneamente en nuevos animales mediante el sistema *trocher*.

2.4. Generación del modelo ortotópico de ACDP metastásico después de condicionamiento subcutáneo

Una vez obtenidos tumores de aproximadamente 1000 mm³ tras la inyección subcutánea de células PANC-1 o MIA PaCa-2 como se detalla en el apartado 2.2, se extrajeron, se limpiaron de necrosis macroscópica, y se cortaron fragmentos de 10mg de tumor. Estos fragmentos se implantaron ortotópicamente en el páncreas. Para ello se realizó una incisión lateral ventral, se expuso el páncreas y se implantó cada fragmento en un animal con un punto de sutura no absorbible.

2.5. Resección del tumor y colocación de la membrana CEB-01

Las membranas de nanofibras (CEB-01) se transportaron y se conservaron a -20°C hasta el momento de su implantación. Cada muestra consistía en un disco de membrana de 0.8cm de diámetro (0.5cm²) individualmente empaquetado con un número de identificación.

Las muestras fueron obtenidas de los siguientes lotes (tabla 2):

Tabla 2. Lotes y muestras empleadas de membrana CEB-01.

Tipo	Lote nº	Carga de las muestras
Vehículo	CEB-01-230717A-000	Sin carga
25 mcg/cm ²	CEB-01-250717A-025	Con carga de SN-38 a la dosis indicada.
50 mcg/cm ²	CEB-01-310717A-050	Con carga de SN-38 a la dosis indicada

Cuando el tumor situado en el páncreas alcanzó un tamaño de 150 mm³ ($\varnothing = 6.8$ mm, $A = 36.2$ mm²), los ratones fueron anestesiados y se realizó una incisión lateral para exponer el páncreas con el tumor. Se resecaron 2/3 del volumen del tumor mediante un cauterizador (Quirumed) y se colocó la membrana CEB-01 directamente en la superficie tumoral. Para mantener la membrana en proximidad con el tumor se dio un punto de sutura no absorbible entre la membrana y el tumor. Un día antes de la resección se administró en el agua del biberón de los ratones buprenorfina a una concentración de 0.0015 mg/ml.

2.6. Administración del régimen de quimioterapia

Se administró quimioterapia en el estudio combinado con las membranas CEB-01. Cuando el volumen tumoral de los ratones en el grupo control alcanzó 250 mm³, se randomizaron en dos grupos y se empezó el régimen de quimioterapia. El tratamiento consistió en la administración de 30 mg/kg de 5-FU y 90 mg/kg de leucovorina ip dos veces a la semana, en un total de 4 dosis durante dos semanas.

En este ensayo, el diseño de los grupos de tratamiento fue el siguiente (tabla 3):

Tabla 3. Diseño de los grupos de tratamiento en el experimento con las membranas CEB-01.

Grupo	Nombre	N ratones	Tratamiento	Tratamiento CEB-01 (o membrana vacía)	Quimioterapia
1.	Control	6	Vehículo de quimioterapia	Resección quirúrgica	Cuando el volumen del tumor de 12 ratones no implantados alcanzó la media de 250 mm ³ , randomización en 2 grupos de 6 ratones (grupos 1 y 2)
2.	Control + quimioterapia	6	Quimioterapia	Resección quirúrgica	
3.	Vehículo	6	Membrana vacía (sin SN-38)	Membrana implantada en el momento de la resección quirúrgica	-
4.	Vehículo+ quimioterapia	6	Membrana vacía (sin SN-38) + quimioterapia	Membrana implantada en el momento de la resección quirúrgica	Empezando al mismo tiempo y con un régimen similar que el grupo 1 y 2
5.	50 mcg/cm ²	6	CEB-01 50 mcg/cm ²	Membrana implantada en el momento de la resección quirúrgica	-
6.	50 mcg/cm ² + quimioterapia	6	CEB-01 50 mcg/cm ² + quimioterapia	Membrana implantada en el momento de la resección quirúrgica	Empezando al mismo tiempo con un régimen similar que el grupo 1 y 2

2.7. Seguimiento de los animales

En implantación subcutánea, se registró el crecimiento tumoral dos o tres veces por semana, dependiendo del experimento, y el volumen se estimó tras medir el eje mayor y menor del tumor con el pie de rey, aplicando la fórmula de un elipsoide ($V = \frac{1}{2} \pi \times \text{eje menor}^2 \times \text{eje mayor} \times 0,5$). El efecto terapéutico se evaluó mediante la disminución del volumen tumoral. Además, se registró el peso corporal del animal y se observó su aspecto y comportamiento, considerando los parámetros establecidos en el protocolo de supervisión que se adjunta en el anexo II.

Se registró el día de inyección de las células o la implantación del tumor, y el día de sacrificio de los ratones.

En el experimento ortotópico se consideró el tiempo de supervivencia como la diferencia entre ambos tiempos. El sacrificio de los animales se realizó cuando el ratón disminuyó su peso en un 20%, o bien mostró signos de estrés o de dolor.

2.8. Seguimiento *in vivo* del crecimiento tumoral por bioluminiscencia

La transfección de las líneas tumorales con un plásmido que expresaba luciferasa permitió el seguimiento de las células tumorales *in vivo*. El registro de los ratones se realizó utilizando el sistema de imagen Xenogen IVIS Spectrum (Perkin Elmer) acoplado al sistema de anestesia por isofluorano XGI-8 (Xenogen). Cinco minutos antes del registro, a los ratones se les injectó 2.25 mg de D-luciferina por vía intraperitoneal (150 μL de luciferina 15 mg/ml diluida en suero fisiológico estéril). La imagen se realizó en posición ventral o en posición dorsal dependiendo del experimento, el tiempo de exposición se ajustó automáticamente en función de la intensidad de bioluminiscencia de cada ratón y las líneas celulares utilizadas. La frecuencia con la que se realizó cada registro fue como máximo dos veces por semana.

2.9. Necropsia y procesado de muestras

En todos los experimentos los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. El criterio de sacrificio o punto final dependió en cada caso del objetivo del experimento. Tras la necropsia, se extrajeron los órganos en bloque y se fotografiaron utilizando una cámara Kodak Z740. Se registró la presencia de tumor, se midieron sus ejes mayor y

menor y se estimó el volumen tumoral utilizando la fórmula del elipsoide y el peso tumoral. Se recogieron muestras de páncreas, de tumor local y de aquellos órganos en los que teóricamente pudieran haberse desarrollado metástasis (ganglios mesentéricos, hígado, pulmón y peritoneo). En el experimento de tratamiento también se recogieron bazo, hígado, riñón, pulmón y cerebro para evaluar la posible toxicidad de los compuestos ensayados. Cada muestra obtenida se dividió en dos alícuotas: una se introdujo en cassette y se fijó en paraformaldehído al 3,7% a pH 7,4, para su posterior inclusión en parafina, mientras que la otra se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se guardó, a -80°C, para su análisis molecular. A partir de los bloques de parafina obtenidos, se realizaron cortes de 4 um, que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) para su análisis histopatológico.

2.10. Determinación de las metástasis a distancia mediante bioluminiscencia

En los experimentos *in vivo* de implantación ortotópica se analizó la presencia y distribución de células tumorales en otras localizaciones alejadas del sitio de implantación del tumor primario (metástasis). Los órganos diana son metástasis linfáticas, hígado, pulmón y peritoneo.

En el momento del sacrificio los órganos se registraron *ex vivo* en el IVIS Spectrum para la determinación de emisión de luminiscencia o crecimiento tumoral y se procesaron mediante técnicas histológicas para su conservación y análisis.

2.11. Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

Dos observadores independientes realizaron el análisis histopatológico de las muestras de tumor primario y de los órganos diana de metástasis a doble ciego. Las preparaciones de HE se observaron al microscopio utilizando una magnificación 4-20 aumentos. Se evaluó el grado de diferenciación y área de necrosis tumoral.

Se registró el número de focos micro y macroscópicos observados en los órganos afectados y el tamaño de los mismos, que se expresó como área (um²) y que se midió utilizando el software CellID de Olympus (v 3.3).

El recuento de células muertas, en cada tumor primario, se realizó cuantificando 10 campos diferentes por tumor a un aumento de 400x, para obtener el número de células muertas sumando las observadas en todos los campos.

Analizamos diferentes secciones o niveles histológicos de un mismo órgano y así poder estudiar la dispersión de las células tumorales dentro del órgano. En cada nivel se realizaron 2 cortes de tejido secuencial. Uno de ellos se tiñó con HE y el otro con el anticuerpo de estudio, en este caso el CXCR4. En cada nivel de órgano se contabilizó el número de focos y el tamaño de dichos focos (expresado como área en um^2).

En las muestras de tumor se realizó un análisis molecular por inmunohistoquímica. Esta técnica se empleó para detectar proteínas específicas en muestras tisulares. Concretamente, evaluamos la expresión de CXCR4 (Epitomics, clone UMB2; Cat# 33108-1). Las muestras incluidas en parafina se cortaron y se colocaron sobre portas cargados eléctricamente para evitar la pérdida del tejido (FLEX IHC Microscope Slides, Dako), se incubaron durante 30 minutos a 60°C y se desparafinaron y rehidrataron según los protocolos clásicos. La recuperación antigénica se realizó en el sistema PTlink (Dako), a 95°C durante 10 minutos y 45 minutos a 65°C en tampón citrato de pH 9.0 (Dako). La inmunotinción se realizó mediante el sistema automatizado Autostainer Link 48 (Dako), utilizando el kit EnVision Flex, high pH (Dako) y las especificaciones de la casa comercial. La incubación con el anticuerpo anti-CXCR4 fue de 20 min a una dilución de 1:200, que se realizó con *rinse buffer*.

Se cuantificó el porcentaje de células teñidas respecto al número de células tumorales y la intensidad de la tinción, que se estimó entre 1 y 3, asignándose a la intensidad máxima el valor 3. Finalmente, el parámetro resultante de multiplicar ambos valores representó la expresión de la proteína en cada muestra.

2.12. Variables evaluadas y análisis estadístico

Las variables clínico-histopatológicas analizadas en cada grupo fueron: tiempo de supervivencia, tasa de injerto, tamaño tumoral, afectación metastásica linfática, hepática, pulmonar y peritoneal, número y tamaño de los focos metastásicos en las localizaciones afectadas. Los datos se han expresado como media ± error estándar (media + e.e.).

El análisis comparativo de las diferencias entre las variables categóricas, expresadas como porcentaje o número de casos (por ejemplo, animales afectados, tasa de injerto...) se llevó a cabo utilizando las tablas de contingencia y seguidamente el test Chi cuadrado o el test de Fisher, éste último utilizado cuando el número de observaciones es muy bajo. Cuando la distribución de las variables continuas (volumen tumoral, áreas de micro o macro-metástasis y número de focos tumorales) cumplían los criterios de homocedasticidad y normalidad (Shapiro-Wilk test) para cada uno de los grupos comparados, la existencia de diferencias entre grupos se determinó utilizando el test paramétrico de Student. De no cumplirse estos criterios, se utilizó su equivalente no paramétrico de U Mann Whitney.

La supervivencia para cada grupo se calculó usando el método de Kaplan-Meier y las distribuciones de supervivencia se compararon utilizando el test de Log-Rank. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando alcanzaron una probabilidad de $p<0.05$. Para la realización de todos estos test estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics v22.

3. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y LA BIODISTRIBUCIÓN *IN VIVO* DE T22-GFP-Gemcitabina

3.1. Ensayo de citotoxicidad de T22-GFP-Gemcitabina

La citotoxicidad de T22-GFP-Gemcitabina se evaluó utilizando el test de viabilidad celular o XTT (cell proliferation kit II XTT, Roche Applied Science ref: 1465015). Este ensayo se basa en la determinación de la capacidad metabólica celular, ya que únicamente las células viables son metabólicamente activas, y capaces de transformar la sal de tetrazolium (XTT) en formazán, un colorante naranja que se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 450-500nm. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24h. La nanopartícula se añadió a 1uM durante 72h. Transcurrido ese tiempo, el reactivo XTT se añadió durante 4h y el producto formado se leyó en un lector de microplacas a 490 nm (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH). Una disminución del número de células viables se correlaciona directamente con una disminución de la cantidad de formazán formado respecto a las células control

viables, por lo tanto, con una menor absorbancia. Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas respecto a la viabilidad celular de las células tratadas con el tampón (sin nanopartícula).

3.2. Ensayos de biodistribución de T22-GFP-Gemcitabina

Se evaluó la biodistribución de la nanopartícula en ratones portadores de tumores subcutáneos PANC-1 CXCR4⁺. Para ello, se administró un bolus intravenoso de 100µg (n=5) de nanoconjungados (T22-O-GEM) o sus controles sin Gemcitabina (T22-GFP) y los ratones se sacrificaron a las 5h y 24h post-administración. Se realizó un análisis ex vivo de todos los órganos y se evaluó su biodistribución utilizando la señal fluorescente GFP que contienen los nanoconjungados mediante el IVIS spectrum. Posteriormente, los órganos se fijaron e incluyeron en parafina, y se determinó la expresión en membrana del receptor CXCR4 y la capacidad de inducir muerte en las células tumorales CXCR4⁺ mediante inmunohistoquímica. Se evaluó el daño inducido al ADN por la Gemcitabina liberada utilizando el anticuerpo anti-γ H2AX (Novus biologicals). Todos los órganos extraídos se evaluaron histológicamente mediante tinción con HE.

3.3. Análisis estadístico

Los ensayos *in vitro* de citotoxicidad se han realizado por duplicado. La distribución normal de los datos se testó utilizando el test Shapiro-Wilk test. Los resultados con una distribución normal se analizaron utilizando la t de Student mientras que el test de Mann-Whitney se utilizó en el caso de no normalidad. Se consideraron diferencias significativas entre grupos a una p< 0.05. Los datos se han expresado como media ± error estándar (media + e.e.).

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 EN MUESTRAS DE PACIENTES CON ACDP

En esta tesis se ha trabajado con dos tipos de muestras de pacientes con ACDP, biopsias tumorales parafinadas y biopsias tumorales de tejido fresco, cada una de las cuales se obtuvo de cohortes independientes de pacientes. Adicionalmente, se trabajó con un tercer grupo de pacientes afectados por ACDP, incluidos en las plataformas web disponibles: GEPIA2 (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>), GTEx portal

(<https://www.gtexportal.org/home/>) y *Expression Atlas* (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) que utilizan datos obtenidos en el proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcgab/>), donde incluye información sobre el nivel de expresión de ARNm de CXCR4 en 179 muestras de tumor primario y en 171 mucosas normales, y como dato de seguimiento clínico, el tiempo de supervivencia de los pacientes afectados por ACDP.

4.1. Características de los pacientes y seguimiento clínico

4.1.1. Diseño y población de estudio

Para el estudio de la expresión de CXCR4 y la generación de los modelos PDXs se han recogido muestras de ACDP de 19 pacientes intervenidos en la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de 2016 a 2018, que han aceptado participar en el proyecto dando su consentimiento verbal y escrito a través de una hoja de consentimiento informado (anexo I).

Además se han estudiado las parafinas de 15 pacientes adicionales, intervenidos por la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital de la Santa Creu i San Pau de 2009 a 2013. Se han seleccionado en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica.

Esta disponibilidad de muestras ha permitido recopilar datos de un total de 34 pacientes con diagnóstico de ACDP intervenidos de 2009 a 2018.

4.1.2. Criterios de inclusión

- Pacientes que han dado su consentimiento para la participación en el proyecto.
- Posibilidad de realizar una cirugía curativa radical.
- Ausencia de enfermedad extrapancreática.
- Criterios de operabilidad del paciente.

4.1.3. Criterios de exclusión

- Pacientes que no han dado su consentimiento para la participación en el proyecto.
- Pacientes no operables por comorbilidad.
- Presencia de enfermedad extrapancreática diseminada.
- Enfermedad localmente avanzada con imposibilidad de realizar una cirugía curativa.

4.1.4. Protocolo de actuación

4.1.4.1. Pacientes

Todos los pacientes diagnosticados de ACDP incluidos en el estudio fueron sometidos a diferentes pruebas complementarias practicadas de manera sistemática para conocer la extensión de la enfermedad y poder realizar el manejo terapéutico más adecuado:

- Analítica completa con hemograma, bioquímica con perfil hepático, coagulación y Ca.19.9.
- Pruebas de imagen diagnósticas como la TC. En algunos casos, para completar el estudio se realizó RMN y/o ecoendoscopia.
- Para la colocación de prótesis en la vía biliar principal se realizó colangiopancreatografía retrógrada endoscóptica.
- Previamente a la intervención quirúrgica se han realizado las pruebas preoperatorias de analítica, electrocardiograma, radiografía de tórax y la valoración anestésica correspondiente.

4.1.4.2. Recogida de datos clínico-patológicos

Se ha confeccionado una base de datos recogiendo de manera retrospectiva las siguientes variables:

- Datos demográficos: edad, sexo. Medidas de rango y media.
- Antecedentes patológicos: ninguno, uno, más de uno, algún antecedente oncológico o únicamente antecedentes familiares oncológicos.
- Características clínicas previas a la intervención quirúrgica:
 - Bilirrubina elevada al diagnóstico (Bilirrubina total >20.5micromol/L; Bilirrubina conjugada >5.1micromol/L)
 - Colocación de prótesis en la vía biliar principal.
 - Ca 19.9 elevado al diagnóstico (>25U/ml)
 - Intervención quirúrgica realizada: DPC o esplenopancreatectomía corporo-caudal (EPCC).
 - Características del tumor: localización (cabeza, cuerpo, cola), necesidad de resección venosa (vena porta/ vena mesentérica superior), T (tamaño tumoral - T1, T2, T3-), N (afectación ganglionar – N0, N1-), grado de

diferenciación tumoral (G1, G2, G3), invasión perineural, invasión vascular, afectación de márgenes (negativo R0, afectación microscópica R1).

- Variables postoperatorias: necesidad de transfusión durante el ingreso, complicaciones postquirúrgicas (según Clasificación de Clavien- Dindo - ninguna, I, II, III, IV, V-)
- Estancia hospitalaria: 1-15 días, 15-30 días, >3 días. Medidas de rango y media
- Administración de neoadyuvancia.
- Administración de adyuvancia.
- Presentación de recidiva: ninguna, local, metastásica, ambas.
- Supervivencia: <22 meses, >22 meses. Medidas de rango y media.

4.2. Recogida y procesamiento de biopsias de tejido fresco para generar los modelos PDXs

Las biopsias tumorales y no tumorales de tejido fresco se obtuvieron por especialistas del Servicio de Anatomía Patológica, en el momento en que la pieza llega al Servicio después de la intervención. La pieza de tejido tumoral (200 mm^3) se introdujo en medio de cultivo en ausencia de SBF hasta el momento de su criopreservación. Para su conservación, se cortó en fragmentos de aproximadamente 20 mm^3 y se introdujeron en una solución de SBF +10% DMSO, siguiendo el protocolo que se explica en el apartado 1.1.2.

4.3. Inmunohistoquímica y determinación de los niveles de expresión de CXCR4 en las biopsias parafinadas

Las biopsias parafinadas obtenidas de pacientes con ACDP, se cortaron en secciones de 5 μm de grosor y se procesaron para inmunohistoquímica tal como se explica en el apartado 2.11. Las muestras se incubaron con el anticuerpo CXCR4 (1:300) durante 20 minutos. El revelado se realizó con el reactivo Envision TM FLEX y FLKEX+ (Dako) utilizando los procedimientos estándar. Como controles negativos se emplearon las mismas muestras, pero sustituyendo la incubación con el anticuerpo primario por suero de ratón no inmunizado. Se determinaron los niveles de expresión proteica de CXCR4 a través de dos parámetros, el porcentaje de células positivas (0-100%) y la intensidad de tinción global (1: sin tinción o débil; 2: moderada; 3: fuerte). Se analizaron eligiendo

aleatoriamente 5 campos a un aumento de 100x por cada muestra. Dos observadores independientes analizaron las inmunohistoquímicas de CXCR4. El análisis y las imágenes se tomaron usando una cámara digital Olympus DP73 y se procesaron a través del programa CellID imaging 3.3 (Olympus).

4.4. Estudio de la asociación de la expresión de CXCR4 con los parámetros clínico-patológicos y la supervivencia en pacientes

Inicialmente, se ha realizado el estudio descriptivo de los 34 pacientes incluidos teniendo en cuenta las variables clínico-patológicas previamente descritas y niveles de CXCR4.

Por otra parte, utilizando los datos obtenidos en TCGA, y mediante el análisis basado en arboles de clasificación y regresión (ACR), se estableció el valor umbral correspondiente al nivel de expresión de CXCR4 más adecuado, con mayor sensibilidad y especificidad, para establecer dos grupos de pacientes con diferente riesgo de recaída asociada al ACDP. En base a este análisis se definieron dos grupos de pacientes, un grupo de pacientes con niveles elevados de expresión de CXCR4 y un grupo de pacientes con niveles bajos de expresión de CXCR4 y que se asociaron con el riesgo de recaída. Este análisis también se utilizó en el estudio con los datos extraídos de la base de datos del TCGA.

Las curvas de Kaplan-Meier y el test Log-Rank se utilizaron para representar y comparar, respectivamente, la supervivencia entre grupos de pacientes con diferente nivel de expresión de CXCR4.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE CXCR4 EN TUMORES DE ACDP

Con el objetivo de analizar la expresión de CXCR4, y confirmar el valor pronóstico asociado a supervivencia, identificado en trabajos previos⁴³⁻⁴⁶, hemos evaluado la expresión de la proteína mediante técnicas inmunohistoquímicas en biopsias pre-tratamiento obtenidas de pacientes pertenecientes a dos cohortes independientes. Una primera cohorte seleccionada de modo prospectivo y otra cohorte de pacientes seleccionada de modo retrospectivo, y obtenidas del archivo de Anatomía Patológica de nuestro hospital. Adicionalmente, se añadió una tercera cohorte de pacientes incluidos en el proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <http://gdccancer.nci.nih.gov/projects/TCGA-PDAC>), donde se obtuvieron los niveles de expresión de CXCR4 mediante técnicas de secuenciación masiva de ARN.

La expresión de la proteína CXCR4 se evaluó en las 34 biopsias tumorales parafinadas pertenecientes a pacientes con ACDP antes de que iniciasen el tratamiento. Las características clínico-patológicas de estos pacientes se detallan en la Tabla 4. Los resultados de la inmunohistoquímica se observaron en el microscopio por dos investigadores diferentes para determinar el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción para CXCR4. El porcentaje de células positivas para la expresión de CXCR4 fue similar entre muestras, alrededor del 20% de células teñidas, mientras que la intensidad varió entre las distintas muestras. Se utilizó el parámetro H-score para determinar el valor de CXCR4, que se calculó multiplicando el área de marcaje por la intensidad del mismo.

1.1. Descripción de las características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio

De los 34 pacientes incluidos en el estudio, 17 (50%) fueron hombres y 17 (50%) mujeres. La media de edad fue de 72,8 años, con un rango de 47 a 91 años; la mayoría, de edad mayor de 65 años (73.5%). Veintiséis pacientes presentaron antecedentes patológicos (76.4%), 15 (44%) un antecedente (cardiovascular en su mayoría), 6 (17.6%)

más de uno, 3 (8.8%) algún antecedente oncológico y sólo 2 (5.8%) no presentaban ningún antecedente, pero sí familiares con patología oncológica previa.

Al diagnóstico, 26 (76,4%) pacientes presentaron bilirrubina total y conjugada elevada, pero sólo 15 (44%) necesitaron colocación de prótesis biliar por cursar con colangitis, o bien por la necesidad de realizar más pruebas complementarias y no ser intervenidos de inmediato, para mejorar la colestasis, las pruebas de función hepática y prevenir la colangitis.

Al diagnóstico, 17 (50%) pacientes presentaron elevación de Ca 19.9 y 17 (50%) valores normales.

La localización del tumor fue en 27 (79.4%) casos la cabeza pancreática, en los cuáles la intervención quirúrgica realizada fue una DPC, en 6 (17,6%) casos el cuerpo y en 1 (2,9%) la cola pancreática. En estos 7 casos (20.5%) la intervención quirúrgica realizada fue una EPCC. La mayoría de ellos, 29 (85,2%), fueron intervenidos sin necesidad de resección de la vena porta o vena mesentérica superior.

En cuanto a las complicaciones postoperatorias (mencionadas según la clasificación de Clavien- Dindo) se incluyen fistula pancreática, fistula biliar, retraso del vaciamiento gástrico, íleo paralítico, hemorragia, colección intraabdominal, fallo de sutura e infección de herida. La mayoría de los pacientes presentaron alguna complicación postoperatoria, en concreto 19 (55,8%), aunque casi todas fueron complicaciones menores tratadas de manera médica sin requerimiento de cirugía ni abordaje endoscópico (complicaciones grado I, 4 [11,7%] pacientes), y complicaciones grado II, 12 [35,2%] pacientes). Dos (5,8%) pacientes presentaron complicaciones mayores grado III y IV, y un (2,9%) paciente fue *exitus* por shock hemorrágico con fallo multiorgánico en el postoperatorio inmediato.

En el postoperatorio 21 (61.7%) pacientes no requirieron transfusión de concentrados de hematíes y 13 (38,2%) sí.

La estancia media hospitalaria fue de 27,5 días, con un rango de 6 a 91 días. La mitad de los pacientes, 17 (50%) permanecieron ingresados de 15 a 30 días, 8 (23,5%) pacientes menos de 15 días y 9 (26,4%) más de 30 días.

En cuanto a las características patológicas del tumor, la mayoría de los casos, 29 (85,2%) pacientes, se englobaron dentro de un tamaño tumoral T3. Un (2,9%) paciente presentó un T1 y 4 (11,7%) un T2. La afectación ganglionar fue mayoritaria, con 29

(85,2%) casos, siendo N0 únicamente 5 (14,7%) pacientes. Según el grado de diferenciación tumoral, 12 (35,2%) pacientes presentaron un G1 (bien diferenciado), 16 (47%) un G2 (moderadamente diferenciado) y 6 (17,6%) un G3 (pobremente diferenciado).

En cuanto a otros factores pronósticos relacionados con el tumor, la mayoría de los pacientes presentaron invasión perineural o vascular, siendo mayoritaria la primera con 25 (73,5%) pacientes frente la segunda con 18 casos (52,9%). Nueve (11,7%) pacientes no presentaron ninguna de los dos y 16 (47%) ambas.

En el análisis anatomico-patológico, hasta en 16 (47%) pacientes se encontraron márgenes afectos, sobre todo el margen posterior y a nivel de la impronta vascular, siendo la cirugía definida como R1. En 18 (52,9%) pacientes la cirugía fue R0 con márgenes libres.

Sólo un (2,9%) paciente recibió neoadyuvancia con QT-RT por tratarse de una neoplasia resecable borderline.

Salvo 13 (38,2%) pacientes que no presentaron las condiciones clínicas adecuadas, el resto recibieron tratamiento adyuvante con Gemcitabina sola o en combinación con otros agentes quimioterápicos., 7 (20,5%) quimioterapia sola y 14 (41,1%) QT-RT.

Doce (35,2%) pacientes no presentaron recidiva de la enfermedad, un (2,9%) paciente sólo recidiva local, 14 (41,1%) recidiva metastásica (pulmonar, hepática y/o peritoneal) y 7 (20,5%) ambas.

La supervivencia global media de los pacientes fue de 24 meses, con un rango de 4 a 120 meses. La supervivencia fue menor a 22 meses en 20 (58,8%) casos y mayor a 22 meses en 14 (41,1%).

Tabla 4. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio (cohorte retrospectiva y prospectiva).

Variable	Pacientes totales (n=34)
Sexo	
Hombre	17
Mujer	17
Edad (años)	
<65	9
>65	25

Antecedentes	
NO	8
1	15
>1	6
Algún AP oncológico	3
AF (familiares) oncológicos	2
Intervención quirúrgica	
DPC	27
EPCC	7
Bilirrubina elevada al diagnóstico (Bil total >20.5micromol/L; conjugada >5.1micromol/L)	
SI	26
NO	8
Prótesis pre-IQ	
SI	15
NO	19
Ca 19.9 elevado al diagnóstico (>25 U/ml)	
SI	17
NO	17
Localización	
Cabeza	27
Cuerpo	6
Cola	1
Transfusión	
SI	13
NO	21
Resección de vena	
SI	5
NO	29
Estancia hospitalaria	
1 a 15 días	8
15 a 30 días	17
>30 días	9
Complicaciones postquirúrgicas (Clavien- Dindo)	
NO	15
I	4
II	12
III	1
IV	1
V	1
T (tamaño tumoral)	
T1	1
T2	4
T3	29

N (afectación ganglionar)	
N0	5
N1	29
Grado de diferenciación tumoral	
G1	12
G2	16
G3	6
Invasión perineural	
SI	25
NO	11
Invasión vascular	
SI	18
NO	16
Margen (libre: R0; afecto: R1)	
R0	18
R1	16
Neoadyuvancia	
SI	1 (QT-RT)
NO	33
Adyuvancia	
SI (QT)	7
SI (QT-RT)	14
NO	13
Recidiva	
SI local	1
SI metastásica	14
SI ambas	7
NO	12
Supervivencia	
<22 meses	20
> 22 meses	14

1.2. Asociación entre las características clínico-patológicas de los pacientes del estudio y la expresión de CXCR4

En las biopsias tumorales de ACDP obtenidas en nuestro hospital, evaluamos los niveles de expresión de CXCR4 mediante inmunohistoquímica (figura 7). Un total de 85% de los tumores presentaron expresión de CXCR4. Los resultados se relacionaron con el grado y diferenciación tumoral, y con el grado de invasión y diseminación, que incluían los datos de invasión ganglionar, vascular y perineural y de recidiva y supervivencia. No

encontramos diferencias entre los niveles de expresión de CXCR4 y el tamaño tumoral o grado de diferenciación (figura 8).

De forma similar, relacionamos los niveles de expresión de CXCR4 y el grado de invasión vascular, afectación ganglionar, invasión perineural, recidiva y supervivencia, no encontrando diferencias significativas ni en afectación ganglionar, ni en invasión perineural o supervivencia. En cuanto a la invasión vascular, observamos que el valor de H-score de CXCR4 fue significativamente más alto ($p<0.05$) en aquellos pacientes que la mostraban respecto a los que no presentaban invasión vascular (media $24,9\pm3,0$ versus $35,2\pm3,0$; mediana 23 [14,54] versus 30 [13,72]). Por otra parte, analizamos los pacientes con recidiva y no recidiva, y observamos que aquellos pacientes que habían recaído (41,1%) presentaban niveles de H-score para CXCR4 significativamente más elevados ($p<0,01$) que los que no la presentaban (media $21,1\pm1,5$ versus $36,9\pm3,2$; mediana 22 [13,30] versus 32 [24,54]) (figura 9).

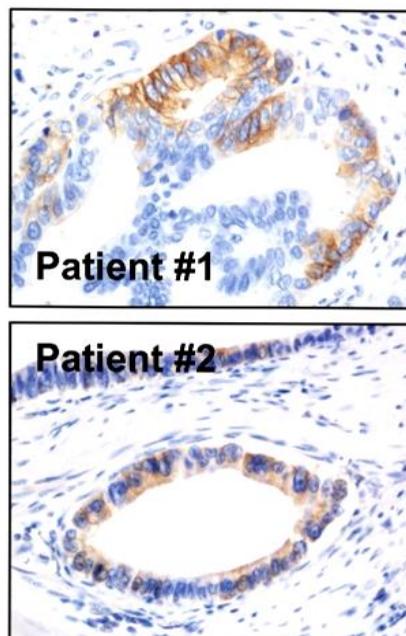


Figura 7. Expresión de CXCR4 en dos tumores representativos de pacientes afectados por ACDP e intervenidos en el nuestro hospital. (400x magnificación)

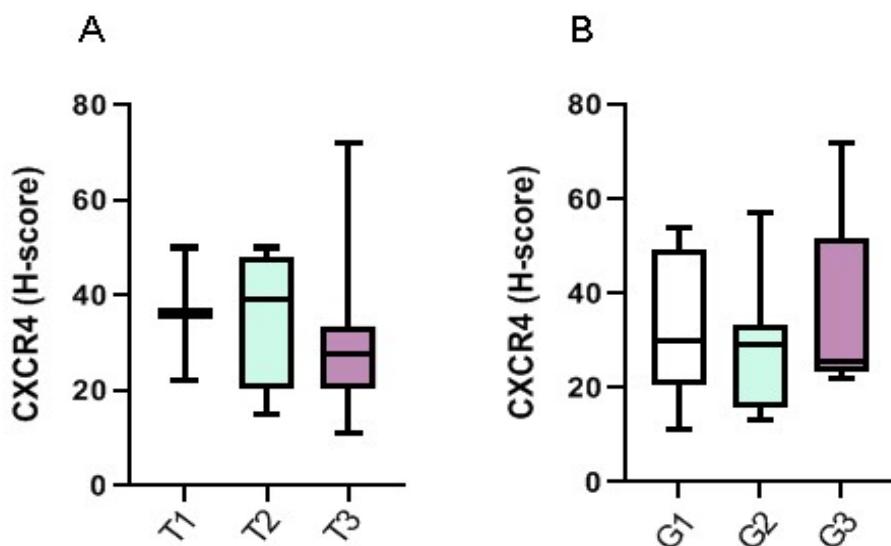


Figura 8. Expresión de CXCR4 en tumores y relación con el tamaño (A) y grado de diferenciación tumoral (B). Datos expresados como H-score de CXCR4 (media±e.e.).

Para confirmar los resultados con una técnica diferente, se analizó el nivel de expresión de ARN mensajero de CXCR4 mediante PCR cuantitativa en 350 biopsias, pertenecientes a una serie independiente de pacientes obtenida del proyecto *The Cancer Genome Atlas*: 171 muestras fueron de tejido pancreático normal y 179 fueron biopsias de tejido tumoral de ACDP. La expresión de CXCR4 fue significativamente más elevada en las muestras obtenidas de tejido tumoral que en tejido pancreático normal ($p<0.01$) (figura 10 A).

Por otra parte, mediante el uso de árboles de ACR, se estableció un valor umbral (nivel de expresión de CXCR4 < o >19) para separar dos grupos de pacientes en base al nivel de expresión del ARNm de CXCR4 en el tumor respecto a la supervivencia global (SG), que fue el único dato clínico del que pudimos disponer en esta cohorte de pacientes. Treinta y seis pacientes de 179 (20,1%) presentaron tumores con una expresión baja o nula de CXCR4 mientras que 140 (79,9%) presentaron tumores con expresión elevada.

El análisis de la curva de supervivencia mostró que los pacientes con niveles elevados de CXCR4 presentaron significativamente una menor SG que los pacientes cuyos niveles de expresión fueron bajos o nulos ($p= 0,018$) (figura 10 B).

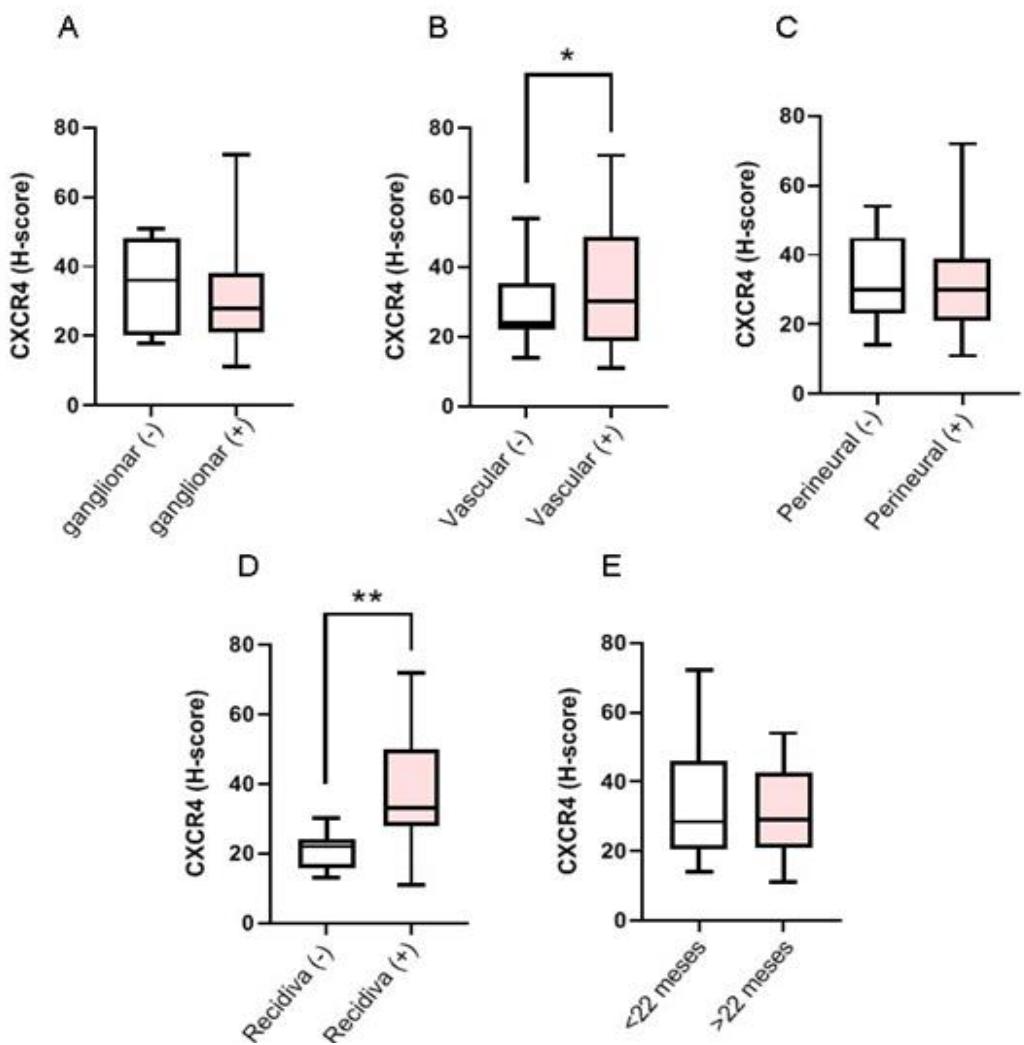


Figura 9. Expresión de CXCR4 en tumores y relación con la afectación ganglionar (A), invasión vascular (B) perineural (C) y recidiva tumoral (D) y supervivencia (E). Datos expresados como H-score de CXCR4 (media±e.e). Diferencia estadísticamente significativa a * p<=0,05 y **p<0,01.

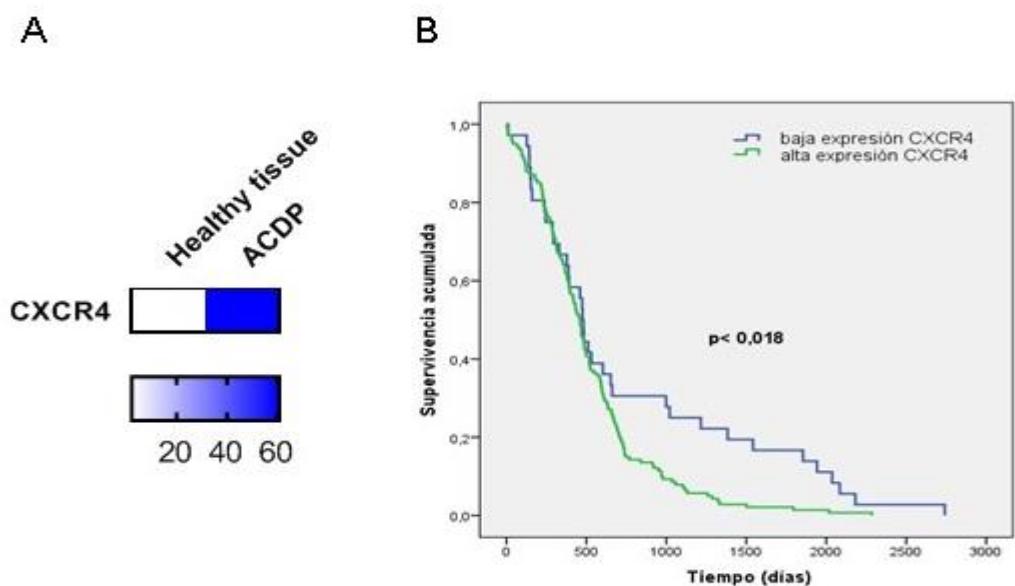


Figura 10. Comparativa de los niveles de expresión de ARNm de CXCR4 en páncreas normal y tejido tumoral y su asociación con supervivencia. A. Páncreas sano versus muestras tumorales ACDP. Los datos se expresan en transcritos por millón (TPM) y fueron obtenidos en TCGA (ACDP: N= 179; Páncreas sano: N=171). B. Curva de supervivencia generada a partir de 179 pacientes afectados por ACDP clasificados en baja o alta expresión de CXCR4 evaluada en muestras tumorales.

2. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA METASTÁSICA EN EL MODELO *IN VIVO* DE ACDP

Las primeras estrategias que utilizamos para generar los modelos altamente metastásicos en cáncer de páncreas, fue la sobreexpresión de CXCR4 en células tumorales pancreáticas derivadas de las líneas PANC-1 y MIA PaCa-2, y el condicionamiento subcutáneo, tal como habíamos descrito previamente para la generación de los modelos metastásicos de cáncer colorrectal.¹³⁰

2.1. Líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y MIA PaCa-2 con expresión dual de luciferasa y CXCR4

Como modelo de cáncer de páncreas utilizamos las líneas tumorales pancreáticas PANC-1 y MIA PaCa-2. Estas líneas celulares fueron transfectadas con un plásmido que contenía nuestra diana, el gen de CXCR4, y el gen de luciferasa, que nos permitía, mediante imagen por bioluminiscencia, realizar el seguimiento de la progresión tumoral *in vivo*.

La expresión de luciferasa en las células fue confirmada por bioluminiscencia, siendo la eficiencia de transfección variable entre ambas líneas tumorales. La señal en la línea celular PANC-1 fue de 1300 fotones/sg/célula versus 850 fotones/sg/célula en la línea celular MIA PaCa-2. Seguidamente, evaluamos en estas mismas líneas la expresión en membrana de CXCR4 mediante citometría de flujo. Observamos que el porcentaje de población celular con expresión de CXCR4 fue mayor (39,7%) en células PANC-1 que en células MIA PaCa-2 (25,3%), consistente con el plásmido utilizado (figura 11 B). Con estos resultados seleccionamos la línea tumoral PANC-1 para llevar a cabo los experimentos *in vivo* de nuestro siguiente objetivo por presentar una mayor expresión de CXCR4 y de luciferasa.

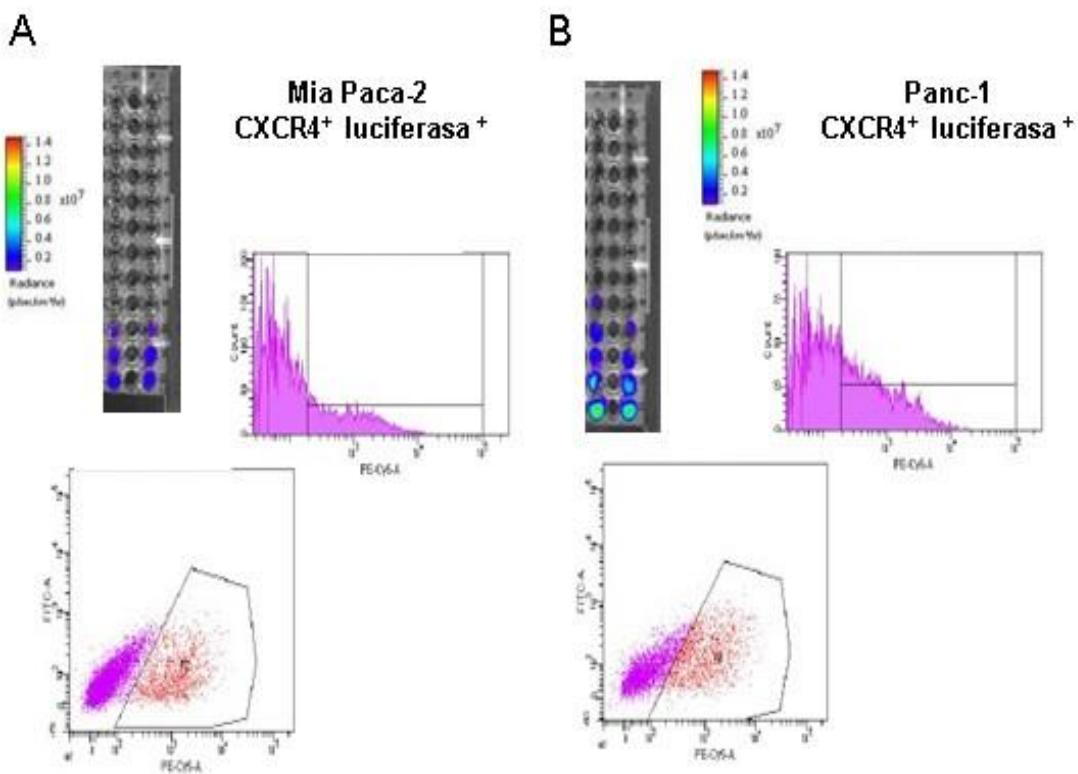


Figura 11. Expresión de luciferasa y CXCR4 en células pancreáticas MIA PaCa-2 y PANC-1. Análisis de la expresión del gen de luciferasa y CXCR4, mediante bioluminiscencia y citometría de flujo, respectivamente.

2.2. Modelos xenógrafos ortotópicos de ratón Swiss nude y NOD-SCID con tumores CXCR4+

Una vez seleccionada la línea tumoral de cáncer de páncreas, las células PANC-1 se inocularon subcutáneamente en los ratones para generar los ratones nodriza. Se registró el crecimiento tumoral y cuando alcanzó el tamaño establecido se extrajo, se fragmentó en alícuotas (10 mg) y se implantó ortotópicamente mediante punto de sutura (SOI, *Surgical Orthotopic Implantation*) en el páncreas de dos cohortes diferentes de ratones inmunodeprimidos ($N=8$). Una cohorte de la cepa de ratones Swiss nude (deficiente en linfocitos T) y otra cohorte de la cepa NOD-SCID (deficiente en linfocitos T y B). Para confirmar la expresión de CXCR4, se realizó una inmunohistoquímica del tumor subcutáneo mostrando que la expresión de CXCR4 se mantenía *in vivo*. Se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia en ambas cepas, observándose que la progresión tumoral fue más rápida y con valores de intensidad de bioluminiscencia significativamente más altos en la cepa NOD-SCID que en Swiss nude

(9,3 10^8 fotones/sg versus 7,6 10^9 fotones/sg a las 3 semanas post-implantación) (figura 12 A y B).

Tras la necropsia de los animales, se realizó un análisis molecular de los tumores para evaluar la expresión de CXCR4 mediante inmunohistoquímica. En ambos tumores se detectó expresión del receptor, con valores de H-score de 109 ± 5 y 114 ± 7 , respectivamente. (Figura 12 C)

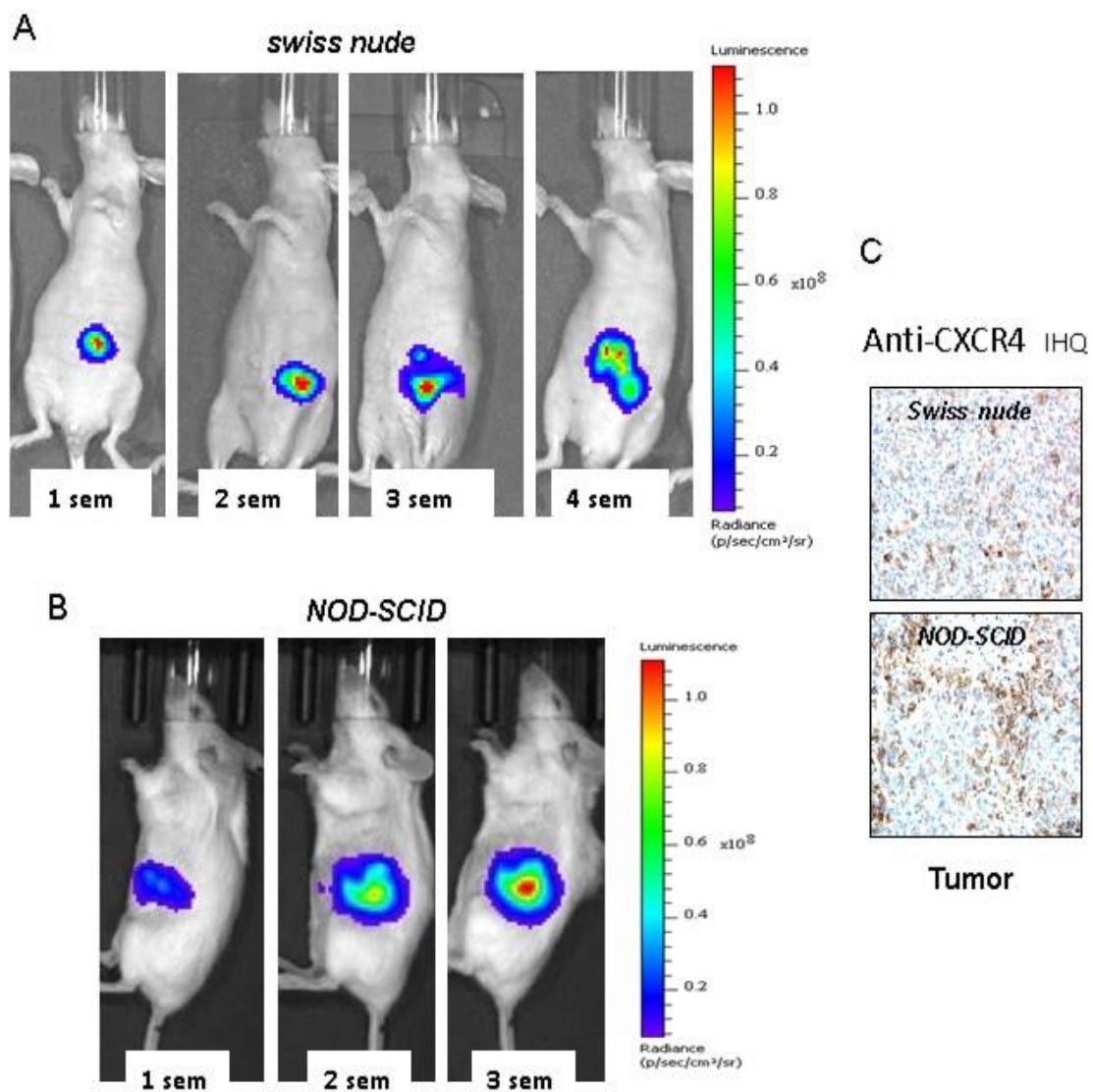


Figura 12. Progresión tumoral de tumor PANC-1 implantado ortotópicamente mediante SOI en ratones Swiss nude (A) y NOD-SCID (B) y expresión de CXCR4 (C).

2.3. Generación de los modelos ortotópicos altamente metastásicos

En la tabla 5 se muestra en detalle, la comparativa de las técnicas quirúrgicas utilizadas, la tasa de injerto y la diseminación metastásica con células PANC-1 CXCR4+ y células M2P derivadas de paciente con alta expresión de CXCR4 (H-score 105±10).

La implantación de células Panc-1 CXCR4+ generó tumor primario y metástasis en ambas cepas de ratones, Swiss *nude* y NOD-SCID, sin embargo el patrón de diseminación y la agresividad incrementó significativamente con la utilización del modelo NOD-SCID, y la estrategia del condicionamiento subcutáneo.

Por otra parte, la utilización de la muestra derivada de paciente M2P con altos niveles de expresión de CXCR4, generó un patrón más agresivo, con un número mayor de metástasis linfáticas y hematógenas (hígado y pulmón) comparado con el modelo PANC-1 CXCR4+ (tabla 5). En ambos modelos, PANC-1 CXCR4+ y M2P CXCR4+, la falta de linfocitos T y B (NOD-SCID) mostró un aumento en la colonización del órgano diana de metástasis y permitió obtener *foci* tumorales linfáticos y peritoneales de mayor tamaño (tabla 5 y figura 13B).

El tiempo de supervivencia varió entre 5 a 8 semanas entre los grupos experimentales. El tiempo de supervivencia más corto se observó utilizando el pase previo subcutáneo y la cepa NOD-SCID (45,6±1,2 días), el intermedio usando la cepa Swiss *nude* (54,2±0,5 días) y el tiempo más largo (63,2±2,6 días) utilizando la inyección directa de células Panc-1 CXCR4+. Los animales con tumores M2P tuvieron una supervivencia de 39,2±1,3 días) (figura 13 A).

Tras la necropsia de los animales, se realizó un análisis histopatológico, e inmunohistoquímico. La expresión de CXCR4 se evaluó en las muestras de tumor primario y los focos metastásicos presentando un patrón de tinción de membrana similar en ambos tipos de muestras PANC-1 CXCR4+ y M2P CXCR4+ y confirmando la presencia de la expresión de CXCR4 en los focos tumorales (figura 13 B).

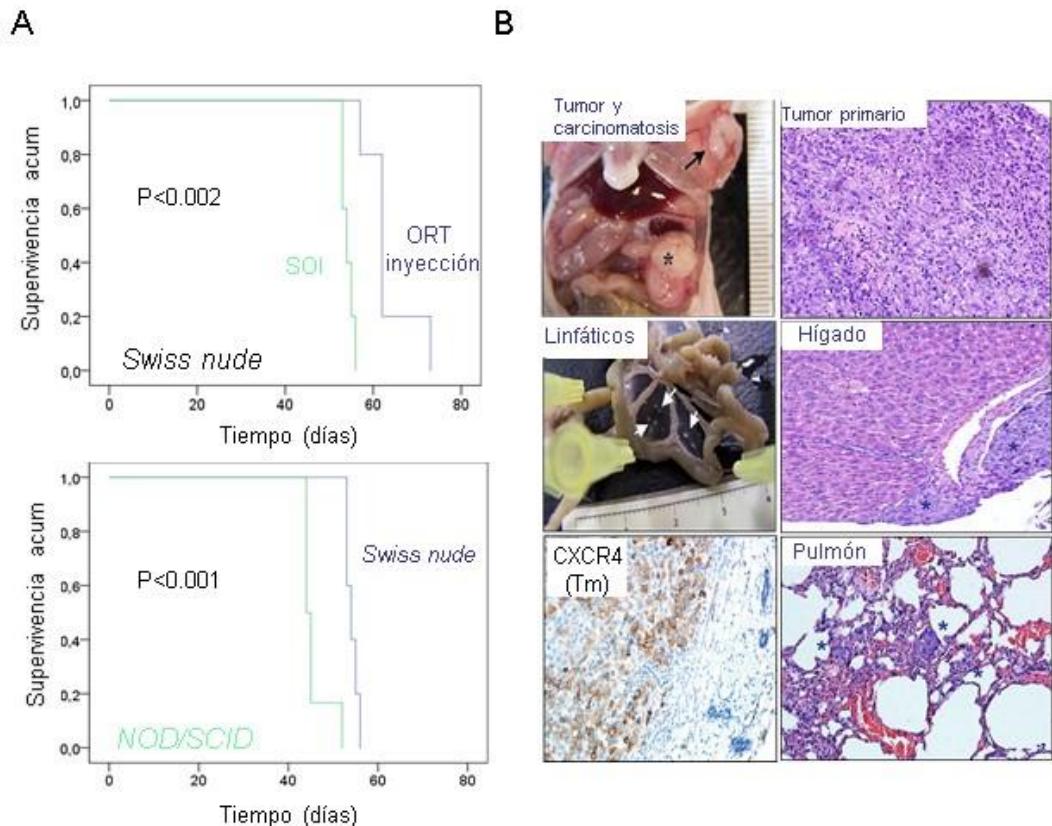


Figura 13. A) Comparación de la supervivencia de ratones *Swiss nude* y *NOD-SCID* y el patrón de metástasis. B) Análisis histopatológico e inmunohistoquímico de tumor primario y focos metastásicos. La supervivencia acumulada se estimó con el método de Kaplan-Meier y se aplicó el test de Log-Rank.

Tabla 5. Análisis histopatológico de los ratones Swiss nude y NOD-SCID.

Evaluación de la tasa y porcentaje de la tasa de injerto y patrón de metástasis generado por las líneas celulares PANC-1 CXCR4+ y en "M2". Datos expresados como [na/nt (%)]: [número de ratones afectados en el grupo/número de ratones positivos totales en el grupo (porcentaje de ratones afectados)]. Metástasis cuantificadas en número de foci y tamaño expresado como media ± e.e.

Grupos	Cepa de ratón	Ratón con tumor primario (n, %)	Metástasis (%) [focos, área (μm^2)]			
			Linfático	Hígado	Pulmón	Carcinomatosis peritoneal
Inoculación ortotópica de PANC-1 CXCR4	Swiss nude	5/5 (100%)	(215, 40%) [2, 24109 ± 3042]	(0/5, 0%) 0	(0/5, 0%) 0	(1/5, 20%) [2, 326174 ± 125900]
Implantación tisular subcutánea y ortotópica de PANC-1 CXCR4	Swiss nude	5/5 (100%)	(315, 60%) [3, 26523 ± 2784]a	(115, 20%) [1, 3571]	40% [11, 10345 ± 4067]	60% [10, 367327 ± 94560]
Implantación tisular subcutánea y ortotópica de PANC-1 CXCR4	NOD/SCID	5/5 (100%)	(5/5, 100%) [11, 50967 ± 4160]a	(4/5, 80%) [6, 2960 ± 1114]	(5/5, 100%) [24, 14621 ± 5670]	100% [18, 697531 ± 104391]c
Implantación tisular subcutánea y ortotópica de "M2"	NOD/SCID	10/10 (100%)	(10/10, 100%) [28, 76981 ± 6040]	(8/10, 80%) [9, 6742 ± 1038]	(9/10, 90%) [72, 15342 ± 3850]	(10/10, 100%) [25, 727399 ± 150300]

3. ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA MEMBRANA CEB-01 CARGADA CON SN-38 EN ACDP

Para llevar a cabo la evaluación de la eficacia terapéutica en cáncer de páncreas de CEB-01 portador de SN-38, un metabolito activo del Irinotecán (CEB01-SN38), realizamos dos experimentos: en el primero utilizamos el modelo xenógrafo subcutáneo derivado de la línea tumoral humana MIA PaCa-2 y estudiamos la actividad antitumoral en monoterapia y en combinación con la quimioterapia clásica. En un segundo experimento evaluamos el efecto antitumoral y antimetástásico en el modelo xenógrafo ortotópico derivado de la línea tumoral humana PANC-1, puesto a punto en el objetivo anterior.

3.1. Evaluación de la actividad antitumoral de CEB-01-SN38 en monoterapia y en combinación con quimioterapia en el modelo subcutáneo MIA PaCa-2

En este experimento, determinamos por un lado la actividad antitumoral de CEB-01-SN38 en tratamiento único, y por otro su combinación con quimioterapia. Seleccionamos como tratamiento quimioterápico el régimen 5-FU y leucovorina, utilizada comúnmente como *standard of care* en el tratamiento de los cánceres gastrointestinales. Las dosis ensayadas de citotóxico SN-38 fueron de 50 mcg/cm², y de 30mg/kg para 5-FU y 90 mg/kg para leucovorina, lo que permitía mantener niveles no tóxicos en el animal, según los estudios previos (apartado 4.3.1.1.).

La progresión tumoral se monitorizó tres veces por semana mediante la medida del volumen del tumor, y la respuesta a la terapia se estimó como la reducción del volumen tumoral durante el tiempo de tratamiento, que en este experimento fue de dos semanas.

El tratamiento único con membranas CEB-01 a dosis de SN-38 de 50 mcg/cm² indujo una reducción del crecimiento tumoral del 45%, alcanzando significación estadística los días 9 y 10 post-tratamiento, y manteniéndose hasta el final del experimento.

Además, la combinación de las membranas CEB-01-SN38 a dosis de 50 mcg/cm² con el régimen quimioterápico 5-FU y leucovorina redujo significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento tumoral manteniéndose a partir del día 10 de administración y hasta el final del tratamiento, comparado con los grupos control (sham), control y quimioterapia,

vehículo (membrana sin carga, CEB-01 a 0 mcg/cm²) o vehículo y quimioterapia (figura 14).

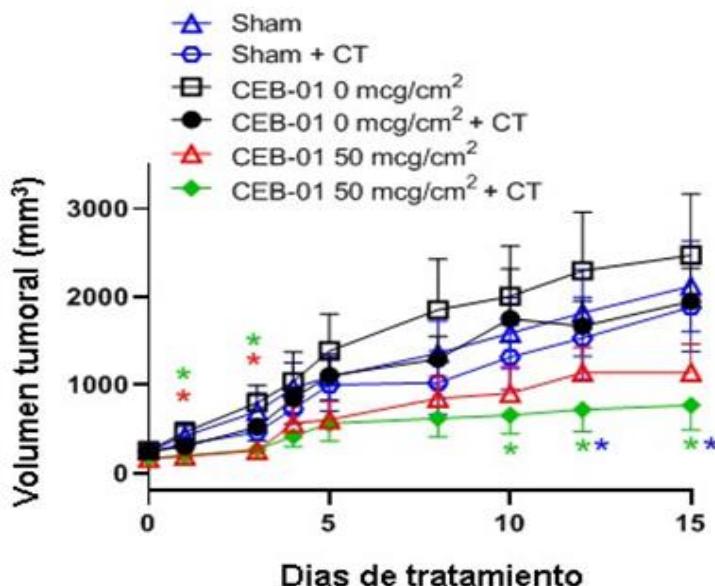


Figura 14. Efectividad terapéutica de CEB-SN-38 en combinación con quimioterapia. Estudio del efecto antitumoral de CEB-01 cargada con SN-38 a dosis de 50 mcg/cm² en tratamiento único o en combinación con 5-FU (30mg/kg) y leucovorina (90 mg/kg) en xenógrafos subcutáneos de MIA PaCa-2. Datos expresados como la media ± e.e. Diferencias estadísticas a p < 0.05 para CEB-01 50 mcg/cm²+ quimioterapia [CT] (símbolo verde) o CEB-01 50 mcg/ cm² (símbolo rojo) versus grupo tratado con vehículo ± CT (símbolo negro) versus grupo sham (símbolo azul).

Después de dos semanas de tratamiento, sacrificamos a los animales y extrajimos los tumores, que se midieron y pesaron. Los resultados confirmaron una reducción significativa (p<0.01) del volumen y peso tumoral comparado con el grupo control y el grupo vehículo (figura 15) utilizando el tratamiento combinado CEB-01-SN38 y quimioterapia (30 mg/kg 5-FU y 90 mg/kg leucovorina). Por otra parte, el grupo tratado con CEB-01-SN38 en monoterapia también mostró una reducción del volumen y peso tumoral comparado con los grupos control y vehículo, pero no alcanzó la significación estadística. En la figura 16 se muestran las imágenes de tres tumores representativos de cada grupo.

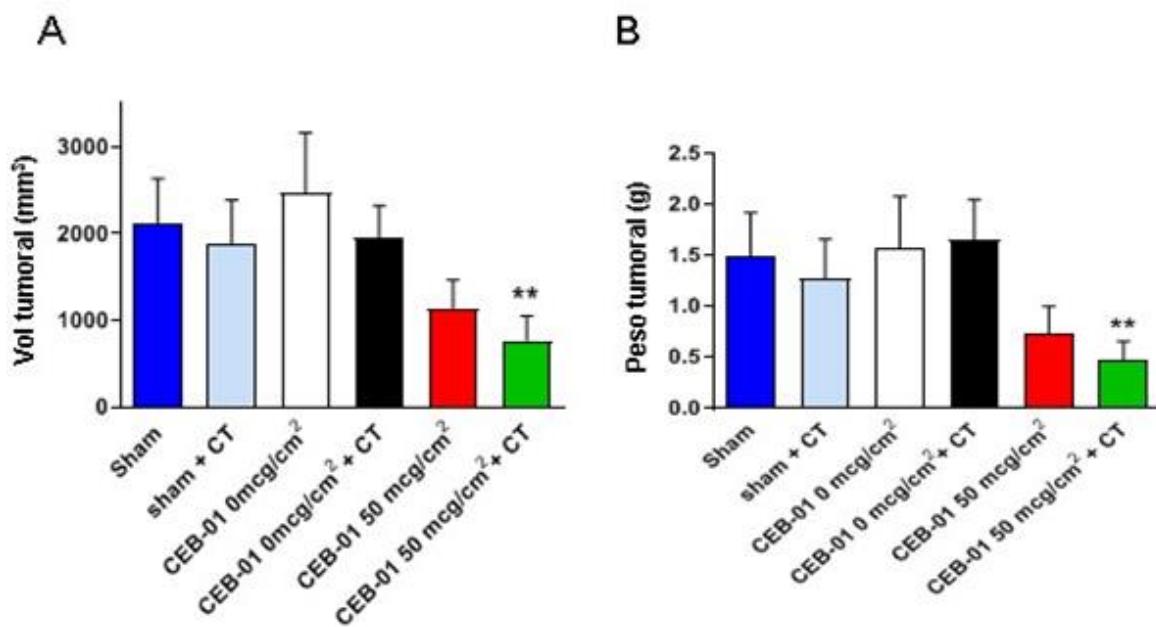


Figura 15. Análisis del volumen y peso tumoral final tras el tratamiento con CEB-01-SN38 en combinación con quimioterapia. Reducción del volumen (A) y peso (B) tumoral a las dos semanas de tratamiento con CEB-01-SN38 a la dosis de 50 mcg/cm² en tumores subcutáneos MIA PaCa-2. Diferencias estadísticamente significativas a p< 0.01 para 50 mcg/cm² + CT versus el resto de grupos. Datos expresados como la media ± e.e.

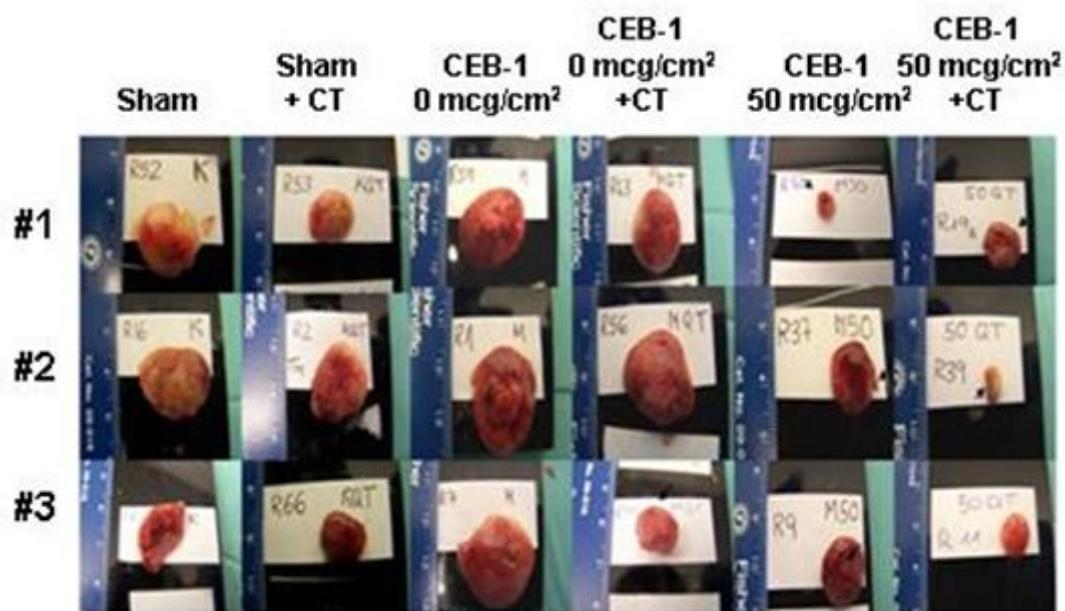


Figura 16. Macrofotografías representativas del tratamiento con CEB-SN38 en combinación con quimioterapia. Imágenes macroscópicas representativas de los tumores subcutáneos derivados de la línea pancreática humana MIA PaCa-2, tomadas durante la necropsia, al final de los tratamientos con CEB-01 en monoterapia o su combinación con 5-FU (30mg/kg) y leucovorina (90 mg/kg).

3.1.1. Estudio de la seguridad y tolerabilidad de CEB-01 cargada con SN-38

La toxicidad de los tratamientos se evaluó mediante el seguimiento del peso corporal de los animales tres veces por semana a lo largo del experimento. El peso corporal en los ratones tratados con CEB-01 a una dosis de 50 mcg/cm², o los tratados en combinación con quimioterapia no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación a los grupos control o vehículo (figura 17). Por otra parte, ambos tratamientos no indujeron ningún síntoma patológico observable, ni de aspecto, estado de salud o comportamiento, en ningún animal del estudio.

En la necropsia, se trajeron en bloque los principales órganos (cerebro, riñón, hígado, pulmón, páncreas, bazo y corazón) para su posterior evaluación histopatológica. Los órganos se pesaron y los datos se muestran en la Tabla 6.

En ningún grupo y en ninguno de los órganos se observaron diferencias significativas en peso entre el grupo control y vehículo, y los grupos tratados con CEB-01-SN38 y/o quimioterapia (tabla 6). El análisis histopatológico de las muestras obtenidas para cada órgano se realizó en preparaciones teñidas con HE, no encontrándose alteraciones patológicas en ningún grupo, y con ningún tratamiento, confirmando la tolerabilidad y seguridad de CEB-01-SN38, tanto en monoterapia como su uso en combinación con el régimen 5-FU y leucovorina.

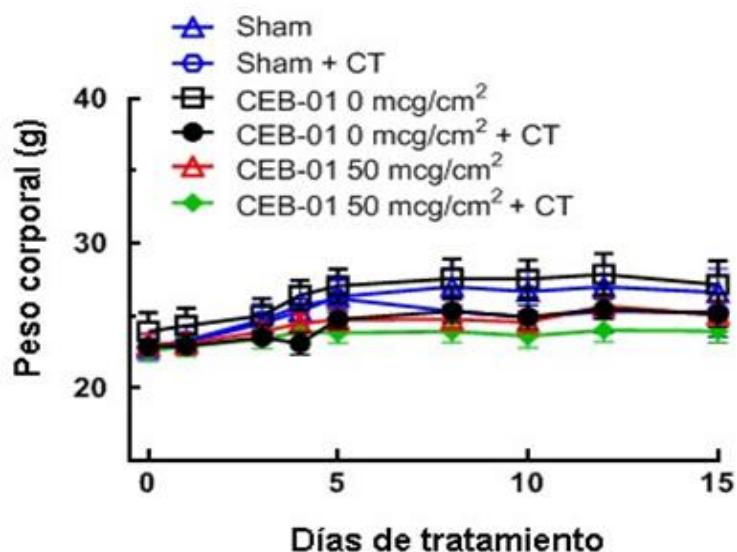


Figura 17. Evaluación del peso corporal tras tratamiento con CEB-SN-38 en combinación con quimioterapia. Efecto sobre el peso corporal de los animales portadores de tumores subcutáneos MIA PaCa-2 tras el tratamiento único con CEB-01 y la liberación de SN-38 a dosis de 50 mcg/cm² como en combinación con quimioterapia (5-FU, 30mg/kg y leucovorina, 90 mg/kg). Datos expresados como la media ± e.e.

Tabla 6. Peso de los órganos (g; media ± e.e) de los diferentes grupos de estudio.

Órgano	Sham	Vehículo	CEB-01 50mcg/cm2
Corazón	0,12 ±0,00	0,13 ±0,01	0,11 ±0,01
Bazo	0,25 ±0,06	0,25 ±0,04	0,23 ±0,03
Páncreas	0,16 ±0,01	0,14 ±0,01	0,16 ±0,01
Pulmones	0,23 ±0,06	0,22 ±0,04	0,17 ±0,01
Hígado	1,42 ±0,11	1,47 ±0,07	1,38 ±0,04
Riñones	0,34 ±0,02	0,34 ±0,02	0,31 ±0,01
Cerebro	0,42 ±0,02	0,45 ±0,01	0,44 ±0,01

Órgano	Sham + CT	Vehículo + CT	CEB-01 50mcg/cm2+ CT
Corazón	0,13 ±0,02	0,13 ±0,01	0,12 ±0,01
Bazo	0,19 ±0,07	0,24 ±0,03	0,21 ±0,03
Páncreas	0,15 ±0,01	0,14 ±0,01	0,16 ±0,01
Pulmones	0,17 ±0,01	0,18 ±0,01	0,17 ±0,01
Hígado	1,24 ±0,12	1,33 ±0,10	1,31 ±0,06
Riñones	0,25 ±0,04	0,32 ±0,02	0,32 ±0,01
Cerebro	0,41 ±0,02	0,40 ±0,02	0,42 ±0,01

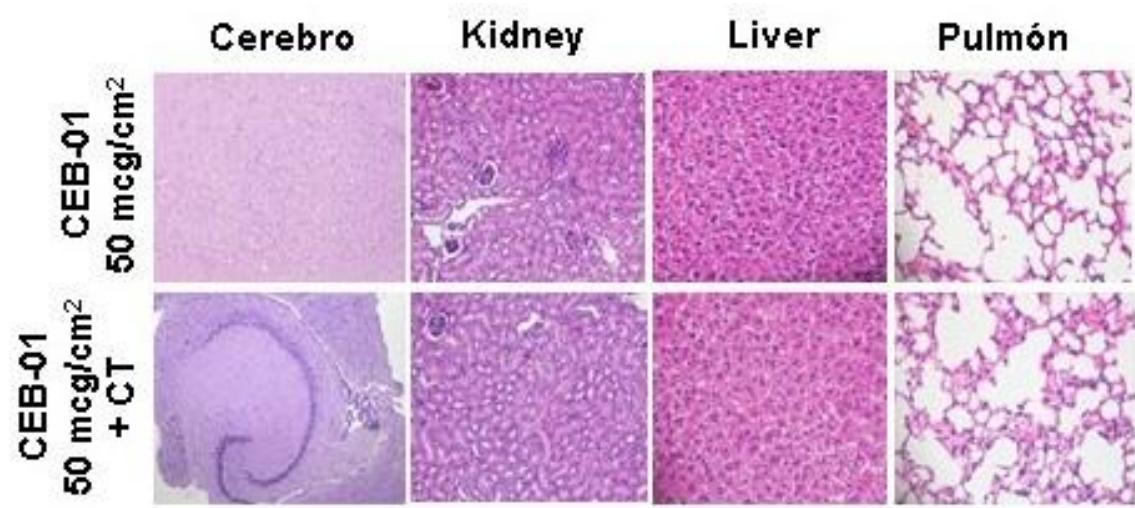


Figura 18. Análisis histopatológico de los órganos más relevantes tras el tratamiento con CEB-01-SN38 y en combinación con quimioterapia.

3.2. Evaluación de la actividad antitumoral y antimetastásica de CEB-01-SN38 en el modelo ortotópico de cáncer de páncreas PANC-1

En el siguiente experimento utilizamos el modelo de cáncer de páncreas ortotópico PANC-1. Para poder monitorizar la progresión tumoral en este modelo, las células PANC-1 fueron transfectadas con el gen de la luciferasa, lo que nos permitió la detección del tumor mediante bioluminiscencia a lo largo de todo el experimento y monitorizar a los animales de forma no invasiva.

Utilizando este modelo ortotópico de cáncer de páncreas metastásico quisimos evaluar la capacidad de la membrana CEB-01 portadora de SN-38 de inhibir la carga tumoral total, reduciendo no sólo el crecimiento tumoral local, sino evaluar también la presencia de carga tumoral metastásica. Además, nos planteamos evaluar dos dosis de tratamiento, implantando membranas que contenían diferente carga de SN-38. Se utilizaron dos dosis distintas, 25 mcg/cm² y 50 mcg/cm² y se monitorizó mediante bioluminiscencia el crecimiento tumoral durante 3 semanas de exposición. La actividad antitumoral se estimó como la reducción de la señal bioluminiscente a lo largo del tratamiento.

Como se observa en figura 19, la implantación de las membranas CEB-01 cargadas con SN-38 a las dosis de 25 mcg/cm² o 50 mcg/cm² frenaron el crecimiento tumoral a nivel local, reduciendo en un 40% significativamente ($p<0.05$) la señal bioluminiscente con respecto a los grupos control (operado) y vehículo (membrana CEB-01 sin carga).

Las imágenes de los registros de bioluminiscencia de los distintos ratones, tomadas antes de la necropsia se muestran en la figura 20. Se observa una clara disminución de la señal bioluminiscente correspondiente a la disminución del crecimiento local del tumor en los animales tratados (25 mcg/cm² y 50 mcg/cm²) respecto a los ratones de los grupos control y vehículo. Sorprendentemente, no hubo diferencias en la actividad antitumoral entre las dos dosis ensayadas, como se muestra en la figura 19.

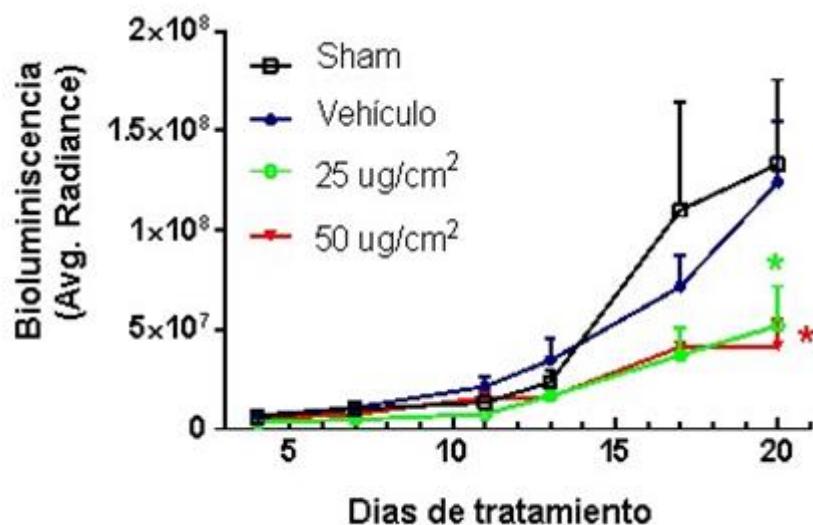


Figura 19. Actividad antitumoral de CEB-01-SN38 en cáncer de páncreas. Respuesta antitumoral del tratamiento con CEB-01 a dosis de 25mcg/cm² o 50 mcg/cm², en xenógrafos portadores de tumores PANC-1, mediante monitorización de la bioluminiscencia a lo largo del experimento (media ± e.e). Diferencias estadísticamente significativa a $p < 0.05$ para 25 mcg/cm² (verde) o 50 mcg/cm² (rojo) versus los grupos control y vehículo.

Por otra parte, en el momento de la necropsia se cuantificó el volumen final y peso de los tumores extraídos en los distintos grupos, de tratamiento y en los controles. El análisis de los tumores al final del tratamiento, confirmó que la implantación de CEB-01 a dosis de 25 mcg/cm² y 50 mcg/cm² indujo una reducción estadísticamente significativa ($p<0.01$) del volumen y peso del tumor con respecto al grupo control (figura 21). Al igual que no observamos diferencias significativas en señal bioluminiscente entre los grupos tratados, pudimos confirmar que tampoco había diferencias en volumen y peso tumoral entre CEB-1 a dosis de 25mcg/cm² o 50mcg/cm².

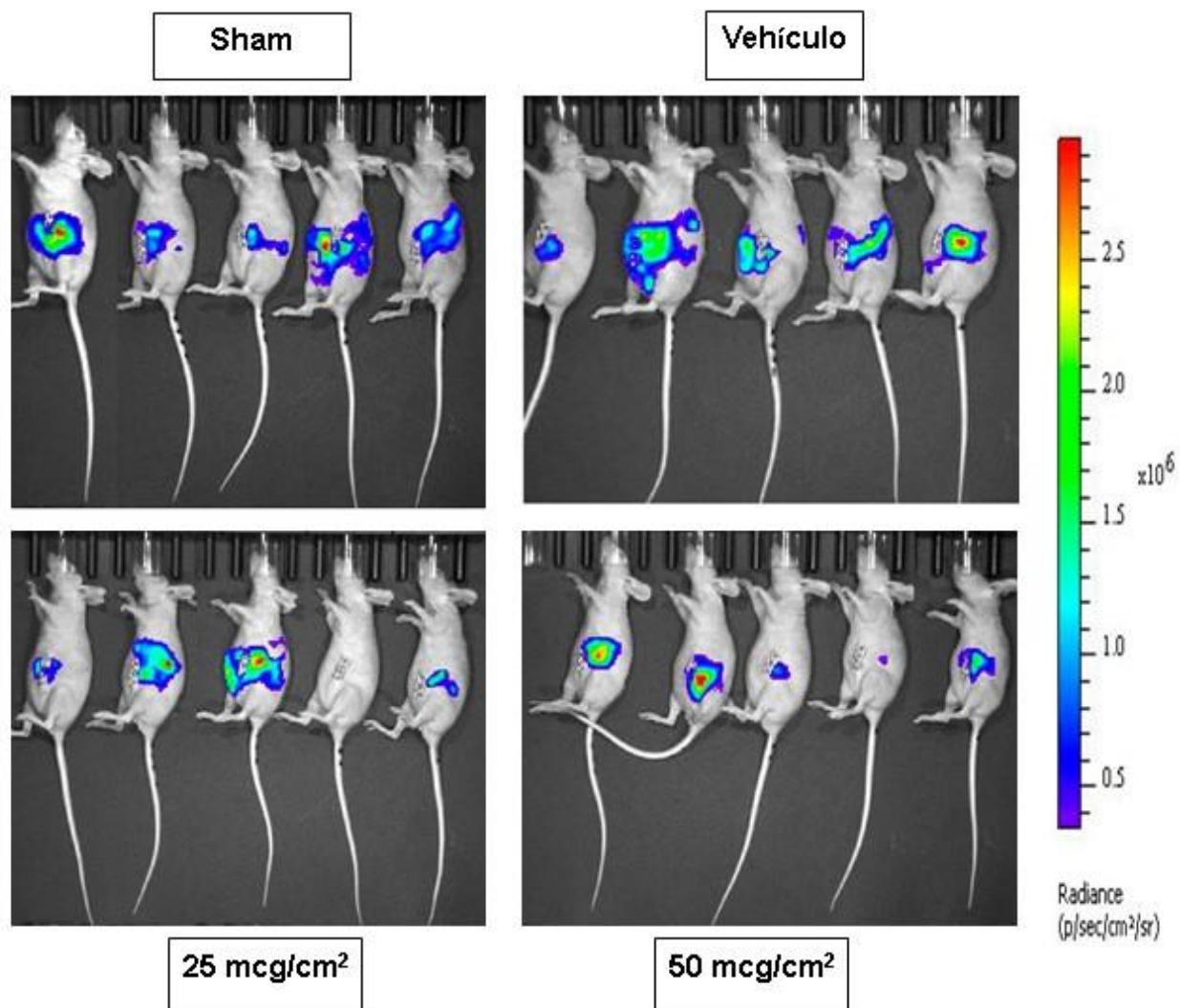


Figura 20. Registro de bioluminiscencia tras tratamiento con CEB-01-SN38. Imágenes de bioluminiscencia correspondientes a los registros realizados a cinco ratones de cada grupo al final del tratamiento con CEB-01 (día 20), a las dosis de 25 mcg/cm² o 50 mcg/cm², y sus respectivos grupos controles (grupo operado, Sham y grupo vehículo, implantado con la membrana CEB-01 sin carga).

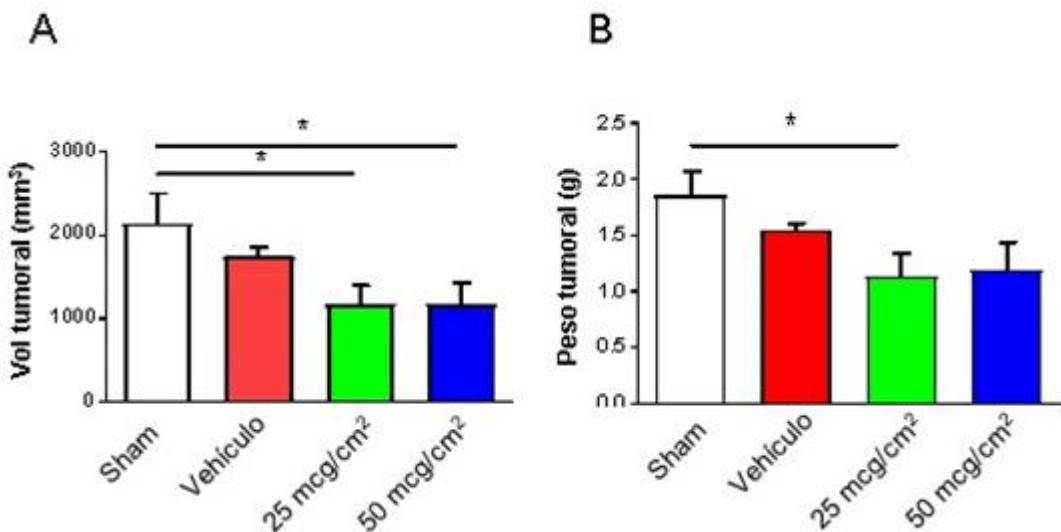


Figura 21. Análisis del volumen y peso tumoral final tras el tratamiento con CEB-01-SN38. Reducción del volumen (A) y peso (B) en los tumores PANC-1 al final del tratamiento con CEB-01 a las dosis de 25 mcg/cm² y 50 mcg/cm² de SN-38. Los datos se expresan como media ± e.e. Diferencias estadísticamente significativas a p< 0.05

3.2.1. Estudio de seguridad y tolerabilidad de CEB-01 cargada con SN-38

La toxicidad del tratamiento con CEB-01-SN38 se evaluó mediante el seguimiento del peso corporal de los animales tres veces por semana a lo largo del experimento. La implantación de CEB-01 no provocó ningún síntoma observable de toxicidad sistémica o intolerabilidad en el ratón, ni cambios en su estado de salud o apariencia, independientemente de la dosis administrada. La evolución del peso corporal durante el experimento no mostró diferencias significativas entre los ratones tratados con CEB-01 a ninguna dosis, 25 mcg/cm² o 50 mcg/cm² comparado con los grupos control o vehículo durante el experimento (figura 22).

Sin embargo, dos de los ratones murieron al día 11 y 26 una vez iniciado el tratamiento. Pertenecían al grupo ensayado con la dosis de 25 mcg/cm² y al grupo vehículo, respectivamente. Estas muertes se relacionaron con consecuencias postquirúrgicas y con el contenido de SN-38 en la membrana implantada, ya que los animales no perdieron peso y el análisis histopatológico confirmó la hemorragia como causa de muerte.

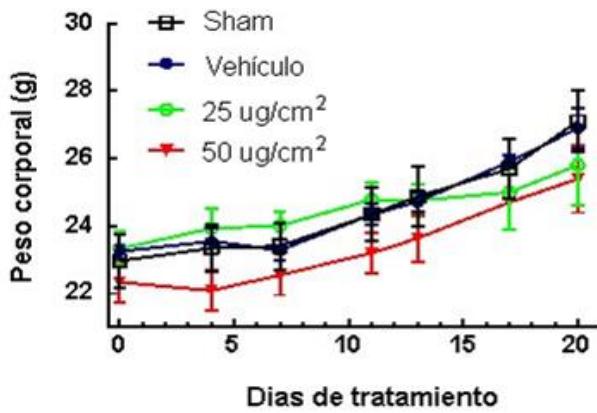


Figura 22. Evaluación del peso corporal tras tratamiento con CEB-01-SN-38. Efecto de CEB-01-SN38 a 25 mcg/cm² y 50 mcg/cm² sobre el peso de los animales versus los grupos control. Los datos se expresan como la media ± e.e.

En la necropsia, se extrajeron en bloque los principales órganos (cerebro, riñón, hígado, pulmón, páncreas, bazo y corazón) para su posterior evaluación histopatológica. En este experimento se evaluó también el intestino, para valorar posibles adherencias de la membrana con los órganos adyacentes y evaluar su tolerabilidad dentro de la cavidad peritoneal. Todos los órganos extraídos se visualizaron macroscópicamente y se pesaron. Los datos se muestran en la tabla 7. En ningún grupo y en ninguno de los órganos se observaron diferencias significativas en cuanto al peso entre los grupos control y los grupos tratados con CEB-01-SN38. El análisis histopatológico de las muestras obtenidas para cada órgano se realizó en preparaciones teñidas con HE, sin encontrarse alteraciones patológicas macroscópicas ni microscópicas en ningún grupo, y con ningún tratamiento, confirmando la tolerabilidad y seguridad de CEB-01-SN38.

Tabla 7. Peso de los órganos (g; media ± e.e) de los diferentes grupos de estudio: control (sham), vehículo y tratamiento con CEB-01-SN38 a dosis de 25 mcg/cm² y 50 mcg/cm².

Órgano	Sham	Vehículo	CEB-01 25mcg/cm ²	CEB-01 50mcg/cm ²
Intestino	3,36 ±0,12	3,65 ±0,19	3,63 ±0,16	2,79 ±0,10
Bazo	0,22 ±0,02	0,22 ±0,02	0,22 ±0,02	0,18 ±0,01
Pulmones	0,32 ±0,02	0,36 ±0,01	0,40 ±0,02	0,34 ±0,02
Hígado	1,44 ±0,08	1,38 ±0,04	1,46 ±0,11	1,36 ±0,10
Riñones	0,34 ±0,02	0,33 ±0,02	0,35 ±0,02	0,32 ±0,01
Cerebro	0,45 ±0,01	0,44 ±0,01	0,44 ±0,01	0,45 ±0,02

3.2.2. Estudio de la capacidad de control de la carga tumoral metastásica

En este segundo experimento utilizamos el modelo xenógrafo ortotópico derivado de la línea tumoral humana PANC-1. Este modelo nos ha permitido evaluar, además, el efecto de la implantación de la membrana CEB-01-SN38 sobre la diseminación tumoral. El análisis de los distintos órganos implicados en las localizaciones metastásicas observadas en clínica en cáncer de páncreas en cada uno de los ratones permitió evaluar el número de ratones afectados y tipo de metástasis. Los resultados se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Tasa de injerto y número de ratones afectados por metástasis linfáticas, hematógenas y peritoneales en los distintos grupos de estudio.

Grupos	N	Tasa de injerto	Metástasis linfáticas	Metástasis hematógenas	Metástasis peritoneales
Sham	8	8/8 (100)	7/8 (87,5) ^a	5/8 (62,5) ^d	8/8 (100) ^{e,f}
Vehículo	7	7/7 (100)	7/7 (100) ^{b,c}	4/7 (57,1)	6/7 (85,7)
25 mcg/cm ²	7	7/7 (100)	3/7(42,8) ^b	1/7 (14,2)	3/7 (42,8) ^e
50 mcg/cm ²	8	7/7 (100)	2/8 (25) ^{a,c}	1/8 (12,5) ^d	3/8 (37,5) ^f

Datos expresados como [na/nt (%)]: [número de ratones afectados en el grupo/número de ratones positivos totales en el grupo (porcentaje de ratones afectados)]. Diferencias estadísticamente significativas (^a p=0,020; ^bp=0,034; ^cp=0,005; ^dp=0,05; ^ep=0,025; ^fp=0,012).

En los grupos en los que se implantó la membrana CEB-01 cargada con SN-38, se produjo un efecto estadísticamente significativo sobre la diseminación tumoral, disminuyendo el número de ratones afectados por las metástasis. En concreto, en el caso de la administración de CEB-01-SN38 a 25 mcg/cm² se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el número de ratones afectados por metástasis linfáticas y peritoneales, siendo estas diferencias significativas para metástasis linfáticas,

hematógenas y peritoneales cuando al administrar la CEB-01-SN38 a una dosis de 50mcg/cm².

En los grupos control y en los que se administró el vehículo sin carga el número de ratones afectados por la diseminación tumoral fue mayor. En concreto se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo control en los tres tipos de metástasis y en el grupo vehículo sólo en la afectación por metástasis linfáticas.

Por tanto, la administración de membranas CEB-01-SN38 a distintas dosis parece tener un efecto significativo en la diseminación tumoral, mostrando un menor número de ratones afectados en relación también con la carga de la membrana administrada.

4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y BIODISTRIBUCIÓN *IN VIVO* DE LA NANOPARTÍCULA T22-GFP-H6 CONJUGADA CON GEMCITABINA

4.1. Citotoxicidad e inducción de muerte *in vitro*

T22-O-GEM es un nanoconjungado generado por la unión covalente de la nanoparticula T22-GFP-H6, 5 ácidos nucleicos y Gemcitabina (figura 23 A). Es detectable por fluorescencia gracias a la proteína GFP que porta la nanopartícula, permitiéndonos estudiar su biodistribución *in vivo*.

Antes de abordar el estudio *in vivo*, estudiamos la capacidad de internalización y la inducción de muerte celular de T22-O-GEM en la línea PANC-1 CXCR4⁺. La citotoxicidad del nanoconjungado se evaluó utilizando el test de viabilidad celular o XTT, que determina la capacidad metabólica celular midiendo el porcentaje de viabilidad celular de células tratadas con la nanopartícula respecto a la viabilidad celular de las células no tratadas.

Las células en cultivo se expusieron a una concentración de T22-O-GEM de 1 uM, a una concentración equimolar de Gemcitabina conjugada con el oligonucleótido (O-GEM) y a 1ug/ul de Gemcitabina libre. T22-O-GEM redujo significativamente ($p<0,05$) la viabilidad de las células PANC-1 CXCR4⁺ en aproximadamente un 50% ($52,3\pm11,5$) respecto al control sin tratamiento y la nanopartícula T22-GFP-H6 control (sin carga de citotóxico). El tratamiento con Gemcitabina libre y O-GEM también redujo significativamente ($p<0,01$) la

viabilidad de las células PANC-1 CXCR4⁺ a las 72h de tratamiento llegando a 25,5±10,2% y un 36,1±13,1%, respectivamente (figura 23 B)

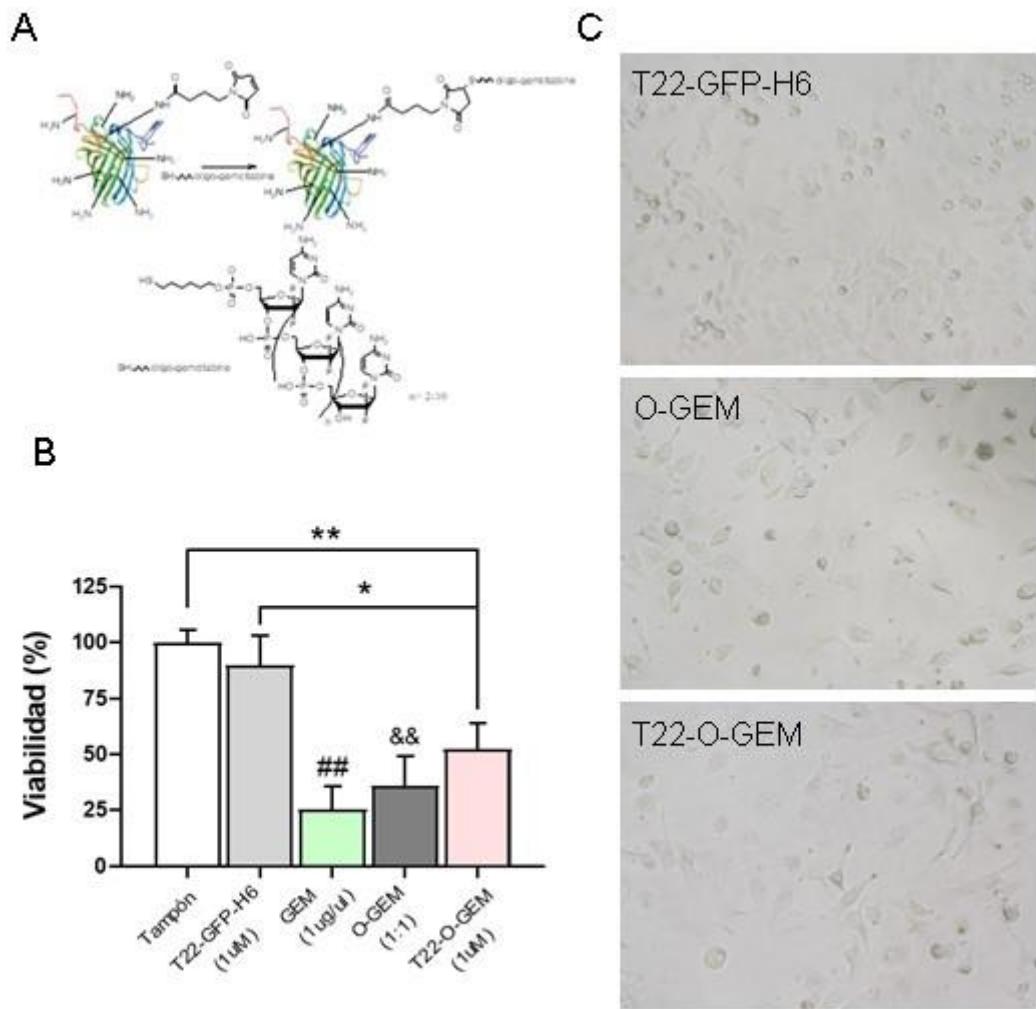


Fig 23. Actividad antitumoral de T22-O-GEM *in vitro* **A)** Esquema del nanoconjugado T22-O-GEM generado a partir de la unión covalente de T22-GFP-H6 y O-gemcitabina. **B)** Reducción de la viabilidad en células PANC-1 CXCR4⁺ tras exposición a 1uM de T22-O-GEM durante 72h. **C)** Microfotografía de células PANC-1 CXCR4⁺ en cultivo expuestas a 1uM de T22-O-GEM durante 72h (400x magnificación).

4.2. Biodistribución *in vivo* de T22-O-Gemcitabina

Una vez estudiada la capacidad de internalización e inducción de muerte *in vitro*, nos planteamos estudiar la biodistribución de T22-O-GEM *in vivo*. Para ello utilizamos el modelo xenógrafo PANC-1 CXCR4⁺ en ratones Swiss *nude* portadores de tumores subcutáneos.

Se administró una única dosis de 100 ug intravenosa de T22-O-GEM y los ratones se sacrificaron a las 5 y 24h post-administración.

Los registros ex-vivo de fluorescencia mostraron acumulación de señal fluorescente en el tumor tratado con T22-O-GEM respecto a los tumores tratados con tampón o los tratados con Gemcitabina libre (O-GEM). Excepto en riñón, que se detectó señal fluorescente a las 24h de la administración, no se detectó señal en los demás órganos evaluados, que fueron el hígado, pulmón, medula osea, bazo, páncreas y cerebro. Los niveles de fluorescencia obtenidos en riñón comprendieron un 10% de la señal fluorescente cuantificada en tumor ($8,2 \times 10^8$ *radiance efficiency*) (figura 24 A).

El análisis histopatológico en los ratones consistió en la observación de cortes histológicos teñidos con HE. No se observó ninguna alteración patológica en ninguno de los tejidos evaluados.

En los tumores se cuantificaron el número de células CXCR4⁺ mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CXCR4. También se evaluó el efecto de Gemcitabina sobre el ADN utilizando el anticuerpo anti-γ-H2AX, que es un marcador de daño al ADN (figura 24 C).

La cuantificación del numero medio de células CXCR4⁺ por 10 campos mostró una reducción significativa ($p<0,01$) en los tumores tratados con T22-O-GEM pero también en los tumores tratados con Gemcitabina libre (figura 24 B)

El tratamiento con Gemcitabina libre y T22-O-GEM indujo un mayor número de celulas γ-H2AX positivas comparado con el tratamiento control, confirmando el daño de Gemcitabina sobre el ADN (figura 24 D).

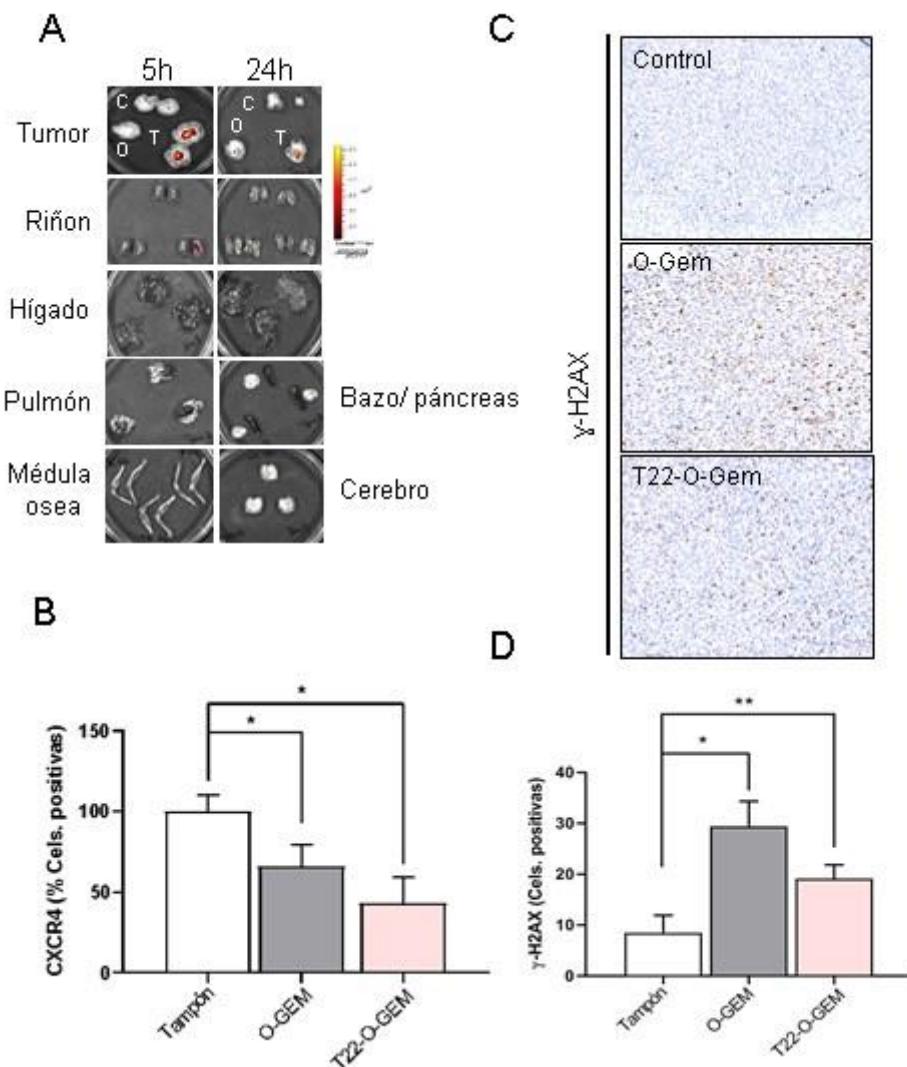


Fig 24. Biodistribución de T22-O-GEM *in vivo* en el modelo PANC-1 CXCR4⁺ de cáncer de páncreas A)
 Registro ex-vivo de la captación de T22-O-GEM a 5 y 24h después de la administración de una dosis de 100 ug de nanopartícula **B)** Reducción del número de células CXCR4⁺ en tumor primario a las 24h de administración de 100 ug de T22-O-GEM **C)** Inmunotinción con el anticuerpo anti- γ -H2AX en tumores PANC-1 CXCR4⁺ a las 24h de la administración de 100ug de T22-O-GEM (100x magnificación). **D)** Cuantificación del número de células positivas γ -H2AX a las 24h de la administración de 100ug de T22-O-GEM en los tumores PANC-1 CXCR4⁺ (100x magnificación). C: control; T: T22-O-GEM; O: O-GEM

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El ACDP presenta una biología tumoral compleja como consecuencia de las diferentes alteraciones genéticas y moleculares y su microambiente tumoral. La dificultad en el diagnóstico temprano y la resistencia a tratamientos quimioterápicos han impedido una mejoría en la supervivencia, por lo que es mandatorio focalizar los esfuerzos en la mejora tanto del diagnóstico como el tratamiento.

En este contexto resulta fundamental la evaluación multidisciplinar de pacientes diagnosticados de ACDP y la cooperación entre grupos de investigación básica y la actividad asistencial clínica. Esta asociación puede permitir unificar esfuerzos a la hora de identificar marcadores pronósticos y posibles dianas terapéuticas individualizadas para llevar a cabo ensayos clínicos, con el objetivo de mejorar los tratamientos e incluso de rescatar un porcentaje significativo de pacientes a los que ofrecer un tratamiento quirúrgico curativo.

El valor de este proyecto radica en la generación de modelos murinos de ACDP con alta eficiencia metastásica para evaluar nuevas e innovadoras formas de tratamiento centradas en la nanobiotecnología y la nanomedicina, una prometedora herramienta que ofrece posibilidades diagnósticas y terapéuticas contra el cáncer y que ha cobrado importancia en la última década. Su desarrollo, futuros experimentos y colaboraciones entre áreas, podrían dar lugar a un conocimiento más exhaustivo sobre la carcinogénesis y biología molecular del ACDP y el desarrollo de nanovehículos cargados con agentes terapéuticos para uso en el tratamiento del ACDP.

1. GENERACIÓN DE MODELOS MURINOS DE ALTA EFICIENCIA METASTÁSICA PARA EVALUAR NUEVAS TERAPIAS EN ACDP

En este proyecto de tesis se han desarrollado modelos murinos de cáncer de páncreas utilizando distintas estrategias para identificar el que presentaba mayor eficiencia metastásica. Fueron desarrollados a partir de ratones inmunodeprimidos de la cepa Swiss nude (Crl:UN(Ico)-Foxn1^{nu}) y NOD-SCID (NOD.CB17-Prkdc^{sc id}/NcrCrl).

Los ratones de la cepa NOD-SCID son extremadamente inmunodeprimidos ya que presentan SCID, que origina una deficiencia de linfocitos T y B. También presentan una mutación en el receptor de IL2 que evita la señalización de citoquinas dando lugar a una

deficiencia en las células NK funcionales. Los ratones de la cepa Swiss nude no presentan timo y su sistema inmune es deficiente debido al número reducido de células T. Son ideales para estudio de tejidos y tumores humanos porque no presentan respuesta de rechazo de tejidos. De las dos cepas, la de NOD-SCID constituye mejores modelos de diseminación de ACDP debido a su inmunodeficiencia, pero impide el estudio del ACDP en términos de respuesta del sistema inmune frente al tumor y por tanto la extrapolación exacta de resultados al ACDP humano.^{53, 59, 61, 73}

El receptor de quimioquinas CXCR4 se ha estudiado ampliamente en distintos tumores y su sobreexpresión se ha relacionado en el ACDP con invasión, migración y diseminación de células tumorales mediante interacción con otras quimioquinas/receptores de quimioquinas. Distintos estudios como los de Ding *et al.*, Zhao *et al.* y Marèchal *et al.* describen que el CXCR4 puede tener un papel importante en la afectación ganglionar, el desarrollo de ACDP de alto grado y la formación de las metástasis, teniendo implicaciones en el pronóstico y supervivencia en esta neoplasia.⁴³⁻⁴⁵

Teniendo en cuenta estas características, se han utilizado líneas celulares tumorales y muestras tumorales de pacientes con sobreexpresión de CXCR4 con la intención de generar modelos murinos de mayor eficiencia metastásica.

También se ha estudiado la expresión de CXCR4 en muestras tumorales de tejido fresco obtenido de pacientes intervenidos de ACDP, biopsias tumorales parafinadas y en una cohorte de pacientes incluida en el proyecto TGCA, con el objetivo de poder relacionar la sobreexpresión de CXCR4 con la recaída y la supervivencia de los pacientes afectos de ACDP y poder generar los modelos PDX.

Los modelos se desarrollaron a partir de ratones nodriza, tras la inoculación subcutánea de las líneas celulares PANC-1 o MIA PaCa-2 transfectadas con el gen de luciferasa y CXCR4, y posterior implantación subcutánea en nuevos animales.

Los modelos xenógrafos subcutáneos forman tumores a nivel subcutáneo y son útiles para el crecimiento de tejido tumoral y generar los modelos de implantación ortotópica, pero éstos no metastatizan y su microentorno no es el fisiológico, ya que no se puede estudiar su crecimiento intrapancreático ni el patrón metastásico, de acuerdo con publicaciones como la de Schutte *et al.*⁶³

Los modelos xenógrafos ortotópicos se han desarrollado a partir de la inyección e implantación ortotópica de fragmentos de tumores de los modelos subcutáneos creados a partir de líneas celulares PANC-1 o MIA PaCa-2 CXCR4+. Bos *et al.*, ha descrito que los

modelos ortotópicos de implantación intrapancreática pueden permitir el estudio de la diseminación tumoral metastásica utilizando técnicas de imagen. En nuestro proyecto se ha realizado la transfección de las líneas tumorales con un plásmido que expresaba luciferasa, permitiendo el seguimiento de las células tumorales *in vivo* y la evaluación no invasiva del crecimiento tumoral, midiendo la intensidad de bioluminiscencia a lo largo del tiempo y en los distintos ratones. De acuerdo a publicaciones como las de Aparicio *et al.*, Cho *et al.*, Jung *et al.* y Walters *et al.*, los modelos xenógrafos ortotópicos derivados de muestras obtenidas en pacientes PDXs (*patient-derived xenografts*) tienen la capacidad de mantener la variabilidad genética observada en los pacientes, las características histopatológicas y el potencial metastásico, por tanto, pueden conservar la misma respuesta a intervenciones terapéuticas evidenciada en el ACDP humano, permitiendo que los resultados obtenidos en estos modelos animales sean más trasladables a la clínica, a diferencia de lo que ocurre con los modelos obtenidos a partir de líneas celulares comerciales. Los modelos generados a partir de líneas celulares cultivadas *in vitro* sólo representan el contenido celular neoplásico tumoral, que en el ACDP supone un 10%, debido a la influencia del componente estromal y las células inmunitarias infiltrantes. La ventaja de los modelos PDXs es que conservan el microambiente estromal, que entre otros componentes contiene parte del componente celular del sistema inmunitario.⁶⁸⁻⁷¹

En nuestro estudio recogimos 19 muestras de pacientes afectos de ACDP y utilizamos la muestra “M2” para el desarrollo de una línea celular tumoral y la creación del modelo xenógrafo subcutáneo y ortotópico.

Con el objetivo de hacer un breve estudio descriptivo de la asociación entre la expresión de CXCR4 y las características clínico-patológicas de pacientes con ACDP, recogimos datos de 3 cohortes de pacientes (una prospectiva, una retrospectiva y otra de pacientes incluidos en el proyecto TCGA). Observamos que el valor de CXCR4 fue significativamente más alto en pacientes con invasión vascular y recidiva tumoral, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas en el resto de variables analizadas.

Aunque estos datos confirman en parte lo descrito en la literatura por otros autores con un número de pacientes mayor, nos han servido para seleccionar aquellas muestras con alta expresión de CXCR4 para generar los modelos xenógrafos. Serían necesarias más muestras tumorales y datos clínicos para establecer conclusiones definitivas.

Algunas publicaciones como la de Ding *et al.* y Sleightholm *et al.* postulan que la interacción entre CXCR4 y CXCL12 puede jugar un papel importante en la reacción

desmoplásica del estroma tumoral del ACDP, induciendo migración de células neoplásicas vía CXCR4, contribuyendo, por tanto, al desarrollo de metástasis.^{43, 131}

En nuestro estudio, los modelos xenógrafos subcutáneos y ortotópicos de las líneas celulares PANC-1 transfectadas con el gen CXCR4 y los modelos xenógrafos derivados de la muestra de paciente “M2”, implantados en las cepas NOD-SCID, presentaron un mayor número de ratones afectados por la diseminación tumoral y un número mayor de focos metastásicos. Por tanto, podemos concluir que la implantación de células tumorales con niveles altos de CXCR4 aumenta la diseminación tumoral, y que la implantación ortotópica quirúrgica de biopsias humanas con sobreexpresión de CXCR4 presenta también un nivel de diseminación metastásica elevado, siendo un modelo más predictivo de ACDP humano para la evaluación preclínica de compuestos antitumorales.

2. EVALUACIÓN DE AGENTES ANTITUMORALES EN LOS MODELOS MURINOS DE ACDP

La administración de quimioterapia sistémica en la mayoría de los tumores implica una alta dosificación para alcanzar las células tumorales. En el caso concreto del ACDP, estudios como el de *Zhou et al*, *Delitto et al* y *Zhang et al*. describen que características como el elevado componente estromal, la reacción fibroblástica, la disminución de la microvascularización, la generación de hipoxia en el microambiente tumoral y el papel del sistema inmunológico han contribuido a la resistencia frente a los tratamientos quimioterápicos, siendo el caso más estudiado el de la Gemcitabina.^{35, 67, 113} La alta dosificación utilizada tiene consecuencias adversas frente a los tejidos normales, y sumada a la quimiorresistencia, ha limitado la utilización de ciertos quimioterápicos frente al ACDP y consecuentemente, la supervivencia de esta patología tras el tratamiento adyuvante o en casos irresecables. Actualmente existen numerosas publicaciones experimentales sobre terapias en el ACDP dirigidas al bloqueo o activación de vías de señalización molecular, la reparación del ADN, el sistema inmunológico, frente al microambiente tumoral, las células cancerígenas o vías de señalización metabólicas, algunas de ellas nombradas en la revisión de *Zhang et al*.¹¹³ Pero además del desarrollo de estas terapias, en los últimos 10 años ha cobrado importancia la nanobiotecnología dando lugar a la nanomedicina, como nueva herramienta cuya finalidad es la entrega dirigida de quimioterápicos a células diana. En este contexto, se han publicado distintas terapias en fase experimental para el tratamiento del ACDP en combinación con

tratamientos convencionales e inmunoterapia. Artículos como los de *Desai et al*, *El-Zahaby et al*, *Su et al*, *Li et al*, y *Samanta et al*. describen nanoterapias emergentes en el tratamiento del ACDP.^{114, 115, 118-120}

A partir de los nanomateriales se han creado vehículos transportadores de fármacos que constituyen sistemas de entrega dirigida de tratamientos. Muchos de ellos tienen importantes efectos secundarios y no son degradables, por lo que se han diseñado nanopartículas de recombinación proteica sintéticas y nanofibras que consiguen la liberación inteligente y dirigida de tratamientos, evitando efectos adversos en células no tumorales.^{115, 119, 120}

2.1. Eficacia terapéutica de la membrana CEB-01 en modelos murinos de ACDP

Uno de los nanomateriales estudiado en este proyecto de tesis son las membranas CEB-01, con capacidad de liberación local del agente terapéutico y situadas directamente en la superficie tumoral. Están constituidas por la polimerización ácido poliláctico co-glicólico (PLGA), formando nanofibras. Las nanopartículas poliméricas son los nanomateriales más utilizados en oncología, y presentan ventajas importantes respecto a otros materiales también muy utilizados, como son los liposomas. Estos polímeros permiten la conjugación química de la droga en su superficie aumentando su disponibilidad, pero la desventaja es que pueden presentar toxicidad y efectos no deseados. EL PLGA es el copolímero biodegradable más común y está aprobado como material biocompatible, aunque existe cierta limitación clínica para su uso debido a que se acumula en un 40% en el hígado.

En este proyecto de tesis se han utilizado las membranas CEB-01 cargadas con SN-38 como tratamiento único o en combinación con el quimioterápico 5-FU y leucovorina en modelos murinos subcutáneos MIA PaCa-2 y en modelos murinos ortotópicos PANC-1. Estas membranas permiten la liberación lenta y local de los metabolitos activos. La carga de las membranas CEB-01, el SN-38 consiste en una formulación del metabolito activo del Irinotecán (CPT11), que es un inhibidor de la topoisomerasa I, la cual se une reversiblemente al ADN de la topoisomerasa I e induce lesión en una sola cadena del ADN bloqueando la horquilla de replicación. En esta formulación, el metabolito activo del Irinotecán está contenido en una vesícula esférica lipídica (liposoma) pegilada, con una actividad mil veces mayor que el Irinotecán y menos efectos adversos, utilizado en el

ACDP metastásico. El Irinotecán liposomal (nombre comercial Onyvide®) es el primer agente específicamente aprobado para el tratamiento de ACDP metastásico que ha progresado tras un terapia basada en la combinación de Gemcitabina con 5-FU/leucovorina.¹³²

El primer experimento estudió la eficacia de las membranas CEB-01 cargadas con SN-38 en tratamiento único o en combinación con el quimioterápico 5-FU y leucovorina, en el modelo subcutáneo MIA PaCa-2 de ACDP. Tanto en monoterapia como combinado mostró una reducción significativa del crecimiento tumoral.

El segundo experimento evaluó la respuesta antitumoral, por reducción de la bioluminiscencia, de la nanofibra CEB-01 cargada con SN-38 en modelos murinos ortotópicos en células PANC-1 de cáncer de páncreas. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la señal bioluminiscente, que se correlaciona con la reducción del crecimiento local tumoral. Esta reducción se confirmó mediante la cuantificación del peso y volumen tumoral final tras la necropsia.

También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de ratones con metástasis linfáticas, hematógenas y peritoneales en los grupos en los que no se administró la membrana CEB-01-SN38.

En base a estos dos experimentos utilizando la nanofibra CEB-01 cargada con SN-38 en tratamiento único o en combinación con quimioterapia podemos concluir que su utilización tiene un efecto local y que al controlar el crecimiento del tumor contribuye a un efecto antitumoral y antimetastásico, al controlar también la diseminación metastásica.

En relación a la utilización de nanomateriales para la entrega local de tratamientos, algunos estudios como Céspedes *et al.* han publicado resultados sobre los cuerpos de inclusión bacteriana (*Bacterial Inclusion Bodies* [IBS]), que son nanoestructuras amiloideas no tóxicas que permiten la entrega de agentes terapéuticos. Han descrito que la inyección intratumoral y subcutánea de IBS formadas por elementos liberables que contienen un ligando potente de CXCR4 (T22) produce durabilidad del material, acción local y apoptosis en células tumorales CXCR4+, sin toxicidad aparente.¹³³

En ACDP, algunos procedimientos mediados por nanopartículas de acción local, han mostrado una localización tumoral selectiva y un aumento de efectividad, como las nanopartículas utilizadas para un diagnóstico y tratamiento simultáneo (por ejemplo nanoembolización transarterial, ablación por radiofrecuencia o la electroporación irreversible y nanoelectroablación) como se muestra en el artículo de Li *et al.*¹³⁴

Actualmente están en investigación nanopartículas poliméricas que permiten la entrega de tratamiento quimioterápico a altas dosis de manera local y por un tiempo determinado, permitiendo superar la quimiorresistencia y actuar sobre un tumor localmente avanzado, como describe *Ji et al.*¹³⁵ En el caso del ACDP, el tratamiento local todavía está en desarrollo, pero estudios como el de *Brachi et al.* lo describen como una herramienta prometedora ya que podría evitar la protección del estroma y superar la hipoperfusión, reduciendo efectos adversos al actuar de manera local.¹³⁶ *Adiseshaiyah et al.* refieren resultados prometedores respecto al tratamiento local del ACDP con un implante polimérico denominado siG12D-LODER para la entrega de liposomas terapéuticos con siRNA encapsulado dirigido frente a KRAS, todavía en fase experimental.¹³⁷⁻¹⁴¹

En este sentido, parece que el tratamiento local podría mejorar la efectividad antitumoral al aumentar la dosificación de manera dirigida a las células tumorales, en nanomateriales duraderos y con una liberación controlada, sin aumentar la toxicidad de tejidos sanos.

2.2. Efecto de la terapia dirigida con T22-O-GEM *in vitro* y su biodistribución en animales

La Gemcitabina es un antimetabolito que presenta una vida media corta en plasma debido a la acción de la enzima citidina deaminasa, por lo que para que su tratamiento sea efectivo debe administrarse a dosis altas, produciendo toxicidad. Además, debido a su naturaleza hidrofílica atraviesa las membranas a través de transportadores de nucleósidos, lo que confiere resistencia a tratamiento. Por ello, se han desarrollado macromoléculas y nanovehículos para su protección y liberación controlada. Esto ha mejorado la biodisponibilidad de Gemcitabina, aumentando la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos adversos.

Actualmente, se están evaluando diferentes tipos de nanovehículos de entrega de Gemcitabina, pero muchas carecen de direccionamiento, o las que lo presentan no han generado los resultados esperables.

Nanopartículas como la descrita en esta tesis, T22-O-GEM, presentan dominios que permiten el direccionamiento hacia receptores diana o cualquier otro dominio funcional encargado de la penetración o localización celular (en este caso, el receptor CXCR4).

Como fue comentado previamente, CXCR4 está ampliamente detectado en múltiples tumores y entre ellos en ACDP. Aunque la correlación entre la expresión de CXCR4 en

ACDP y sus características clínico-patológicas no son concluyentes, metaanálisis como el publicado por *Ding et al.* en 2019 afirman que la sobreexpresión de CXCR4 fue mayor en muestras de ACDP que en tejido normal y que es un factor de riesgo valorable para este tumor, así como un marcador pronóstico fuerte correlacionado con el riesgo de afectación ganglionar y metástasis.⁴³

En el ACDP la señalización por quimioquinas es vital en el desarrollo del microambiente tumoral y la señalización entre células tumorales y el componente celular del estroma, y el CXCR4 juega un papel importante en el desarrollo y progresión del ACDP. La interacción de CXCR4 y CXCL12 promueve el desarrollo del cáncer de páncreas, invasión y metástasis a través de cambios en el microambiente tumoral mediante un complejo sistema de comunicación con otras vías de señalización. Según estudios como el de *Sleightholm et al.* el CXCR4 parece contribuir al pronóstico pobre observado en pacientes con ACDP.¹³¹

Teniendo en cuenta la influencia de la señalización de CXCR4 en el ACDP, el estudio reciente de combinación de distintas terapias con antagonistas CXCR4 parece ser efectivo en el tratamiento del tumor primario y metástasis en ACDP.¹³¹

Xie et al. describe una nanopartícula polimérica de colesterol modificada, antagonista de CXCR4, que bloquea interacciones entre tumor y estroma, y que permite la entrega dirigida de anti-miR-210 (para inactivar PSCs producidas por el estroma) y siKRAS^{G12D} (para eliminar células tumorales pancreáticas). Esta nanopartícula fue testada en modelos murinos ortotópicos de ACDP. Según este estudio, la acción combinada de esta nanopartícula produce una disminución del crecimiento tumoral, depleción del estroma, reducción de la inmunosupresión, inhibición de metástasis y prolongación de la supervivencia.¹⁴²

En otro estudio, *Biasci et al.* describen que la inhibición de CXCR4 en combinación con el bloqueo de PD-1/PD-L1 en células T induce infiltración de linfocitos T y respuesta anticancerígena en modelos murinos y en ACDP humano. La inhibición de CXCR4 vía el AMD 3100 (Plerixafor o Mozobil), probado en ensayos clínicos para tumores sólidos gastrointestinales en la actualidad, produce un bloqueo del eje CXCL12-CXCR4/CXCR7 e influye en la supresión de la respuesta inmune tumoral. Se cree, por tanto, que una mayor comprensión del efecto de esta señalización en el microambiente tumoral del ACDP permitirá un tratamiento efectivo en combinación con inmunoterapia.¹⁴³

Otro ejemplo es el COMBAT trial, un ensayo clínico en fase IIa en pacientes con ACDP metastásico refractario, en el que se administró un tratamiento combinado con BL-8040, un antagonista de CXCR4, inmunoterapia con pembrolizumab (anti-PD-1) y quimioterapia con Onivyde® (Irinotecán liposomal pegilado). El bloqueo de CXCR4 promueve infiltración de linfocitos T en el tumor, y su efecto es sinérgico con la terapia anti-PD-1 en modelos murinos de ACDP. En este estudio, los resultados obtenidos en pacientes sugieren que la combinación de antagonistas de CXCR4 y PD-1 puede aumentar el beneficio de la quimioterapia gracias a su efecto sobre el microambiente tumoral.¹⁴⁴

Actualmente existen distintos ensayos clínicos de tratamientos combinados de antagonistas CXCR4 con inmunoterapia y quimioterapia, pero todavía son necesarios datos más consistentes para su aplicación en ACDP humano.

En nuestro estudio evaluamos la nanopartícula T22-O-GEM, dirigida específicamente hacia células tumorales con expresión de CXCR4 con el objetivo de eliminar las células madre tumorales metastásicas, y aumentar la respuesta al quimioterápico Gemcitabina al aumentar la vida media. Comprobamos su capacidad de internalización en células Panc-1 CXCR4+ *in vitro* su biodistribución hacia el tumor *in vivo* y confirmamos el daño sobre el ADN inducido por la liberación de Gemcitabina de la nanopartícula. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos afirmar que la nanopartícula T22-O-GEM podría ser una excelente candidata como potencial agente antitumoral y antimetastásico al presentar direccionamiento hacia células madre metastásicas CXCR4+.

En este aspecto, son necesarios continuar los estudios *in vivo* que permitan finalmente el desarrollo preclínico de la nanopartícula y su aplicación clínica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 se ha asociado con una mayor agresividad y fenotipo metastásico en cáncer de páncreas. La evaluación de la expresión de CXCR4 en una cohorte de 34 pacientes ha mostrado niveles de expresión de CXCR4 altos en aquellos pacientes afectados por invasión vascular o recidiva, confirmando lo descrito en la literatura, aunque no en reducción de la supervivencia. No obstante, sería preciso analizar un mayor número de muestras para obtener conclusiones definitivas en nuestro estudio.
2. CXCR4 está sobreexpresado en células madre metastásicas y es una diana excelente para el direccionamiento de nuevas terapias o incrementar significativamente el beneficio de las terapias actuales en ACDP. La evaluación preclínica de estas nuevas terapias requiere del uso de modelos de enfermedad diseminada más adecuados. El condicionamiento subcutáneo previo a la implantación ortotópica, en ratón inmunodeprimido, de células humanas PANC-1 CXCR4+ y M2P CXCR4+, aumenta el número y tamaño de los focos tumorales, presentando una alta eficiencia metástasica.
3. La implantación de las células tumorales de ACDP en cepas de ratón más inmunodeprimidas, como la cepa NOD-SCID, potencia el desarrollo de las metástasis reduciendo significativamente la supervivencia en los ratones. Los modelos preclínicos con expresión de CXCR4 desarrollados en este trabajo de tesis facilitan la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas en ACDP.
4. La implantación, en tumor, de la membrana CEB-01 cargada con el citotóxico SN-38 en tratamiento único o combinada con quimioterapia, reduce y controla el crecimiento del tumor a nivel local disminuyendo, a la vez, la carga tumoral metastásica.
5. El nanoconjungado T22-O-GEM es un vehículo útil para el transporte, internalización a través del receptor CXCR4 y liberación de Gemcitabina en células tumorales PANC-1 CXCR4+ reduciendo significativamente la viabilidad celular en las células CXCR4+.
6. El nanoconjungado T22-O-GEM muestra direccionamiento activo en modelos *in vivo* de ACDP CXCR4+. Es un vehículo altamente selectivo y efectivo contra células tumorales CXCR4+ tras administración intravenosa y no presenta efectos adversos observables en tejidos no tumorales.

7. Los resultados obtenidos en este proyecto de tesis, consecuencia de la interacción entre investigación básica y clínica, pueden permitir el desarrollo de nuevas y más eficientes terapias dirigidas al tratamiento del cáncer de páncreas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2020. CA Cancer J Clinic, 2020; 70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8.
2. Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, et al. Mucinous cystic neoplasm of the pancreas is not an aggressive entity: lessons from 163 resected patients. Ann Surg, 2008; 247(4):571-9. doi: 10.1097/SLA.0b013e31811f4449.
3. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. Dig Dis, 2010; 28(4-5):645-56. doi: 10.1159/000320068. Epub 2010 Nov 18.
4. Longnecker DS, Goldberg RM, Savarese DM. Up to date: Pathology of exocrine pancreatic neoplasms. 2020.
5. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A, Desmoplasia of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Clin Gastroenterol Hepatol, 2009; 7(11 Suppl):S44-7. doi: 10.1016/j.cgh.2009.07.039.
6. Toft J, Hadden WJ, Laurence JM, Lam V, Yuen L, Janssen A et al. Imaging modalities in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of sensitivity, specificity and diagnostic accuracy. Eur J Radiol, 2017; 92:17-23. doi: 10.1016/j.ejrad.2017.04.009. Epub 2017 Apr 24.
7. Karmazanovsky G, Fedorov V, Kubyshkin V, Kotchatkov A. Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability. Abdom Imaging, 2005; 30(4):488-500. doi: 10.1007/s00261-004-0279-z.
8. Hidalgo M. Pancreatic cancer. N Engl J Med, 2010; 362(17):1605-17. doi: 10.1056/NEJMra0901557.
9. Ansari D, Williamsson C, Tingstedt B, Andersson B, Lindell G, Andersson R. Pancreaticoduodenectomy--the transition from a low- to a high-volume center. Scand J Gastroenterol, 2014; 49:481-484. 49(4):481-4. doi:10.3109/00365521.2013.847116.
10. Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. Update on the management of pancreatic cancer: Surgery is not enough. World J Gastroenterol, 2015; 21(11):3157-65. doi: 10.3748/wjg.v21.i11.3157.
11. Kamarajah SK, Burns WR, Frankel TL, et al. Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis. Ann Surg Oncol, 2017; 24(7):2023-2030. doi: 10.1245/s10434-017-5810-x. Epub 2017 Feb 17.

12. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg*, 2004; 240(2):205-13. doi:10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae.
13. Birkmeyer JD, Sun Y, Wong SL, Stukel TA. Hospital volume and late survival after cancer surgery. *Ann Surg*, 2007; 245(5):777-83. doi:10.1097/01.sla.0000252402.33814.dd.
14. Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2018; 24(19):2047-2060. doi:10.3748/wjg.v24.i19.2047.
15. Greer JB; Whitcomb DC; Brand RE, Genetic predisposition to pancreatic cancer: a brief review. *Am J Gastroenterol*, 2007; 102(11):2564-9. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01475.x.
16. Hruban Ralph H, Goldberg Richard M, Savarese Diane MF. Up to date: Molecular pathogenesis of exocrine pancreatic cancer 2020.
17. McCleary-Wheeler A, McWilliams R, and Fernandez-Zapico ME, Aberrant signaling pathways in pancreatic cancer: A two compartment view. *Mol Carcinog*, 2012; 51(1):25-39. doi: 10.1002/mc.20827.
18. Yao W, Maitra A, Ying H. Recent insights into the biology of pancreatic cancer. *EBioMedicine*, 2020; 53:102655. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102655.
19. Hruban Ralph H, Goldberg Richard M, Savarese Diane MF. Up to date: Molecular pathogenesis of exocrine pancreatic cancer 2020.
20. Makohon-Moore A, and. Iacobuzio-Donahue CA, Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective, *Nat Rev Cancer*, 2016; 16(9):553-65. doi: 10.1038/nrc.2016.66. Epub 2016 Jul 22.
21. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. Defined the progression model of pancreatic cancer, beginning with precursor lesions that evolve into invasive carcinoma. *Clin. Cancer Res*, 2000; 6(8):2969-72.
22. Koorstra JB, Feldmann G, Habbe N, Maitra A. Langenbecks. Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). *Arch Surg*, 2008; 393(4):561-70. doi: 10.1007/s00423-008-0282-x. Epub 2008 Feb 19.
23. Esposito I, Menicagli M, Funel N, et al. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 2004; 57(6):630-6. doi: 10.1136/jcp.2003.014498.
24. Pandey V, Storz P. Targeting the tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2019; 19(6):473-482. doi: 10.1080/14737140.2019.1622417. Epub 2019 May 31.

25. Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol*, 2009; 44(4):249-60. doi: 10.1007/s00535-009-0013-2. Epub 2009 Mar 7.
26. Apte MV, Park S, Phillips PA, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*, 2004; 29(3):179-87. doi: 10.1097/00006676-200410000-00002.
27. Melstrom LG, Salazar MD, Diamond DJ. The pancreatic cancer microenvironment: A true double agent. *J Surg Oncol*, 2017; 116(1):7-15. doi: 10.1002/jso.24643. Epub 2017 Jun 12.
28. Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*, 2005; 128(4):907-21. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.036.
29. Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, et al. Pancreatic cancer micro-environment. *Int J Cancer*. 2007; 121(4):699-705. doi: 10.1002/ijc.22871.
30. Nagaraju GP, Dontula R, El-Rayes BF, Lakka SS. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2014; 35(5):967-73. doi: 10.1093/carcin/bgu072. Epub 2014 Mar 27.
31. Edderkaoui M, Hong P, Lee JK, et al. Insulin-like growth factor-I receptor mediates the prosurvival effect of fibronectin. *J Biol Chem*, 2007; 282(37):26646-55. doi: 10.1074/jbc.M702836200. Epub 2007 Jul 12.
32. Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, et al. Reactive oxygen species produced by NAD(P)Hoxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 2004; 279(33):34643-54. doi: 10.1074/jbc.M400078200. Epub 2004 May 23.
33. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*, 2008; 68(3):918-26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5714.
34. Qi Bao, Yue Zhao, Andrea Renner, Hanno Niess, Hendrik Seeliger, Karl-Walter Jauch, and Christiane J. Bruns. Cancer Stem Cells in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 2010; 2(3):1629-41. doi: 10.3390/cancers2031629.
35. Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, Liu Y, Yao Y, Li D. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020; 16(1):52. doi: 10.1186/s12943-017-0624-9.
36. Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, Pasca di Maglano M, Simeone DM. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology*, 2011; 141(6):2218-2227.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.009.

37. Hermann PC, Sainz B Jr. Pancreatic cancer stem cells: A state or an entity? *Semin Cancer Biol*, 2018; 53:223-231. doi: 10.1016/j.semancer.2018.08.007. Epub 2018 Aug 18.
38. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*, 2012; 12(2):89-103. doi: 10.1038/nrc3205.
39. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*, 2011; 146(4):633-44. doi:10.1016/j.cell.2011.07.026.
40. Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res*, 2007; 67(8):3691-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3912.
41. Shah A, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol*, 2007; 14(12):3629-37. doi: 10.1245/s10434-007-9583-5. Epub 2007 Oct 2.
42. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007; 6(1):92-7.
43. Ding Y, Du Y. Clinicopathological significance and prognostic role of chemokine receptor CXCR4 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma, a meta-analysis and literature review. *Int J Surg*, 2019; 65:32-38. doi: 10.1016/j.ijsu.2019.03.009. Epub 2019 Mar 19.
44. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H and Zhao B, CXCR4 over-expression and survival in cancer: A system review and meta-analysis, *Oncotarget*, 2015; 6(7):5022-40. doi: 10.18632/oncotarget.3217.
45. Maréchal R, Demetter P, Nagy N, Berton A, Decaestecker C, Polus M, Closset J, Devière J, Salmon I, Van Laethem JL. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*, 2009; 100(9):1444-51. doi: 10.1038/sj.bjc.6605020. Epub 2009 Apr 7.
46. Marchesi F, Monti P, Leone BE, Zerbi A, Vecchi A, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res*, 2004; 64(22):8420-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1343.
47. Wu H, Zhu L, Zhang H, Shi X, Zhang L, Wang W, Xue H, Liang Z. Coexpression of EGFR and CXCR4 predicts poor prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*, 2015; 10(2):e0116803. doi: 10.1371/journal.pone.0116803. eCollection 2015.

48. Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, Stratford IJ, Williams KJ, Johnston PG, Waugh DJ. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene*, 2007; 26(52):7333-45. doi: 10.1038/sj.onc.1210536. Epub 2007 May 28.
49. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 2006; 203(9):2201-13. doi: 10.1084/jem.20052144. Epub 2006 Aug 28.
50. Gebauer F, Tachezy M, Effenberger K, von Loga K, Zander H, Marx A, Kaifi JT, Sauter G, Izicki JR, Bockhorn M. Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 2011; 104(2):140-5. doi: 10.1002/jso.21957. Epub 2011 Apr 25.
51. Krieg A, Riemer JC, Telan LA, Gabbert HE, Knoefel WT. CXCR4: A Prognostic and Clinicopathological Biomarker for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 2015; 10(6):e0130192. doi: 10.1371/journal.pone.0130192.
52. Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataki Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 2008; 98(8):1389-97. doi: 10.1038/sj.bjc.6604307. Epub 2008 Mar 18.
53. Bos PD, Nguyen DX, Massagué J. Modeling metastasis in the mouse. *Curr Opin Pharmacol*, 2010; 10(5):571-7. doi: 10.1016/j.coph.2010.06.003. Epub 2010 Jul 1.
54. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res*, 2012; 21(2):327-49. doi: 10.1007/s11248-011-9537-3.
55. Muzumdar MD, Chen PY, Dorans KJ, et al. Survival of pancreatic cancer cells lacking KRAS function. *Nat Commun*, 2017; 8(1):1090. doi:10.1038/s41467-017-00942-5.
56. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 2005; 7(5):469-83. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.023.
57. Javle M, Golan T, Maitra A. Changing the course of pancreatic cancer – focus on recent translational advances. *Cancer Treat Rev*, 2016; 44:17-25. doi:10.1016/j.ctrv.2016.01.004. Epub 2016 Jan 25.

58. James MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor. *Cell*, 2018; 172(3):578-589.e17. doi:10.1016/j.cell.2018.01.006.
59. Majumder K, Arora N, Modi S, et al. A novel immunocompetent mouse model of pancreatic cancer with robust stroma: a valuable tool for preclinical evaluation of new therapies. *J Gastrointest Surg*, 2016; 20(1):53-65; discussion 65. doi: 10.1007/s11605-015-2985-y. Epub 2015 Nov 18.
60. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Engle DD, Tuveson DA, Clevers H. Model organoids provide new research opportunities for ductal pancreatic cancer. *Mol Cell Oncol*, 2015; 3(1):e1014757. doi: 10.1080/23723556.2015.1014757. eCollection 2016 Jan.
61. Bisht S, Feldmann G. Animal Models for Modeling Pancreatic Cancer and Novel Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2019; 14(2):127-142. doi: 10.1080/17460441.2019.1566319. Epub 2019 Jan 18.
62. Kamiyama H, Kamiyama M, Hong SM, et al. In vivo and in vitro propagation of intraductal papillary mucinous neoplasms. *Lab Invest*, 2010; 90(5):665-73. doi: 10.1038/labinvest.2010.51. Epub 2010 Mar 15.
63. Kong K, Guo M, Liu Y, Zheng J. Progress in Animal Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Cancer*, 2020; 11(6):1555-1567. doi: 10.7150/jca.37529. eCollection 2020.
64. Schutte U, Bisht S, Brossart P, et al. Recent developments of transgenic and xenograft mouse models of pancreatic cancer for translational research. *Expert Opin Drug Discov*, 2011; 6(1):33-48. doi:10.1517/17460441.2011.534453. Epub 2010 Nov 19.
65. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*, 2009; 4(11):1670-80. doi:10.1038/nprot.2009.171. Epub 2009 Oct 29.
66. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 2013; 105(7):452-8. doi: 10.1093/jnci/djt007. Epub 2013 Feb 21.
67. Delitto D, Black BS, Sorenson HL, Knowlton AE, Thomas RM, Sarosi GA, Moldawer LL, Behrns KE, Liu C, George TJ, Trevino JG, Wallet SM, Hughes SJ. The inflammatory milieu within the pancreatic cancer microenvironment correlates with clinicopathologic parameters, chemoresistance and survival. *BMC Cancer*, 2015; 15:783. doi: 10.1186/s12885-015-1820-x.
68. Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer*, 2015; 15(5):311-6. doi: 10.1038/nrc3944.

69. Cho SY, Kang W, Han JY, et al. An integrative approach to precision cancer medicine using patient-derived xenografts. *Mol Cells*, 2016; 39(2):77-86. doi:10.14348/molcells.2016.2350. Epub 2016 Feb 2.
70. Jung J, Lee CH, Seol HS, et al. Generation and molecular characterization of pancreatic cancer patient-derived xenografts reveals their heterologous nature. *Oncotarget*, 2016; 7 (38):62533–62546. doi:10.18632/oncotarget.11530
71. Walters DM, Stokes JB, Adair SJ, Stelow EB, Borgman CA, Lowrey BT, Xin W, Blais EM, Lee JK, Papin JA, Parsons JT, Bauer TW. Clinical, molecular and genetic validation of a murine orthotopic xenograft model of pancreatic adenocarcinoma using fresh human specimens. *PLoS One*, 2013; 8(10):e77065. doi: 10.1371/journal.pone.0077065
72. Morton JJ, Bird G, Refaeli Y, et al. Humanized mouse xenograft models: narrowing the tumor-microenvironment gap. *Cancer Res*, 2016; 76(21):6153-6158. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1260. Epub 2016 Sep 1.
73. Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I, et al. Intrahepatic transplantation of CD34+ cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment. *Tissue Cell*, 2012; 44(2):80-6. doi:10.1016/j.tice.2011.11.004. Epub 2011 Dec 23.
74. Holzapfel BM, Wagner F, Thibaudeau L, et al. Concise review: humanized models of tumor immunology in the 21st century: convergence of cancer research and tissue engineering. *Stem Cells*, 2015; 33(6):1696-704. doi: 10.1002/stem.1978.
75. Halperin DM, Varadhachary GR. Resectable, borderline resectable, and locally advanced pancreatic cancer: what does it matter? *Curr Oncol Rep*, 2014; 16(2):366. doi: 10.1007/s11912-013-0366-9.
76. Katz MH, Marsh R, Herman JM, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: need for standardization and methods for optimal clinical trial design. *Ann Surg Oncol*, 2013; 20(8):2787-95. doi: 10.1245/s10434-013-2886-9. Epub 2013 Feb 23.
77. NCCN Guidelines. Pancreatic Adenocarcinoma (Version 3.2019), 2019. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/pancreatic.pdf
78. Oba Atsushi, Ho Felix, Bao Quoc Riccardo, Al-Musawi Mohammed H, Schulick Richard D, Del Chiaro Marco. Neoadjuvant Treatment in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*, 2020; 10:245. doi: 10.3389/fonc.2020.00245. eCollection 2020.
79. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2014; 371:1039-1049. doi:10.1056/NEJMra1404198.
80. He J, Blair AB, Groot VP, Javed AA, Burkhardt RA, Gemenetzis G, et al. Is a pathological complete response following neoadjuvant chemoradiation

- associated with prolonged survival in patients with pancreatic cancer? Ann Surg, 2018; 268(1):1-8. doi: 10.1097/SLA.0000000000002672.
81. Cloyd JM, Wang H, Egger ME, Tzeng CD, Prakash LR, Maitra A, et al. Association of clinical factors with a major pathologic response following preoperative therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. JAMA Surg, 2017; 152(11): 1048–1056. doi:10.1001/jamasurg.2017.2227.
82. Al-Hawary MM, Francis IR, Chari ST, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. Radiology, 2014; 146(1):291-304.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.004.
83. Tee MC, Krajewski AC, Groeschl RT, Farnell MB, Nagorney DM, Kendrick ML, et al. Indications and perioperative outcomes for pancreatectomy with arterial resection. J Am Coll Surg, 2018; 227(2):255-269. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2018.05.001. Epub 2018 May 9.
84. Del Chiaro M, Rangelova E, Halimi A, Ateeb Z, Scandavini C, Valente R, et al. Pancreatectomy with arterial resection is superior to palliation in patients with borderline resectable or locally advanced pancreatic cancer. HPB, 2019; 10: 245. doi: 10.3389/fonc.2020.00245.
85. Evans DB, George B, Tsai S. Non-metastatic Pancreatic Cancer: Resectable, Borderline Resectable, and Locally Advanced-Definitions of Increasing Importance for the Optimal Delivery of Multimodality Therapy. Ann Surg Oncol, 2015; 22(11):3409-13. doi: 10.1245/s10434-015-4649-2. Epub 2015 Jun 30.
86. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. JAMA, 2013; 310(14):1473-81. doi: 10.1001/jama.2013.279201.
87. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet, 2017; 389(10073):1011-1024. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32409-6. Epub 2017 Jan 25.
88. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. N Engl J Med, 2018; 379(25):2395-2406. doi: 10.1056/NEJMoa1809775.
89. Mackay TM, Smits FJ, Roos D, Bonsing BA, Bosscha K, Busch OR, et al. The risk of not receiving adjuvant chemotherapy after resection of pancreatic ductal

- adenocarcinoma: a nationwide analysis. *HPB*, 2020; 22(2):233-240. doi: 10.1016/j.hpb.2019.06.019. Epub 2019 Aug 19.
90. He J, Page AJ, Weiss M, et al. Management of borderline and locally advanced pancreatic cancer: where do we stand? *World J Gastroenterol*, 2014; 20(9): 2255–2266. doi: 10.3748/wjg.v20.i9.2255
91. Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2019; 4:50. doi: 10.21037/tgh.2019.06.02. eCollection 2019.
92. Tienhoven GV, Versteijne E, Suker M, Groothuis KBC, Busch OR, Bonsing BA, et al. Preoperative chemoradiotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer (PREOPANC-1): a randomized, controlled, multicenter phase III trial. *J Clin Oncol*, 2020; 38(16):1763-1773. doi:10.1200/JCO.19.02274.
93. Macedo FI, Ryon E, Maithel SK, Lee RM, Kooby DA, Fields RC, et al. Survival outcomes associated with clinical and pathological response following neoadjuvant FOLFIRINOX or gemcitabine/Nab-paclitaxel chemotherapy in resected pancreatic cancer. *Ann Surg*, 2019; 270(3):400-413. doi: 10.1097/SLA.0000000000003468.
94. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*, 2013; 369(18):1691-703. doi:10.1056/NEJMoa1304369. Epub 2013 Oct 16.
95. Abou-Khalil J, Rocha FG. Surgical strategies and novel therapies for locally advanced pancreatic cancer. *J Surg Oncol*, 2017; 116(1):16-24. doi:10.1002/jso.24654. Epub 2017 May 17.
96. Michelakos T, Pergolini I, Castillo CF, Honselmann KC, Cai L, Deshpande V et al. Predictors of resectability and survival in patients with borderline and locally advanced pancreatic cancer who underwent neoadjuvant treatment with FOLFIRINOX. *Ann Surg*, 2019; 269(4):733-740. doi:10.1097/SLA.0000000000002600.
97. Barenboim A, Lahat G, Geva R, Nachmany I, Nakache R, Goykhman Y, et al. Neoadjuvant FOLFIRINOX for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer: an intention to treat analysis. *Eur J Surg Oncol*, 2018; 44(10):1619-1623. doi: 10.1016/j.ejso.2018.07.057. Epub 2018 Aug 2.
98. Hammel P, Lacy J, Portales F, Sobrero AF, Cid RAP, Mozo JLM, et al. Phase II LAPACT trial of nab-paclitaxel (nab-P) plus gemcitabine (G) for patients with locally advanced pancreatic cancer (LAPC). *J ClinOncol*, 2020; 38(5):285-294. doi:10.1200/JCO.2019.35.30327. Epub 2020 Jan 14.
99. Lambert A, Schwarz L, Borbath I, Henry A, Van Laethem JL, Malka D, Ducreux M, Conroy T. An Update on Treatment Options for Pancreatic Adenocarcinoma. *Ther Adv*

- Med Oncol, 2019; 11:1758835919875568. doi: 10.1177/1758835919875568. eCollection 2019.
100. Chan K, Shah K, Lien K, Coyle D, Lam H, Ko YJ. A Bayesian meta-analysis of multiple treatment comparisons of systemic regimens for advanced pancreatic cancer. PLoS ONE, 2014; 9(10): e108749. doi:10.1371/journal.pone.0108749.
101. Sohal DP, Mangu PB, Khorana AA, Shah MA, Philip PA, O'Reilly EM, Uronis HE, Ramanathan RK, Crane CH, Engebretson A, Ruggiero JT, Copur MS, Lau M, Urba S, Laheru D. Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. J Clin Oncol, 2016; 34(23):2784-2796. doi: 10.1200/jco.2016.67.1412.
102. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med, 2019; 381(4):317-327. doi: 10.1056/NEJMoa1903387. Epub 2019 Jun 2.
103. Chiorean EG, Von Hoff DD, ReniM, Arena FP, Infante JR, Bathini VG, et al. CA19-9 decrease at 8 weeks as a predictor of overall survival in a randomized phase III trial (MPACT) of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with metastatic pancreatic cancer. Ann Oncol, 2016; 27(4):654-60. doi:10.1093/annonc/mdw006. Epub 2016 Jan 22.
104. Keane FK, Wo JY, Ferrone CR, Clark JW, Blaszkowsky LS, Allen JN, et al. Intraoperative radiotherapy in the Era of intensive neoadjuvant chemotherapy and chemoradiotherapy for pancreatic adenocarcinoma. Am J Clin Oncol, 2018; 41(6):607-612. doi: 10.1097/COC.0000000000000336.
105. Takaori K, Bassi C, Biankin A, et al. International Association of Pancreatologists (IAP)/European Pancreatic Club (EPC) consensus review of guidelines for the treatment of pancreatic cancer. Pancreatology, 2015; 16(1):14-27. doi:10.1016/j.pan.2015.10.013. Epub 2015 Nov 12.
106. Chapman BC, Gleisner A, Rigg D, Meguid C, Goodman K, Brauer B, et al. Perioperative outcomes and survival following neoadjuvant stereotactic body radiation therapy (SBRT) versus intensity-modulated radiation therapy (IMRT) in pancreatic adenocarcinoma. J Surg Oncol, 2018; 56(12):1746-1753. doi:10.1080/0284186X.2017.1342863. Epub 2017 Jun 29.
107. Torphy RJ, Zhu Y, Schulick RD. Immunotherapy for pancreatic cancer: barriers and breakthroughs. Ann Gastroenterol Surg, 2018; 2(4): 274–281. doi: 10.1002/ags3.12176

108. Humphris JL, Patch AM, Nones K, Bailey PJ, Johns AL, McKay S, et al. Hypermutation In pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2017; 152:68–74. e2. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.060.
109. Nevala-Plagemann C, Hidalgo M, Garrido-Laguna I. From state-of-theart treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020; 17(2):108-123. doi: 10.1038/s41571-019-0281-6. Epub 2019 Nov 8.
110. Khorana AA, McKernin SE, Katz MHG. Potentially Curable Pancreatic Adenocarcinoma: ASCO Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract*, 2019; 37(23):2082-2088. doi: 10.1200/JCO.19.00946. Epub 2019 Jun 10.
111. Mollberg N, Rahbari NN, Koch M, et al. Arterial resection during pancreatectomy for pancreatic cancer: a systematic review and metaanalysis. *Ann Surg*, 2011; 254(6):882-93. doi:10.1097/SLA.0b013e31823ac299.
112. Delpero JR, Sauvanet A. Vascular Resection for Pancreatic Cancer: 2019 French Recommendations Based on a Literature Review From 2008 to 6-2019. *Front Oncol*, 2020; 10:40. doi: 10.3389/fonc.2020.00040. eCollection 2020.
113. Zhang Y, Yang C, Cheng H, Fan Z, Huang Q, Lu Y, Fan K, Luo G, Jin K, Wang Z, Liu C, Yu X. Novel Agents for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Emerging Therapeutics and Future Directions. *Hematol Oncol*, 2018; 11: 14. doi:10.1186/s13045-017-0551-7.
114. Desai P, Ann D, Wang J, Prabhu S. Pancreatic Cancer: Recent Advances in Nanoformulation-Based Therapies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2019; 36(1):59-91. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018025459.
115. El-Zahaby SA, Elnaggar YS, Abdallah OY. Reviewing Two Decades of Nanomedicine Implementations in Targeted Treatment and Diagnosis of Pancreatic Cancer: An Emphasis on State of Art *J Control Release*, 2019; 293:21-35. doi:10.1016/j.jconrel.2018.11.013. Epub 2018 Nov 14.
116. Malekigorji M, Alfaad M, Kong Thoo Lin P, Jones S, Curtis A, Hoskins C. Thermally triggered theranostics for pancreatic cancer therapy. *Nanoscale*, 2017; 9(34):12735-12745. doi: 10.1039/C7NR02751F
117. Ulbrich K, Holá K, Šubr V, Bakandritsos A, Tuček J, Zbořil R. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem Rev*, 2016; 116(9):5338-431. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00589. Epub 2016 Apr 25.
118. Sun NF, Liu ZA, Huang WB, Tian AL, Hu SY. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014; 89(3):352-7. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.10.006. Epub 2013 Oct 12.

119. Li YJ, Wu JY, Wang JM, Xiang DX. Emerging nanomedicine-based strategies for preventing metastasis of pancreatic cancer. *J Control Release*, 2020; 320:105-111. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.041. Epub 2020 Jan 21.
120. Samanta K, Setua Si, Kumari S, Jaggi M, Yallapu MM, Chauhan SC. Gemcitabine Combination Nano Therapies for Pancreatic Cancer. *Pharmaceutics*, 2019; 11(11):574. doi: 10.3390/pharmaceutics11110574.
121. Stathopoulos GP. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anticancer Drugs*, 2010; 21(8):732-6. doi: 10.1097/CAD.0b013e32833d9adf.
122. Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR Jr, Gannon WE, Walker M, Seidel GD, Yuldasheva N, Tamarkin L. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res*, 2010; 16(24):6139-49. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0978. Epub 2010 Sep 27.
123. Von Hoff DD, Goldstein D, Renschler MF. Albumin-bound paclitaxel plus gemcitabine in pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 2014; 370(5):479-80. doi:10.1056/NEJMc1314761.
124. Kunzmann V, Ramanathan RK, Goldstein D, Liu H, Ferrara S, Lu B, Renschler MF, Von Hoff DD. Tumor Reduction in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer Lesions With nab-Paclitaxel and Gemcitabine: An Exploratory Analysis from a Phase 3 Study. *Pancreas*, 2017; 46(2):203-208. doi:10.1097/MPA.0000000000000742.
125. Jameson GS, Borazanci E, Babiker HM, Poplin E, Niewiarowska AA, Gordon MS, Barrett MT, Rosenthal A, Stoll-D'Astice A, Crowley J, Shemanski L, Korn RL, Ansaldi K, Lebron L, Ramanathan RK, Von Hoff DD. Response Rate Following Albumin-Bound Paclitaxel Plus Gemcitabine Plus Cisplatin Treatment Among Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase 1b/2 Pilot Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 2019; 6(1):125-132. doi:10.1001/jamaoncol.2019.3394.
126. Pusceddu S, Ghidini M, Torchio M, Corti F, Tomasello G, Niger M, Prinzi N, Nichetti F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Cabiddu M, Passalacqua R, de Braud F, Petrelli F. Comparative Effectiveness of Gemcitabine plus Nab-Paclitaxel and FOLFIRINOX in the First-Line Setting of Metastatic Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, 2019; 11(4):484. Doi: 10.3390/cancers11040484
127. Céspedes MV, Unzueta U, Aviño A, Gallardo A, Álamo A, Sala R, Sánchez-Chardi A, Casanova I, Mangues MA, Lopez-Pousa A, Eritja R, Villaverde A, Vázquez E, Mangues R. Selective depletion of metastatic stem cells as therapy for human colorectal cancer. *EMBO Mol Med*, 2018; 10(10): e8772. doi:10.15252/emmm.201708772

128. Asghari S, Rezaei Z, Mahmoudifard Matin. Electrospun Nanofibers: A Promising Horizon Toward the Detection and Treatment of Cancer. *Analyst*, 2020; 145(8):2854-2872. doi: 10.1039/c9an01987a. Epub 2020 Feb 25.
129. Wang Y, Lu Y, Gong J, Yao Y. Electrospun nanofiber regulates assembly of keratin and vimentin intermediate filaments of PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019; 96:616-624. doi:10.1016/j.msec.2018.11.072.
130. Céspedes MV, Álamo P et al. Cancer-specific uptake of a liganded protein nanocarrier targeting aggressive CXCR4 + colorectal cancer models. *Nanomedicine*, 2016 Oct;12(7):1987-1996. doi: 10.1016/j.nano.2016.04.003. Epub 2016 Apr 13.
131. Sleightholm RL, Neilsen BK, Li B, Steele MM, Singh RK, Michael A Hollingsworth MA, Oupicky D. Emerging roles of the CXCL12/CXCR4 axis in pancreatic cancer progression and therapy. *Pharmacol Ther*, 2017; 179:158-170. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.012. Epub 2017 May 23.
132. Frampton JE. Liposomal Irinotecan: A Review in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Drugs*, 2020; 80(10): 1007–1018. doi: 10.1007/s40265-020-01336-6.
133. Céspedes et al. Bacterial mimetics of endocrine secretory granules as immobilized in vivo depots for functional protein drugs. *Sci Rep*, 2016; 6:3576. doi:10.1038/srep35765.
134. Li J, Liu F, Gupta S, Li C. Interventional Nanotheranostics of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Theranostics*, 2016; 6(9): 1393–1402. doi: 10.7150/thno.15122.
135. Ji T, Kohane DS. Nanoscale systems for local drug delivery. *Nano Today*, 2019; 28:100765. doi: 10.1016/j.nantod.2019.100765. Epub 2019 Aug 26.
136. Brachi G, Bussolino F, Ciardelli G, Mattu C. Nanomedicine for Imaging and Therapy of Pancreatic Adenocarcinoma. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019; 7:307. doi:10.3389/fbioe.2019.00307. eCollection 2019.
137. Adiseshaiah PP, Crist RM, Hook SS, McNeil SE. Nanomedicine strategies to overcome the pathophysiological barriers of pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016; 13(12):750-765. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.119. Epub 2016 Aug 17.
138. Indolfi L et al. A tunable delivery platform to provide local chemotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomaterials*, 2016; 93:71-82. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.03.044. Epub 2016 Mar 31.
139. Golan T, Khvalevsky EZ, Hubert A, Gabai RM, Hen N, Segal A, et al. RNAi therapy targeting KRAS in combination with chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer patients. *Oncotarget*, 2015; 6:4183. doi: 10.18632/oncotarget.4183

140. Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gebhardt F, Keil O, et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2014; 32, 4141–4148. doi:10.1200/JCO.2013.55.0376.
141. Aslan M, Shahbazi R, Ulubayram K, Ozpolat B. Targeted Therapies for Pancreatic Cancer and Hurdles Ahead. *Anticancer Res.*, 2018; 38(12):6591-6606. doi:10.21873/anticanres.13026. doi: 10.21873/anticanres.13026.
142. Xie Y et al. Stromal Modulation and Treatment of Metastatic Pancreatic Cancer with Local Intraperitoneal Triple miRNA/siRNA Nanotherapy. *ACS Nano*, 2020; 14(1):255-271. doi:10.1021/acsnano.9b03978. Epub 2020 Jan 13.
143. Biasci D et al. CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an integrated immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020; 117(46):28960-28970. doi: 10.1073/pnas.2013644117. Epub 2020 Oct 30.
144. Bockorny B et al. BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial. *Nat Med*, 2020; 26(6):878-885. doi:10.1038/s41591-020-0880-x. Epub 2020 May 25.

Lista de figuras

Figura 1. Progresión del ACDP a partir de lesiones pancreáticas precursoras y mutaciones relacionadas.....32

Referencias:

Iacobuzio-Donahue, CA. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. Gut, 2012; 61(7): 1085–1094. doi:10.1136/gut.2010.236026.

Chang D, Merrett ND, Biankin AV, NSW Pancreatic Cancer Network. Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem? J Gastroenterol Hepatol, 2008; 23(7 Pt 1):1036-45. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05471.x.

Figura 2. Estroma tumoral en ACDP y relación entre sus componentes.....35

Referencia:

Pandey V, Storz P. Targeting the tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. Expert Rev Anticancer Therapy, 2019; 19(6):473-482. doi:10.1080/14737140.2019.1622417. Epub 2019 May 31.

Figura 3. Contribución de diferentes modelos animales a varios pasos en la diseminación metastásica.....44

Referencia:

Bos PD, Nguyen DX, Massagué J. Modeling metastasis in the mouse. Curr Opin Pharmacol, 2010; 10(5): 571–577.doi: 10.1016/j.coph.2010.06.003.

Figura 4. Tipos de nanopartículas transportadoras de fármacos.....57

Referencia:

Volpedo G, Costa L, Ryan N, Halsey G, Satoskar A, Oghumu S. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 2019; 25:e144118. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-1441-18. eCollection 2019.

Figura 5. Diferentes tipos de nanotransportadores.....58

Referencia:

Mo R, Jiang T, Di J, Tai W, Gu Z. Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery. Chem Soc Rev, 2014; 43(10):3595-629. doi:10.1039/c3cs60436e. Epub 2014 Mar 14.

Figura 6. Nanopartículas y surfactantes: interacciones moleculares, ensamblaje y aplicaciones.....59

Referencia:

Heinz H, Pramanika C, Heinz O, Ding Y, Mishrac RK, Marchon D, Flatt RJ, Estrela-Llopis I, Llop J, Moya S, Ziolo RF. Surface Science Reports, 2017 Feb, Volume 72, Issue 1, Pages 1-58.

Figura 7. Expresión de CXCR4 en dos tumores representativos de pacientes afectados por ACDP e intervenidos en nuestro hospital.....	98
Figura 8. Expresión de CXCR4 en tumores y relación con el tamaño (A) y grado de diferenciación tumoral (B).....	99
Figura 9. Expresión de CXCR4 en tumores y relación con la afectación ganglionar (A), invasión vascular (B) perineural (C) y recidiva tumoral (D) y supervivencia (E).....	100
Figura 10. Comparativa de los niveles de expresión de ARNm de CXCR4 en páncreas normal y tejido tumoral y su asociación con supervivencia.....	101
Figura 11. Expresión de luciferasa y CXCR4 en células pancreáticas MIA PaCa-2 y PANC-1.....	103
Figura 12. Progresión tumoral de tumor PANC-1 implantado ortotópicamente mediante SOI en ratones Swiss nude (A) y NOD-SCID (B) y expresión de CXCR4 (C).	104
Figura 13. A) Comparación de la supervivencia de ratones Swiss nude y NOD-SCID y el patrón de metástasis. B) Análisis histopatológico e inmunohistoquímico de tumor primario y focos metastásicos.....	106
Figura 14. Efectividad terapéutica de CEB-01-SN38 en combinación con quimioterapia.....	109
Figura 15. Análisis del volumen y peso tumoral final tras el tratamiento con CEB-01-SN38 en combinación con quimioterapia.....	110
Figura 16. Macrofotografías representativas del tratamiento con CEB-SN38 en combinación con quimioterapia.....	110
Figura 17. Evaluación del peso corporal tras tratamiento con CEB-SN-38 en combinación con quimioterapia.....	111
Figura 18. Análisis histopatológico de los órganos más relevantes tras el tratamiento con CEB-01-SN38 y en combinación con quimioterapia.....	112
Figure 19. Actividad antitumoral de CEB-01-SN38 en cáncer de páncreas.....	114
Figura 20. Registro de bioluminiscencia tras tratamiento con CEB-01-SN38.....	115
Figura 21. Análisis del volumen y peso tumoral final tras el tratamiento con CEB-01-SN38.....	116
Figura 22. Evaluación del peso corporal tras tratamiento con CEB-01-SN38.....	117
Figura 23. Actividad antitumoral de T22-O-GEM <i>in vitro</i>	120
Figura 24. Biodistribución de T22-O-GEM <i>in vivo</i> en el modelo PANC-1 CXCR4+ de cáncer de páncreas.....	122

Lista de tablas

Tabla 1. Ejemplos de nanopartículas investigadas en el tratamiento del ACDP.....	63- 65
Tabla 2. Lotes y muestras empleadas de membrana CEB-01.....	80
Tabla 3. Diseño de los grupos de tratamiento en el experimento con las membranas CEB-01.....	81
Tabla 4. Características de los pacientes incluidos en el estudio (cohorte retrospectiva y prospectiva).....	95- 97
Tabla 5. Análisis histopatológico de los ratones <i>Swiss nude</i> y NOD-SCID.....	107
Tabla 6. Peso de los órganos (g; media ± e.e) de los diferentes grupos de estudio.....	112
Tabla 7. Peso de los órganos (g; media ± e.e) de los diferentes grupos de estudio: control (sham), vehículo, y tratamiento con CEB-01-SN38 a dosis de 25 mcg/cm ² y 50 mcg/cm ²	117
Tabla 8. Tasa de injerto y número de ratones afectados por metástasis linfáticas, hematógenas y peritoneales en los distintos grupos de estudio.....	118

ANEXOS

I. Hoja de información y consentimiento para la recogida de muestras de ACDP

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Modelos de cáncer de páncreas metastásico para el estudio de la efectividad de agentes antitumorales”

CÓDIGO DEL ESTUDIO: PI12/01861

PROMOTOR: Institut de Recerca de l’Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

INVESTIGADOR PRINCIPAL Y COLABORADORES:

Dr. Ramón Mangues Bafalluy IP, Grupo de Oncogénesis y antitumorales (GOA), IIB, Sant Pau. Tel. 935537918

Dra. María Virtudes Céspedes (GOA), Dr. Manel Trías, Dr. Vicenç Artigas, Dra. Noa de la Fuente. Departamento de Cirugía Digestiva. Tel.93553662

CENTRO: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja con atención y nosotros le aclararemos las dudas. Puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria y puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El tipo de cáncer de páncreas más frecuente es el adenocarcinoma ductal, representa la cuarta causa de muerte por cáncer en Europa y su manejo quirúrgico es complejo. Los tratamientos quimioterápicos utilizados actualmente para el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas metastásico aumentan poco la supervivencia y no están exentos de efectos adversos.

Actualmente se ha descubierto que parte de la población de las células tumorales expresan receptores específicos contra los cuales se pueden dirigir moléculas terapéuticas vehiculizadas a través de nanopartículas de proteínas. Estas nanopartículas presentan una biocompatibilidad alta y son más seguras y eficaces porque actúan sobre las células tumorales de forma dirigida y reducen su disponibilidad en células normales, y por tanto sus efectos adversos.

Pero el desarrollo preclínico de agentes antitumorales se lleva a cabo en modelos animales con eficacia clínica escasa.

El presente estudio servirá para crear un modelo que permita considerar la respuesta del tumor primario y la respuesta a las metástasis y posteriormente evaluar la eficacia de los agentes antitumorales dirigidos mediante nanopartículas en estos modelos.

Su muestra biológica será analizada para la creación de estos modelos animales de cáncer de páncreas metastásico. Se analizará la expresión de un tipo específico de receptores contra los cuales se dirigirán las moléculas terapéuticas.

Las muestras tumorales se extraerán durante el procedimiento quirúrgico rutinario siempre y cuando no suponga un peligro para usted.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Como en la mayoría de los casos, pueden no existir beneficios potenciales para usted en la participación de este estudio. Sin embargo, el mayor conocimiento acerca de los factores implicados en el desarrollo del cáncer de páncreas metastásico y su tratamiento con agentes antitumorales podrá facilitar que se administre en el futuro un tratamiento individual para cada paciente.

TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

La participación en este estudio no modificará el protocolo terapéutico propuesto para el tratamiento de su enfermedad que será el mismo que si no participase en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. La información del paciente se adecúa a los requerimientos establecidos en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y el Real Decreto 1616/2011 de biobancos para este tipo de estudios y para el almacenamiento y conservación de muestras.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo el personal clínico autorizado del hospital tendrá acceso a los datos de la HC para recoger los datos necesarios para llevar a cabo el estudio y el resto de investigadores sólo accederán a datos codificados.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

DESTINO DE LA MUESTRA TRAS SU UTILIZACION EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes, que serán destruidas.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Código del estudio: PI12/01861

Proyecto: "Modelos de cáncer de páncreas metastásico para el estudio de la efectividad de agentes antitumorales". Investigador principal: Ramón Mangues, Grupo de Oncogénesis y Antitumorales, IIB Sant Pau y colaboradores Dra. Céspedes, Dr. Artigas, Dra. de la Fuente.

Yo (nombre y apellidos).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos y mis muestras biológicas en las condiciones detalladas en la hoja de información.

SI

NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

II. Protocolo de supervisión aplicado en animales a partir de las 24 horas del postoperatorio

PARÁMETROS DE SUPERVISIÓN EN ONCOLOGÍA EXPERIMENTAL (Puntuación)

1. Pérdida de peso*

- 0) Peso normal
- 1) Menor de un 10%
- 2) Entre un 10 y un 15% en 5 días
- 3) Consistente o rápida, superior a un 20% mantenida durante 72 horas.

*este parámetro no será válido en tumores agresivos en los que el peso del animal queda enmascarado por el tamaño del tumor.

Se aplicará, además, como medida indirecta de la toxicidad del tratamiento aplicado.

2. Aspecto físico

- 0) Normal
- 1) Deshidratación, delgadez.
- 2) Pelo “no brillante”, “despeinado”. Palidez. Cianosis
- 3) Encorvamiento. Pérdida de masa muscular (emaciación)

3. Signos clínicos

- 0) Ninguno
- 1) Hipotermia
- 2) Secreciones mucosas y/o sanguinolentas por cualquier orificio. Diarrea. Órganos hipertrofiados detectables (ganglios, bazo, hígado)
- 3) Distensión abdominal. Volumen de líquido ascítico superior al 10% de peso corporal inicial. Respiración dificultosa (particularmente si va acompañada de descarga nasal y/o cianosis). Cauquexia.

4. Alteraciones en la conducta

- 0) Ninguna
- 1) Incapacidad de moverse con normalidad
- 2) Imposibilidad de llegar a la comida/bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula
- 3) Inconsciente o comatoso. Intención de “esconderse” en la viruta, no responde a estímulos (Moribundo)

5. Tamaño del tumor (inoculación ortotópica)

- 0) No hay señal
- 1) Tamaño del tumor de 1-10% del volumen abdominal
- 2) Tamaño del tumor de 11-19% del volumen abdominal
- 3) Tamaño del tumor de 20% del volumen abdominal

Cuando el tamaño de la imagen bioluminiscente del tumor corresponda con el 20% del volumen abdominal se procederá a sacrificar al animal (en estudios anteriores se ha comprobado que estos valores no afectan al estado del animal)

6. Heridas

- 0) Ninguna
- 1) Arañazos
- 2) Heridas que no cicatrizan
- 3) Heridas ulceradas que pueden incluso supurar. Tumores ulcerados o necróticos

Nombre del supervisor:

Fecha de supervisión:

TOTAL

Cuando se dé la circunstancia de que haya más de un parámetro con un valor de 3 automáticamente todos los 3 pasarán a 4.

El criterio de supervisión que se seguirá tendrá en cuenta:

1. De 0 a 6 puntos: Valoración individual del animal. Posible existencia de dolor o angustia. Hay que plantearse el uso de analgésicos
2. De 6 a 12 puntos: Existencia de dolor o angustia. Administración de analgésicos paliativos.
3. De 12 a 18 puntos: utilización obligada de analgésicos. Hay que plantearse el sacrificio del animal.
4. De 18 a 24 puntos: sacrificio obligado del animal. Hay que plantearse el final del procedimiento.

Igualmente se sacrificará inmediatamente el animal en cualquier momento del estudio si:

- el tamaño de la masa tumoral, aun no llegando a un tamaño considerado crítico (3 en la tabla de valoración o inferior a los porcentajes indicados para bioluminiscencia), influya en las demás funciones corporales o que cause dolor y/o sufrimiento prolongado.
- pérdida de peso corporal mayor al 20% con respecto al peso basal o de un control.
- signos de emaciación aún sin pérdida de peso global
- ulceración o infección en el lugar de implantación
- trauma autoinflingido persistente y con afectación a la calidad de vida del animal.

**GENERACIÓN DE MODELOS MURINOS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO CON
MAYOR EFICIENCIA METASTÁSICA PARA EL ESTUDIO DE AGENTES ANTITUMORALES**

Noa de la Fuente Hernández