



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes 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>

Tesis doctoral - Junio 2021

Estudio piloto de la ligadura quirúrgica del páncreas distal en modelo murino Kras de adenocarcinoma de páncreas

Marta Cáceres Díez

Director: Dr. Dr. Fernando Burdío Pinilla (UPF)

Director: Dr. Luis Grande Posa (UAB)

Directora: Dra. Rita Quesada Díez (UPC)

Tutor: Dr. Luis Grande Posa (UAB)

Para mis padres, por darme alas. Ayer, ahora y siempre.

Para Rita y Fernando, por enseñarme a volar.

Para Antoine, por el viento a favor.

Agradecimientos

A Fernando Burdío, por involucrarse desde el primer día (aún recuerdo tu insistencia al preguntarme si estaba motivada para incluirme en el proyecto). Por ser buen cirujano y buena persona a pesar de todo y todos, por saber transmitirlo con delicadeza pero decisión. Por su impulso y motivación arrolladoras a veces pero imprescindible. Por sus mil inputs de cirugía en todos estos años (estar a tu lado es seguir aprendiendo). Por la empatía. Por la determinación. A Amparo su mujer, por su paciencia y esas horas robadas de estadística.

A Rita. Por dónde empezar...Por la amistad: porque en medio de la vorágine siempre has sabido compartir la vida como hacía falta. Eres el perfecto equilibrio entre una mánager y una compañera de viaje. Por todo lo que me has enseñado desde el minuto uno al último; desde manipular un ratón, gestionar notas de laboratorio, muestras, bloques de parafina, tinciones, bases de datos, agendas, ideas. Diseñar gráficas, figuras. Por saber parar cuando hacía falta y obligarme a seguir cuando también era necesario. Porque sin ti nunca estaría escribiendo esta página de agradecimientos.

A Luis Grande, por su entereza, calidad como persona y cirujano, por sus buenas ideas y críticas, su cariño. Por su apoyo incondicional en el proyecto pese a todo. Por su buena energía.

A Paco Real, investigador jefe del grupo de Carcinogénesis Epitelial y miembro del Comité Científico del CNIO de Madrid, por su apoyo desde el inicio con el diseño del proyecto, y por cedernos todos los ratones transgénicos que

necesitamos. Por sus consejos y críticas, por sus buenas ideas. Por ponernos en contacto con los expertos que necesitábamos cuando todo eran dudas. A Mónica Pérez y a María Villamonte, por el apoyo, el conocimiento, el rigor, el esfuerzo a pesar de que era más que difícil... por aquel sprint en el CNIO.

A Mar Iglesias, porque nunca compartir una ensalada y un microscopio pudo unir más. Por las risas que supimos robar al cansancio y las prisas. Porque sin ti aún estaríamos buscando los PanINs en las muestras. Por compartir momentos en ese congreso en Valencia y ese curso en Madrid.

A Dimitri Dorcaratto y Patricia Sánchez. Por ser pilares en el laboratorio, por esas horas entre ratolins, por cubrirme las espaldas en el PRBB mientras estaba en París. Por el rigor sin olvidar la sonrisa.

A Anna Andaluz y Xavi, de la Facultad de Veterinaria de la UAB, por esas horas quirófano entre risas, esas comidas y el apoyo con la gestión de las muestras de amilasemia, y el papeleo imposible.

A Enrique Berjano, de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño de Valencia, por su apoyo y sus buenas ideas.

A Irene Espósito, patóloga de la Technische Universität de Múnich y Marta Cañamero, patóloga del departamento de Medicina Traslacional del Roche Pharma Research, por su sabiduría en relación a los PanIN y las AFL.

A Evelyn y Tania, técnicos de laboratorio del PRBB por su buen hacer y su disponibilidad. A Eugenia y Laia, del S. de Análisis de Microarrays del PRBB, por sus aportaciones y apoyo con el análisis genómico.

A mis padres. Por tanto: los ánimos, los consejos, por el apoyo logístico incondicional en todas sus formas y colores. El cariño. Por la psicoterapia, y las terapias de choque. Por estar ahí siempre. A Víctor, por esas comidas terapéuticas los viernes en el Shoko. Por las realidades y los sueños compartidos, en la cercanía y la distancia. Por el apoyo y las palabras oportunas en el momento necesario.

A Antoine, por demasiado... Por apoyarme frente a viento y marea sin entender, por ayudarme en todo lo que ha podido y le he dejado. Por asumir mis horas de ausencia con el ordenador, por las horas extra de canguro en solitario. Por los abrazos cuando todo era difícil.

A Marta Climent y Nuria Argudo, porque ahora somos mosqueteras también de tesis. Por su amistad y compañerismo. A adjuntos modelo del Mar (os dedico esta tesis pero os podría dedicar cualquiera de mis cirugías): A Ignasi Poves, por apoyarme cuando pocos lo hacían, allá por 2014. Por saber compartir la vida en medio de la rutina. Por enseñarme laparoscopia como ningún curso ha sabido. Allá donde estés, me sigues apoyando. A Miguel Pera, por su humanismo y buenos consejos. Por enseñarme a escribir un paper. Por esas cirugías de oro al 50% a las 5 de la mañana. A José Gil, Marta Pascual, Estela Membrilla, Sandra Alonso, Pereira y Solsona: habéis sido muy importantes en mi formación, os debo gran parte de lo que soy como cirujana. A J. Antonio Sitges, por aquellos cafés y aquel libro. A Segura, Juncá, Manuel Pera, Ramón; os debo también parte de mi ser cirujana. A Silvia Salvans por haber sido siempre un modelo personal y profesional, y porque ver su determinación haciendo su tesis cuando iba al PRBB me reencontró con la mía.

A mis compañeros del Hospital General de Cataluña, el Boys&Girls Surgery Team; mi inesperada segunda familia, en especial a Ángel García Sampedro por su apoyo para asistir a citas y reuniones del proyecto.

A Marta Bona, por entenderlo todo todo, siempre. Por esos viajes terapéuticos. A Gemma, Lorena y Olga, por estar ahí siempre, pase lo que pase, en simbiosis. A la tropa de la facultad; Tania y Héctor (¡lo conseguiste tú también!), Carmen, Luis, Oihanna, Alberto, Martita, Raquel, Alejandro, Daria; que no por estar lejos habéis dejado de animarme.

A todos con los que he compartido este proyecto en cafés, comidas y guardias y me han apoyado o escuchado. Al Dr. Tepikin, porque los genios también sueñan (con mitocondrias y con ser escritores).

A Lea, que me ha enseñado tanto, entre otras cosas a optimizar el tiempo. Y a la pequeñina que viene...porque algún día este trabajo les inspire de alguna manera.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
1.1 ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS.....	12
1.1.1 <i>Epidemiología</i>	12
1.1.2 <i>Histología</i>	13
1.1.3 <i>Etiología del ADCP</i>	14
1.1.3.1 Factores de riesgo	15
1.1.3.2 Genética y precursores neoplásicos	15
1.1.3.3 Influencia de la inflamación.....	29
1.1.4 <i>Tratamiento del ADCP</i>	31
1.1.4.1 Intervención de Whipple o duodenopancreatectomía cefálica	33
1.1.4.2 Pancreatectomía distal.....	34
1.1.4.3 Complicaciones postoperatorias.....	36
1.1.4.4 Otros tratamientos asociados.....	37
1.1.4.5 Oclusión del conducto de Wirsung en la práctica clínica	38
1.2 MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS	41
1.3 CAMBIOS HISTOLÓGICOS TRAS LA LIGADURA DUCTAL PANCREÁTICA E IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	43
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVO	53
HIPÓTESIS.....	54
OBJETIVO	54

CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS	55
3.1 MODELO ANIMAL.....	56
3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO	56
<i>Fase 1 (Preliminar)</i>	57
<i>Fase 2</i>	57
3.3 CUIDADO PREOPERATORIO.....	60
3.4 TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	61
3.5 POSTOPERATORIO Y NECROPSIA.....	63
3.6 MUERTES NO ESPERADAS	65
3.7 GESTIÓN DE LAS MUESTRAS HISTOLÓGICAS	66
3.8 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	66
3.8.1 <i>Estudio macroscópico</i>	66
3.8.2 <i>Estudio microscópico</i>	67
3.9 ESTUDIO GENÓMICO.....	67
3.9.1 <i>Muestras genéticas</i>	68
3.9.2 <i>Preprocesamiento de los datos</i>	68
3.9.3 <i>Análisis de expresión por cuantificación de PCR (qPCR)</i>	69
3.10 VARIABLES ANALIZADAS.....	70
3.10.1 <i>Análisis de la morbimortalidad</i>	70
3.10.2 <i>Análisis bioquímicos</i>	70

3.10.3 Histología.....	70
3.10.4 Análisis genómico.....	74
3.11 ANALISIS ESTADÍSTICO	75
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	76
FASE 1 (PRELIMINAR).....	77
FASE 2.....	79
4.1 Evolución de las cirugías y morbimortalidad.....	79
4.1.1 Evolución del peso de los animales.....	79
4.1.2 Análisis de MNE.....	80
4.2 Análisis bioquímico.....	83
4.3 Análisis histológico.....	85
4.3.1. Distribución de lesiones preneoplásicas en ratones Kras.....	92
4.3.2 Otros hallazgos histológicos.....	97
4.4 Análisis genómico (Microarrays).....	99
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	104
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	121
CONCLUSIONES.....	122
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	123
CAPÍTULO 8: ANEXOS.....	145
ARTÍCULO SCIENTIFIC REPORTS (octubre, 2020).....	146
PREMIO LLUÏSA GUARNER.....	158

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1 ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

1.1.1 Epidemiología

Según un informe publicado en el año 2020 por la Sociedad Española de Oncología Médica, la incidencia del cáncer de páncreas está alrededor del 3%, con 8.338 casos nuevos/año, y supone la 3ª causa de muerte tras el cáncer de pulmón y el de colon, con 7.132 fallecimientos anuales en 2018 (el 6,3% del total de fallecimientos por cáncer)¹. Si se analizan los datos mundiales, el cáncer de páncreas es responsable de 432.242 muertes anuales según el último estudio de GLOBOCAN 2019, lo que supone la 8ª causa de muerte por cáncer². Se trata del único tipo de cáncer que no mostró un aumento de supervivencia respecto a años previos. De hecho, la mortalidad por cáncer de páncreas ha aumentado un 10% en las últimas tres décadas³, con mayores tasas de incidencia en los países industrializados y occidentales, según se muestra en la figura 1.

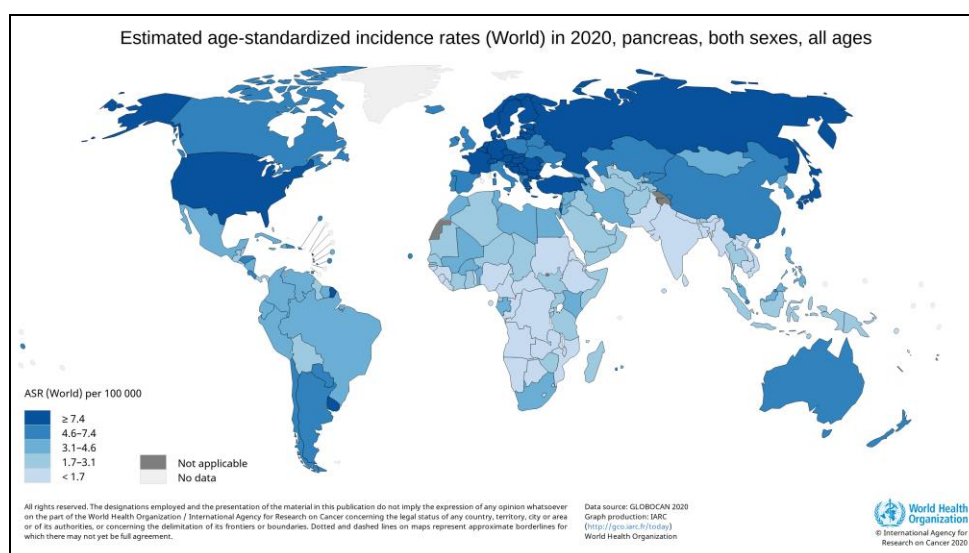


Fig. 1.- Incidencia estimada de cáncer de páncreas en el mundo en 2020. El mapa muestra la distribución por países de pacientes de ambos sexos afectados de cáncer de páncreas en 2020, por 100.000 habitantes (Fuente; GLOBOCAN 2020, WHO³).

Este tipo de cáncer se distribuye de forma homogénea entre sexos y se presenta con más frecuencia en pacientes entre la sexta y la séptima décadas de la vida. Su pronóstico global es malo, con tasas de supervivencia inferiores al 20% al año del diagnóstico y del 5% a los 5 años. Ello se debe a la rápida diseminación vascular, linfática y perineural, que hace que un 85% de los pacientes presenten enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico, siendo incurables, y únicamente subsidiarios de tratamiento paliativo. Solamente el 15–20% de los cánceres de páncreas pueden beneficiarse de la resección quirúrgica, hoy por hoy el único tratamiento curativo posible, a pesar de la complejidad de la intervención y de su elevada morbimortalidad^{4,5}.

Estas cifras dejan clara la relevancia de esta patología, situación que se reafirma con el hecho de que en los últimos 30 años, no ha aumentado la supervivencia en pacientes afectados, a pesar de los avances diagnósticos y en investigación básica. Por este motivo, es necesario desarrollar nuevos métodos de diagnóstico precoz e identificar nuevas dianas terapéuticas en estadios precoces de la neoplasia.

1.1.2 Histología

El 95% de los casos de cáncer de páncreas son adenocarcinomas (ADCP), que se originan en la porción exocrina del páncreas, y el 5% restante son tumores endocrinos raros, que surgen de células de los islotes (tumores neuroendocrinos). Este estudio se centra en el ADCP, cuya localización más frecuente es en la cabeza del páncreas.

Desde el punto de vista morfológico, el ADCP típico está compuesto por células epiteliales de distinto grado de diferenciación glandular,

con un componente prominente de estroma desmoplásico (ver Fig. 2).

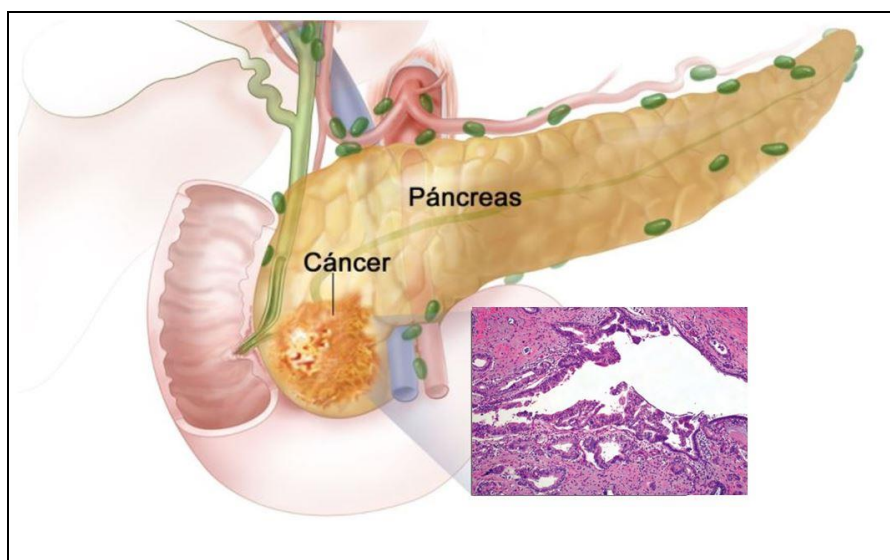


Fig. 2.- Localización e histología típica del ADCP. La mayoría de los ADCP son adenocarcinomas bien o moderadamente diferenciados, destacando la diferenciación glandular del epitelio. Se asocia la presencia de desmoplasia en el estroma circundante (Adaptado de; www.cancer.gov/espanol/tipos/páncreas y Basturk *et al.* ⁶).

1.1.3 Etiología del ADCP

En el momento actual no se conoce la etiología del ADCP. Se han analizado factores de riesgo asociados a una mayor incidencia, así como lesiones histológicas precursoras y alteraciones genéticas implicadas en su etiopatogénesis, que serán revisadas a continuación.

1.1.3.1 Factores de riesgo

Existe un aumento del riesgo de presentar un ADCP entre el 2,5% y el 3,6% en los fumadores. Existen pocos datos de otros factores ambientales, tales como el consumo de alcohol o grasas, sobre el riesgo carcinogénico. Asimismo, se ha descrito un mayor del riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con pancreatitis crónica previa (se revisará en detalle en el apartado 1.1.3) o con cirrosis hepática⁷.

La agregación familiar de tumores pancreáticos y los síndromes hereditarios de alta penetrancia asociados al cáncer de páncreas (cáncer de colon hereditario no polipósico, poliposis adenomatosa familiar, Sd. de melanoma multifocal familiar atípico, Sd. de Peutz-Jeghers, cáncer de mama y ovario hereditario asociado a mutaciones del gen *BRCA*, cáncer de páncreas familiar y diabetes mellitus insulín dependiente, pancreatitis hereditaria y fibrosis quística) representan el 5-10% de los pacientes. En estos casos, y en familias con más de cuatro miembros afectados, está demostrado un aumento de riesgo de la enfermedad de 57 veces^{7,8}, relacionado probablemente con una mutación germinal de genes reparadores de ADN (*BRCA2*)⁹.

1.1.3.2 Genética y precursores neoplásicos

Existen cuatro tipos de precursores de ADCP conocidos: las lesiones pancreáticas neoplásicas intraepiteliales (PanIN), las neoplasias papilares mucinosas intraductales (IPMN), las neoplasias quísticas mucinosas (MCN) y las lesiones planas atípicas (AFL)¹⁰⁻¹².

Lesiones PanIN

Durante décadas se han descrito a nivel histológico lesiones microscópicas intraepiteliales de los ductos pancreáticos en

asociación con el ADCP, asumiéndose el origen ductal del ADCP¹³. Sin embargo, con la introducción a partir del 2000 de los modelos murinos genéticamente modificados (MMGM), se profundizó en el estudio genético del ADCP, principalmente en el oncogén entonces más relacionado con su inicio, el gen *Kras*. Sorprendentemente, tras someter a células ductales a la influencia de mutaciones sobre *Kras*, no se evidenció un desarrollo de las mismas hacia PanIN o ADCP¹⁴. Sin embargo, autores como; Hingorani o Guerra, desarrollaron modelos de expresión de *Kras* oncogénico en células acinares que sí eran capaces de desarrollar lesiones tipo PanIN y PDAC^{15,16}, como se expone más adelante en el apartado 1.2. Más adelante se describió un modelo de progresión secuencial de lesiones precursoras intraepiteliales ductales hacia el ADCP. Se desarrolló a raíz de haberse observado en piezas quirúrgicas, de forma accidental, lesiones tipo PanIN en el contexto de resecciones por patologías benignas. Años después fue descrito, en algunos de estos pacientes, el desarrollo de adenocarcinoma ductal invasivo en el remanente pancreático^{17,18}.

La necesidad de una nomenclatura y clasificación internacionales de estas lesiones intraepiteliales fue abordada en la reunión de Think Tank del Páncreas en Utah, EE.UU, en 1999. En esta reunión se acordó adoptar una nueva terminología de la neoplasia intraepitelial pancreática o PanIN y un sistema de clasificación en tres grados según la evolución hacia la oncogénesis: PanIN 1, PanIN 2 y PanIN 3, con criterios histológicos precisos¹⁹ (ver Fig.3).

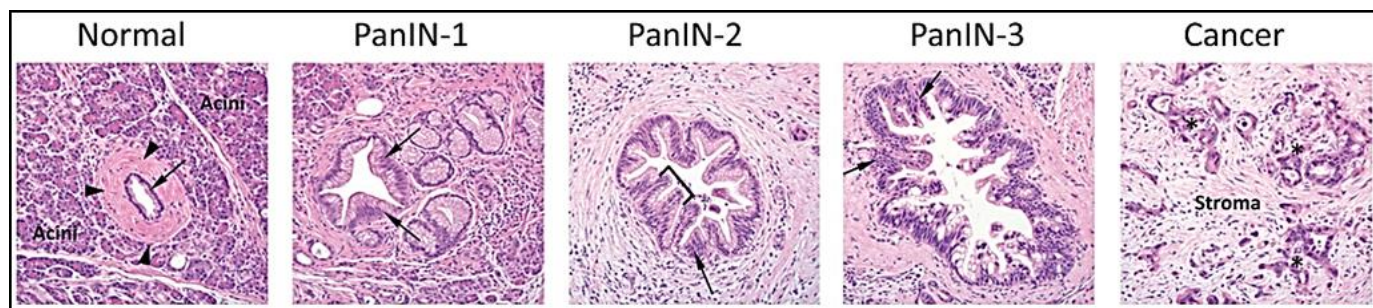


Fig. 3.- Secuencia evolutiva histológica de la progresión de los PanIN hacia el ADCP. En los ductos normales, el epitelio es monoestratificado (flecha). En los PanIN 1 se observan cambios mucinosos (flechas). En los PanIN 2 se identifica: aumento del tamaño de los núcleos, inicio de pérdida de su polaridad (flecha) y pseudoestratificación (corchete). En los PanIN 3 o carcinoma in situ, hay pérdida de la polaridad de núcleos, mitosis y pseudopapilas (flechas). En el ADCP se observa ruptura de la membrana basal e invasión del estroma (asteriscos). (Adaptado de; Iacobuzio-Donahue²⁰)

La World Health Organization definió en el año 2010, los PanIN como lesiones microscópicas, planas o papilares, no invasivas, con un epitelio no invasor, caracterizadas por contener una cantidad variable de mucina y de grados de atipia citológica y arquitectural²¹. Tal y como se muestra en la figura 3, la secuencia evolutiva histológica de la progresión de los PanIN hacia el ADCP se define de la siguiente manera. A partir de un ducto pancreático con un epitelio monoestratificado cuboidal, en la lesión PanIN1, se observan ductos con cambios mucinosos en las células del epitelio ductal, sin identificarse displasia. En la lesión PanIN 2 se observa un acúmulo de mucina citoplasmática asociado a displasia citológica, en forma de aumento del tamaño de los núcleos e inicio de pérdida de su polaridad y el inicio de pseudoestratificación de las células. En la lesión PanIN3 (o carcinoma in situ), se añade a la displasia celular grave (pérdida total de la polaridad de núcleos, y presencia de mitosis frecuentes) una displasia arquitectural con formación de pseudopapilas intraluminales. Finalmente, en el ADCP se observan glándulas neoplásicas mal definidas, con ruptura de su

membrana basal ductal y crecimiento invasivo hacia el tejido estromal circundante, de aspecto desmoplásico.

En cuanto al análisis genético, se han descrito también una serie de alteraciones genéticas secuenciales en las lesiones PanIN hacia la carcinogénesis, que involucran la activación de oncogenes y la inhibición de genes supresores de tumores (ver Fig.4). Los oncogenes son genes que estimulan la proliferación celular no controlada cuando son activados. Actúan de manera dominante y pueden ser activados por una variedad de mecanismos: por mutación intragénica o amplificación génica²².

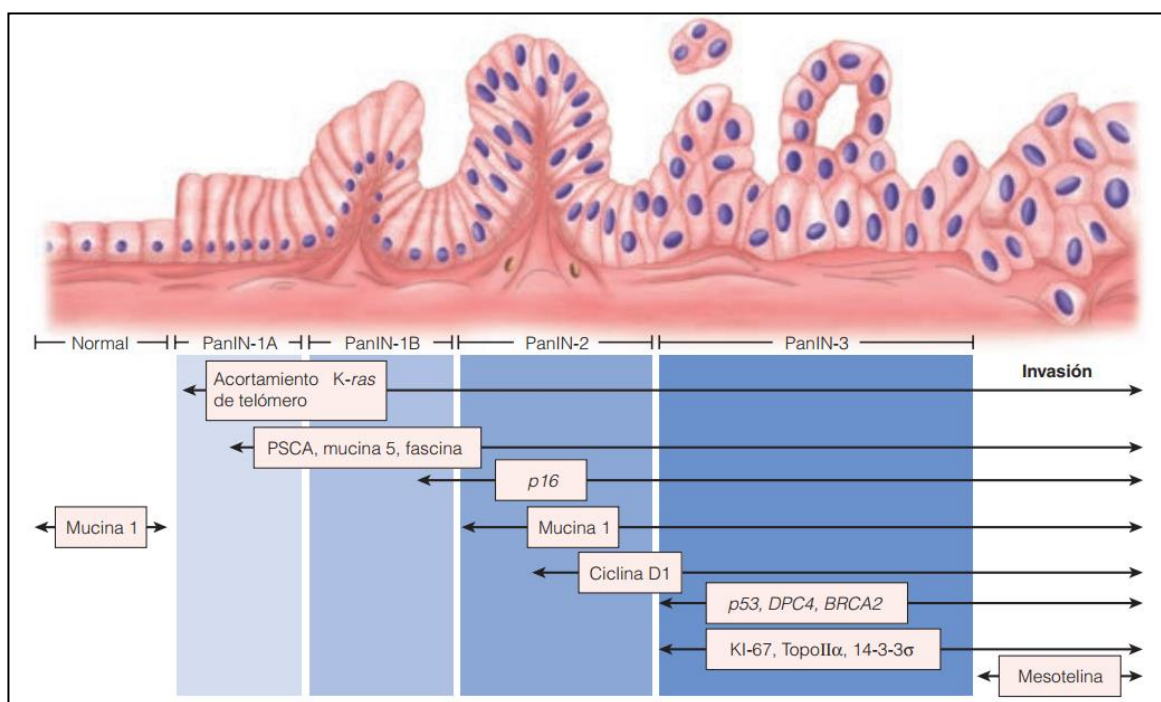


Fig. 4.- Evolución de las lesiones preneoplásicas PanIN en humanos. Se observa la correlación entre la variación en el fenotipo de la lesión (progresión en el grado de PanIN) con el acúmulo de anomalías genéticas. Las mutaciones en el oncogén Kras ocurren de forma temprana en la secuencia PanIN, mientras que la pérdida de la función del gen supresor de tumores p53 que regula la apoptosis es un evento tardío. (Adaptado de: Hruban R. et al²³)

El oncogén Kras está mutado en el 90% de los ADCP humanos, estimulando la síntesis de la proteína de señalización GTPasa que codifica^{24,25}. Un metaanálisis de las mutaciones que presenta en las lesiones PanIN observadas en el contexto de ADCP demostró un 30% de mutaciones de Kras en PanIN 1a, más del 40% de PanIN 1b y casi 90% en PanIN2 y PanIN 3. Estos hallazgos demuestran que la mutación de Kras es una de las anomalías genéticas más tempranas en la secuencia PanIN y en la carcinogénesis pancreática, y además su activación es fundamental para el mantenimiento de la neoplasia²⁶. Otra alteración genética básica para la iniciación de la carcinogénesis del ADCP en relación con la secuencia PanIN es el acortamiento de los telómeros y la inestabilidad genómica que supone. Los telómeros son repeticiones cortas de secuencia de ADN, presentes al final de los cromosomas, que protegen de mutaciones genéticas durante la división celular. El acortamiento de telómeros se encuentra en más del 90% de los PanIN 1a y en más del 95% de todas las lesiones tipo PanIN²⁷.

El gen TP53 es el gen supresor de tumores que con mayor frecuencia se inactiva en muchos cánceres. De hecho, se encuentra inactivado en el 50-75% de los carcinomas pancreáticos^{28,29}. Sin embargo, parece que este evento es muy tardío ya que sólo se observa en proporciones variables en las lesiones PanIN-3³⁰. Más adelante se describirá la relación entre la mutación del oncogén TP53 con la apoptosis, y su importancia en la progresión hacia ADCP.

Otras mutaciones implicadas en la secuencia PanIN son las de los oncogenes INK4A, p16 y SMAD4, que aceleran el desarrollo tumoral hacia un comportamiento invasivo en estadios tardíos de las lesiones neoplásicas. La proteína PDC4 está implicada en la

alteración de la vía del factor de crecimiento beta (BGF). Está presente en lesiones PanIN 1 y PanIN 2, pero se observa una pérdida de SMAD4 tras la mutación de ambas copias del gen PDC4 en un 30% de lesiones PanIN 3, lo que indica un evento genético tardío en la carcinogénesis pancreática¹⁰.

En diferentes estudios, se ha descrito la existencia de un patrón genético similar en las células acinares con características fenotípicas "ductal-like" y en lesiones PanIN, con expresión de genes diana Notch y expresión del receptor de factor de crecimiento ErbB2, y pErk. Estos datos confirman el origen acinar de los PanINs^{16,31,32}, aunque se pueden expresar también en ocasiones marcadores de diferenciación ductal³³. Es decir, los PanINs se originan bien a través de dediferenciación o transdiferenciación desde sus precursores acinares^{34,35}, como se ampliará más adelante.

Lesiones IPMN y MCN

Los IPMNs y MCNs pertenecen al grupo de tumores quísticos del páncreas, que representan entre el 10-15 % de todos los tumores primarios del páncreas³⁶. Sin embargo, cada vez se diagnostican más, debido a la mejora en las últimas décadas de las técnicas de imagen³⁷, aproximándose a las observaciones del trabajo de Kimura *et al.*³⁸ sobre páncreas examinados post-mortem, en el que describen lesiones quísticas hasta en el 25% de los casos.

Comparten cambios morfológicos del epitelio similares. Macroscópicamente, son císticos y, desde el punto de vista microscópico, se agrupan lesiones epiteliales con poca atipia (adenomas), lesiones con displasia moderada, lesiones con

displasia severa (carcinoma in situ) y lesiones tipo carcinoma invasivo^{39,40}.

Los IPMN son el tumor quístico más común del páncreas. Se definen como neoplasias no invasivas epiteliales, productoras de mucina, que se generan del ducto pancreático principal o de secundarios. Son predominantemente papilares, y raramente planos²¹ (ver Fig.5, A).

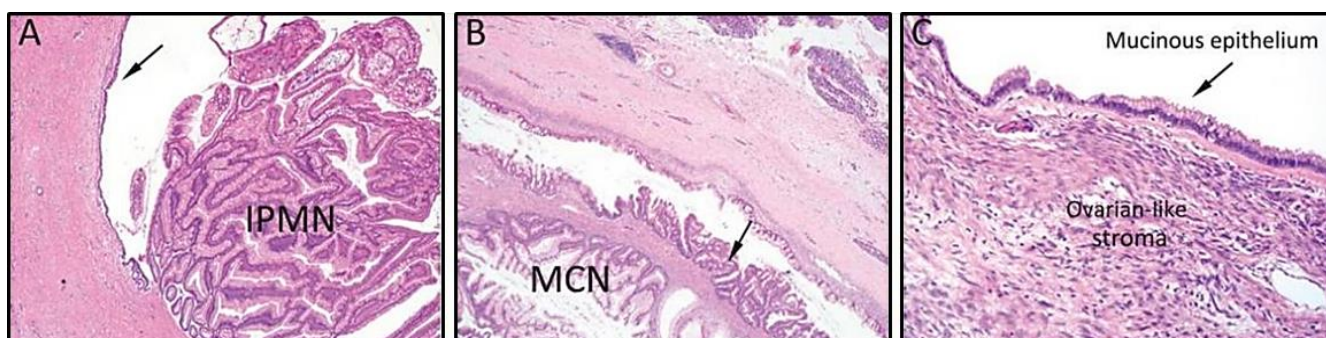


Fig. 5.- Precursores quísticos de cáncer pancreático. A: IPMN, desarrollado a partir de células ductales originadas del conducto pancreático principal (flecha) dando lugar a una dilatación y obstrucción del mismo por el tumor. B: MCN sin relación con el conducto pancreático principal. Se muestra una zona intralesinonal de displasia celular de alto grado (flecha). C: Detalle de foto previa, donde se muestra el característico estroma de tipo ovárico subyacente al epitelio (flecha) de los MCN. (Adaptado de; Iacobuzio-Donahue²⁰)

Predominan en el sexo masculino, con mayor incidencia en la sexta y séptima décadas de la vida. El 80% se desarrollan en la cabeza del páncreas⁴⁰. Se distinguen cuatro subtipos histológicos por las características de su epitelio: tipo foveolar gástrico (MUC1 , MUC2), tipo intestinal (MUC1, MUC2 + y CDX2 +), tipo pancreaticobiliar (MUC1 +, MUC2, CDX2) y tipo oncocítico (expresión variable de MUC1 y MUC2)⁴¹. El tipo intestinal es el más común y generalmente afecta al conducto pancreático principal. Los de tipo

carcinoma invasivo tienen un pronóstico más favorable que el ADCP clásico⁴².

Los MCN representan el 8% de todas las neoplasias quísticas pancreáticas⁴³. Se presentan casi de forma exclusiva en mujeres entre los 40 y los 50 años. El 90% de estos tumores asientan en el cuerpo y la cola, y no muestran ninguna conexión con los ductos pancreáticos. La identificación histológica del estroma específico de tipo ovárico es característica de estos tumores. (ver Fig.5, B). El epitelio del revestimiento es de tipo mucinoso⁴⁴.

El pronóstico para los IPMN y los MCN no invasivos es excelente y la detección e intervención quirúrgica en la fase preinvasiva es curativa^{45,46}. El pronóstico es pobre para los tumores con invasión estromal⁴⁷.

Debido a su naturaleza quística y a su contenido mucinoso, la detección temprana de estos tumores es posible gracias a técnicas radiológicas de imagen y el examen citológico del contenido quístico obtenido por punción endoscópica ecoguiada⁴⁸.

AFL o "lesiones atípicas planas"

Las AFL son lesiones displásicas con potencial también maligno, pero difieren de los PanIN en que no son mucinosas (ver Fig.6).

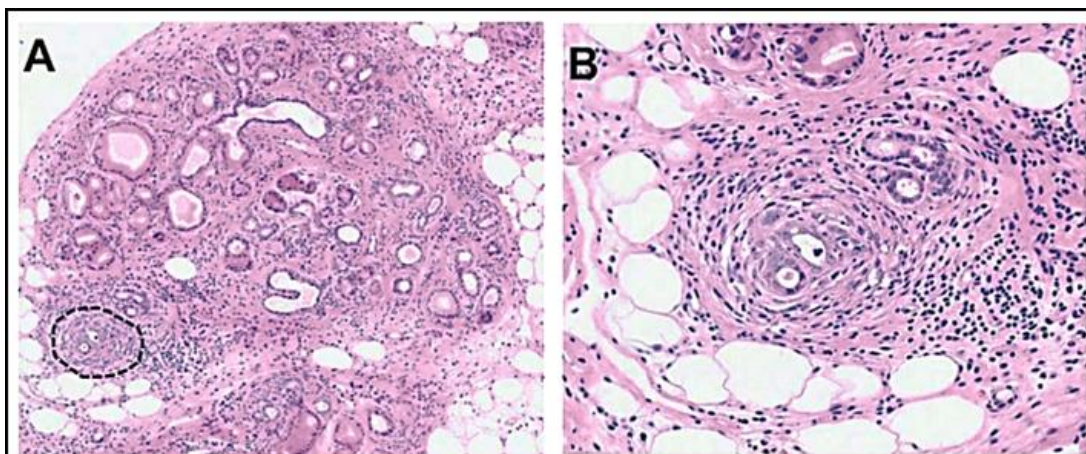


Fig. 6.- Características histológicas de la lesión plana atípica murina (AFL). Se observan como estructuras tubulares, en proximidad de áreas de metaplasia acino-ductal y de estroma desmoplásico. El área punteada en A se muestra ampliada en B, donde se aprecia mejor la displasia celular de la lesión en forma de núcleos celulares aumentados de tamaño e hiper cromáticos. (Adaptado de Aichler et al⁴⁹)

Se definen como una proliferación displásica sobre un epitelio ductal plano en el contexto de metaplasia acino-ductal (MAD) y células inflamatorias, sin cambios mucinosos en el citoplasma de la célula, a diferencia de las lesiones tipo PanIN. También se caracterizan por tener una reacción estromal asociada en la que predominan fibroblastos⁵⁰, a diferencia de la MAD pura o de los cambios reactivos en el epitelio ductal secundarios a un estímulo inflamatorio. Estas lesiones se han descrito en MMGM de ADCP (ver apartado 1.2) y en seres humanos con lesiones preneoplásicas^{49,50}. Según el último consenso de expertos internacionales⁶ se acepta la existencia de AFL, tanto en el MMGM LSL-Kras G12D/+, en Ptf1a-Cre ex1/+ a partir de las 8 semanas de edad, como en seres humanos (muestras de pacientes con historia familiar de ADCP)⁵¹.

En estas lesiones se ha comprobado la desregulación de p53, la pérdida de expresión de Pdx1, la activación estromal (aumento del

índice de proliferación Ki67) o la delección del exón 2, junto con otras características genéticas específicas también en el ADCP. Sin embargo, son lesiones no invasivas, sin interrupción de la membrana celular basal, y con una estructura lobular conservada⁴⁹.

Relación entre pérdida de la función del oncogén p53 y la apoptosis

Como se ha comentado con anterioridad, la pérdida de función de p53 es un evento tardío en la progresión del ADCP³⁰. La inactivación de este gen supresor de tumores provoca una desregulación de la muerte celular y de la división celular^{30,51}.

La apoptosis se define como una forma fisiológica programada de muerte celular. Está caracterizada por una variedad de cambios bioquímicos mediados por las cisteína- aspartasas (caspasas). Se han descrito dos vías que conducen a la activación de las caspasas: la extrínseca, iniciada por la unión de receptores de muerte transmembrana, y la intrínseca, que requiere la interrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C junto con otras proteínas mitocondriales⁵². El gen supresor de tumores p53 es el integrador central de la apoptosis, de la respuesta celular al daño del ADN, la transformación oncogénica y la respuesta en relación a factores de crecimiento⁵²⁻⁵⁴. La apoptosis está implicada también en la reversión de la hipertrofia a atrofia, en la destrucción inmunológica de células preneoplásicas, de células infectadas y en la destrucción de las células tumorales mediante quimioterapia o radioterapia convencionales^{55,56}. En presencia de una mutación en el oncogén Kras, se desarrollará un ADCP cuando coexista mutación de un alelo de p53 en células acinares, o los 2 alelos en células ductales aunque, como ya se ha comentado, la alteración de p53 es un evento tardío en la oncogénesis del ADCP, por lo que

es posible que haya otros factores epigenéticos asociados al desarrollo del ADCP desde línea ductal^{57,58}.

Es importante destacar que la apoptosis se ha descrito de manera exhaustiva, en las últimas décadas, como el mecanismo predominante en la inducción de la atrofia del páncreas exocrino relacionada con la ligadura del conducto pancreático mayor⁵⁹⁻⁶¹, procedimiento principal y motivo de este estudio.

Reprogramación acino-ductal y metaplasia acino-ductal. Factores de transcripción NR5A2 y PTF1a.

La identidad celular pancreática exocrina (acinar y ductal) y endocrina (células α , β , δ , ϵ , y PP) se determina en la embriogénesis a través de una cascada de factores reguladores de transcripción genética, llamada Pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1)⁶². Posteriormente, en la diferenciación hacia líneas celulares específicas pancreáticas intervienen otros factores reguladores. Muchos de ellos continúan modulando la expresión genética y la identidad celular en el órgano adulto⁶³. La identidad celular exocrina depende principalmente de una cascada transcripcional que incluye al complejo Ptf1a, Mist1, y Nr5a2⁶⁴⁻⁶⁷ mientras que la identidad ductal está regulada y mantenida principalmente por factores de transcripción como; Sox9, Hnf6, y Hnf1b⁶⁸⁻⁷³. Pero las células pancreáticas maduras pueden perder sus características funcionales por un proceso de *desdiferenciación* bajo influencias de estrés celular de causas epigenéticas, genéticas o ambientales (como la inflamación). La llamada "metaplasia acino-ductal" o "duct-like cells" consiste en la desdiferenciación acinar hacia un fenotipo y genotipo celular de tipo ductal. Este cambio puede ser transitorio y reversible^{74,75}. Sin embargo, si persiste el estrés celular, la desdiferenciación celular puede evolucionar hacia

la senescencia funcional, hacia la *transdiferenciación* o la transformación de la célula en otra línea celular (ver Fig.7), hecho que puede conllevar el desarrollo de enfermedad pancreática (por ej.: aparición de diabetes o de ADCP)⁷⁶.

Así, tras numerosos estudios con MMGM se ha comprobado que la alteración de los factores que mantienen la identidad y función del compartimento acinar se asocian con la aparición de la MAD. En concreto, la pérdida de expresión del complejo Ptf1a⁶⁴⁻⁶⁷, del factor Mist 1^{77,78}, y del factor transcripcional Nr5a2³⁴ convierte las células acinares en células con fenotipo ductal.

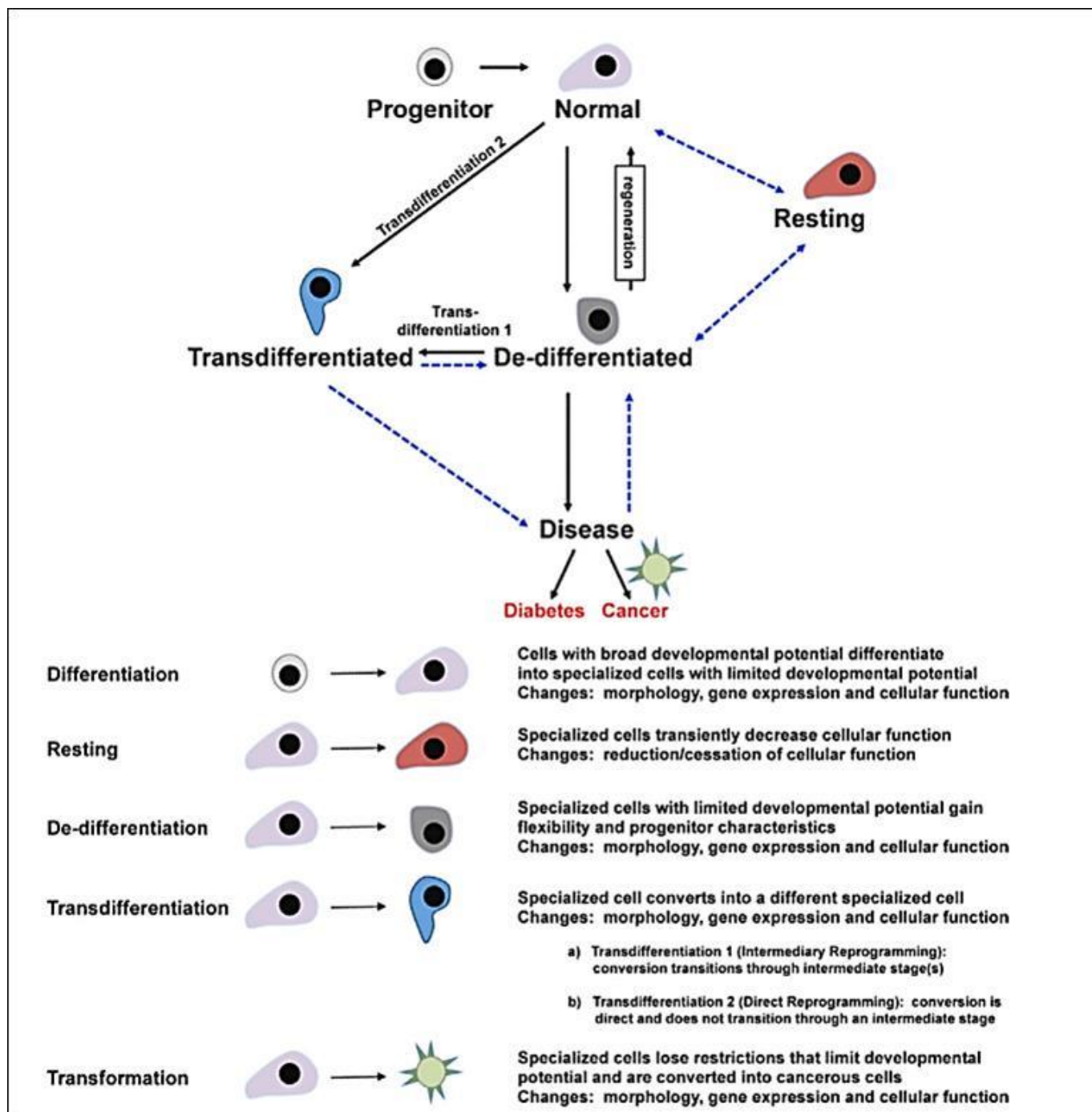


Fig. 7.- Transición entre diferentes estados celulares en respuesta al estrés o daño celular. La transición hacia un diferente fenotipo (transdiferenciación) puede ocurrir de forma directa o mediante un estado intermedio de desdiferenciación. Asimismo, sería posible como hipótesis un estado de letargo celular en el cual la célula interrumpe su funcionamiento normal pero manteniendo características de su identidad celular, y del que puede revertir hacia un estado plenamente funcional. El estrés prolongado o la activación de vías oncogénicas pueden convertir una célula desdiferenciada o transdiferenciada en una célula patológica. Las flechas azules indican posibles cambios de identidad celular. (Adaptado de Puri *et al.*^{63,76})

En diferentes estudios se ha descrito la existencia de un patrón genético similar entre las células acinares y en las lesiones PanIN, con cambios de expresión de genes diana Notch y del receptor de factor de crecimiento ErbB2 y pErk^{16,31}. Se ha descrito, además, el papel del gen Sox9 que participa en el mantenimiento de la identidad celular ductal y en la formación de lesiones precursoras de ADCP originadas a partir de células acinares en un estado "duct-like"³². En dos trabajos recientes; el de Cheng *et al.*⁷⁹, y el de Shi *et al.*⁸⁰, se utiliza la PDL en modelo murino tumoral para estudiar la línea celular de origen del ADCP. En ambos se describe la presencia de MAD, y se sugiere que las lesiones preneoplásicas observadas son de origen ductal, como se revisará con detalle en la Discusión.

En relación a la transdiferenciación celular, también se ha estudiado el compartimento celular centroacinar (CCC) como posible factor etiológico en el ADCP^{49,81,82} a través de la expresión genética del factor de transcripción Sox9^{32,83}, Hes1, un efector de la vía Notch⁸⁴, o a través de una metaplasia ductal en estudios con MMGM "knock out" para el gen supresor de tumores Pten⁸⁵. Hasta la fecha, todavía no se conoce el mecanismo que correlaciona todos estos factores oncogénicos.

1.1.3.3 Influencia de la inflamación

En el hombre, y en modelos animales experimentales, cualquier procedimiento quirúrgico provoca un estímulo proinflamatorio con liberación de citoquinas y factores de crecimiento⁸⁶.

Además, en los mismos modelos, se ha constatado que la inflamación crónica del páncreas es prooncogénica^{26,87,88}. Así, se ha descrito que las lesiones preneoplásicas pancreáticas tipo PanIN en modelos murinos con *Kras* mutante se desarrollan y progresan más rápido cuando se provoca una pancreatitis aguda o crónica con ceruleína, un análogo de la colecistoquinina. Se ha observado que cuando la activación es inducida con doxiciclina, incluso en ratones adultos^{16,89-91} se produce una progresión a ADCP invasivo en el contexto de pancreatitis crónica o delección de *Tp53*^{16,92}. La activación del oncogén *Kras* en MMGM tiene el potencial de alterar a la célula acinar que se encuentra en este estado de dediferenciación para iniciar la formación de lesiones PanIN con fenotipo ductal^{32,90}, lo cual se considera un evento significativo en la progresión tumoral^{32,93}. Como ya se ha comentado, el factor de identidad ductal *Sox9* se sinergia con el *Kras* mutado para acelerar esta reprogramación celular³². La inflamación podría contribuir en la progresión de los PanIN mediante la eliminación de la barrera fisiológica de senescencia celular²⁶.

Los mecanismos por los que la inflamación interfiere en la homeostasis normal del páncreas hacia estados prooncogénicos aún no están bien definidos. Por otra parte, se admite que la dediferenciación celular presente en la MAD supone un estado transicional en el cual las células acinares adquieren propiedades ductales no absolutamente equivalentes a las de una célula pluripotencial, pero sí con capacidad de regeneración en un

contexto de daño pancreático, la cual depende de la interacción con células del sistema inmune que actúan como reguladoras de la transdiferenciación⁹⁴. Hay evidencia de que tras la inducción de una pancreatitis aguda con ceruleína en los MMGM a Kras, las células acinares se desdiferencian y posteriormente son capaces de regenerarse⁹⁵. En otro estudio publicado se realiza un marcaje molecular y se analiza la evolución de las células acinares después de practicar una ligadura del ducto pancreático principal (PDL) en MMGM adultos⁹⁶. En él se demostró que mientras la mayoría de las células acinares desaparecían, algunas adquirirían la firma molecular de progenitoras multipotenciales presentes habitualmente durante el desarrollo embrionario en los extremos de los conductos del árbol pancreático. La multipotencialidad de estas células se ha confirmado tras detectarse diferenciación hacia células exocrinas y endocrinas, y se ha sugerido que la amplitud del daño celular sería el determinante de la capacidad de estas células de cambiar su identidad celular⁹².

En este contexto, la desdiferenciación acinar de la MAD podría también interpretarse como una respuesta adaptativa a un estímulo de estrés celular como la inflamación, que impide la actividad proenzimática habitual de la célula acinar, para evitar la progresión hacia la disfunción y muerte celular⁷⁶.

Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios experimentales diseñados para valorar el riesgo prooncogénico que podría suponer el componente de pancreatitis leve presente tras un acto quirúrgico terapéutico, ni tampoco tras la ligadura del ducto pancreático principal en modelos murinos, y su posible influencia en la progresión de lesiones preneoplásicas ya existentes en el páncreas.

1.1.4 Tratamiento del ADCP

El tratamiento curativo del ADCP se basa fundamentalmente en la resección quirúrgica mediante pancreatoclectomía radical del segmento de páncreas donde se localiza el cáncer. Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, solamente entre el 15-20% de los ADCP son resecables en el momento del diagnóstico.

En el 60-70% de los casos el ADCP se encuentra localizado en la cabeza de páncreas, a la derecha del confluente venoso mesentérico-portal (ver Figs. 2 y 8).

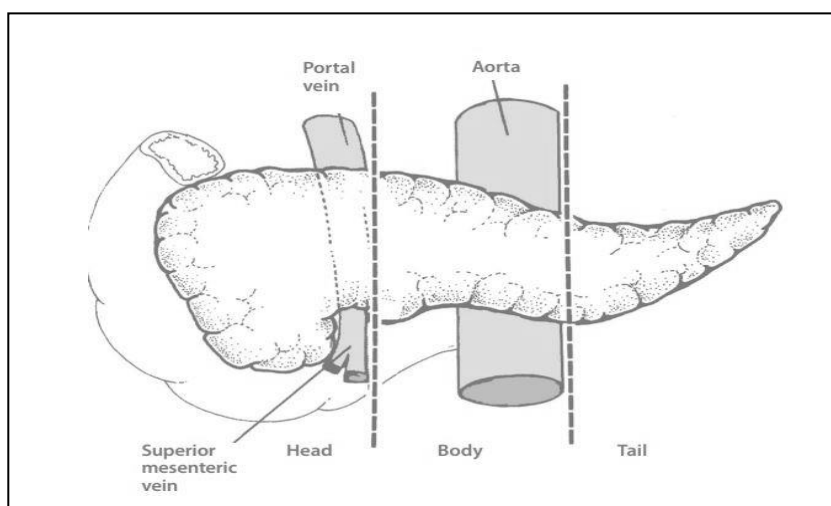


Fig. 8.- División morfológica del páncreas. La cabeza se sitúa a la derecha del confluente venoso espleno-porto-mesentérico. (Adaptado de; <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/Pancreas>, AMJCC 7th Edition, 2009).

Los adenocarcinomas localizados en esta región pueden implicar una estenosis y/u obstrucción de los sistemas de drenaje biliar (conducto colédoco) y jugo pancreático (conducto de Wirsung), y

en el caso de lesiones localmente avanzadas invaden localmente grandes vasos; arteria y vena mesentéricas superiores, vena porta, vasos esplénicos, el tronco celiaco, duodeno y ampolla de Váter haciendo en muchos casos difícil o inviable una resección radical⁹⁸.

Desafortunadamente, en el momento actual, no existen marcadores moleculares que hayan demostrado su eficacia en la detección precoz del ADCP y que permitan aumentar las tasas de resecabilidad y por lo tanto de supervivencia^{10,99}. En este contexto, el tamaño tumoral, la resecabilidad o extirpación completa, reflejados en la clasificación TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC), y el grado histológico son los principales factores pronósticos de supervivencia¹⁰⁰.

La clasificación TNM define los estadios del cáncer de páncreas (tanto exocrino como endocrino) en función de la invasión local o T (tumor), la invasión locorregional o N (ganglios afectados), y a distancia de la enfermedad o M (metástasis; M0 ausencia, vs. M1 presencia) con objeto de definir su resecabilidad y opciones de tratamiento (ver Tabla 1)¹⁰¹.

Tabla 1.- Clasificación TNM de los tumores pancreáticos. (Adaptado de; AJCC 8th Edition Cancer Staging System¹⁰¹)

T1	Tumour 2 cm or less	M category unchanged		
T1a	Tumour 0.5 cm or less	Stage		
T1b	Tumour greater than 0.5 cm and less than 1 cm	Stage IA	T1	N0 M0
T1c	Tumor greater than 1 cm but no more than 2 cm	Stage IB	T2	N0 M0
T2	Tumour more than 2 cm but no more than 4 cm	Stage IIA	T3	N0 M0
T3	Tumour more than 4 cm in greatest dimension	Stage IIB	T1, T2, T3	N1 M0
T4	Tumour involves coeliac axis, superior mesenteric artery and/or common hepatic artery	Stage III	T1, T2, T3	N2 M0
N1	Metastases in 1 to 3 nodes		T4	Any N M0
N2	Metastases in 4 or more nodes	Stage IV	Any T	Any N M1

En el caso de tumores resecables, en base a la localización del ADCP en la glándula pancreática se utilizan diferentes técnicas quirúrgicas terapéuticas:

1.1.4.1 Intervención de Whipple o duodenopancreatectomía cefálica

Esta técnica se utiliza si el ADCP se localiza en la cabeza o proceso uncinado del páncreas. Es la más utilizada, ya que el tumor se localiza en este segmento pancreático en la mayoría de los casos¹⁰². La duodenopancreatectomía fue realizada inicialmente por Kausch¹⁰³ y desarrollada posteriormente por Whipple y colaboradores en 1946, cuando se popularizó¹⁰⁴. Consiste en la resección del antro gástrico, la vesícula biliar con el conducto cístico, del conducto biliar principal o colédoco, de la cabeza y del proceso uncinado del páncreas, del duodeno, y de un segmento proximal de yeyuno, asociando una linfadenectomía de los ganglios linfáticos peripancreáticos (ver fig. 9, A).

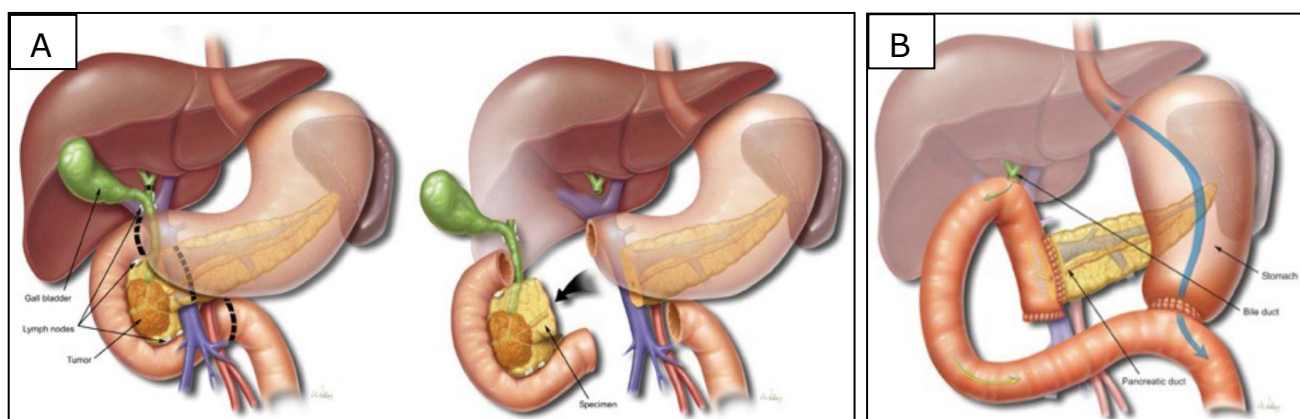


Fig. 9.- (A) Fase exerética en la intervención de Whipple para el cáncer de cabeza de páncreas. (B) Fase reconstructiva en la intervención de Whipple para el cáncer de cabeza de páncreas (técnica de reconstrucción en una sola asa). (Adaptado de; <https://www.bcm.edu/healthcare/care-centers/pancreas-center/procedures>, by Scott Weldon)

La reconstrucción se realiza habitualmente mediante tres anastomosis: la del remanente pancreático al yeyuno o al estómago (pancreatoyeyunostomía, o pancreatogastrostomía, respectivamente), la del conducto hepático común al yeyuno (hepaticoyeyunostomía) y, por último, una gastroyeyunostomía o anastomosis que reestablece el tránsito digestivo entre el estómago y el yeyuno (ver Fig. 9, B). Como variante técnica, es factible a nivel oncológico y técnico la duodenopancreatectomía con preservación pilórica, descrita inicialmente por Watson¹⁰⁵, que evita la resección del antro gástrico y preserva el píloro practicando la sección proximal a nivel postpilórico. Van Berge Henegouwen *et al.* describió en 1998 una menor atrofia exocrina y endocrina (del 56% y 25% respectivamente) en relación con la pancreatectomía sin preservación pilórica (73% y 20% respectivamente)¹⁰⁶.

1.1.4.2. Pancreatectomía distal

Se utiliza si el tumor se localiza en el cuerpo o cola pancreáticos. Se realiza una disección y resección de la glándula pancreática a la izquierda del eje mesentérico portal, con linfadenectomía de los ganglios linfáticos peripancreáticos y del hilio esplénico, con o sin esplenectomía asociada (ver Fig.10).

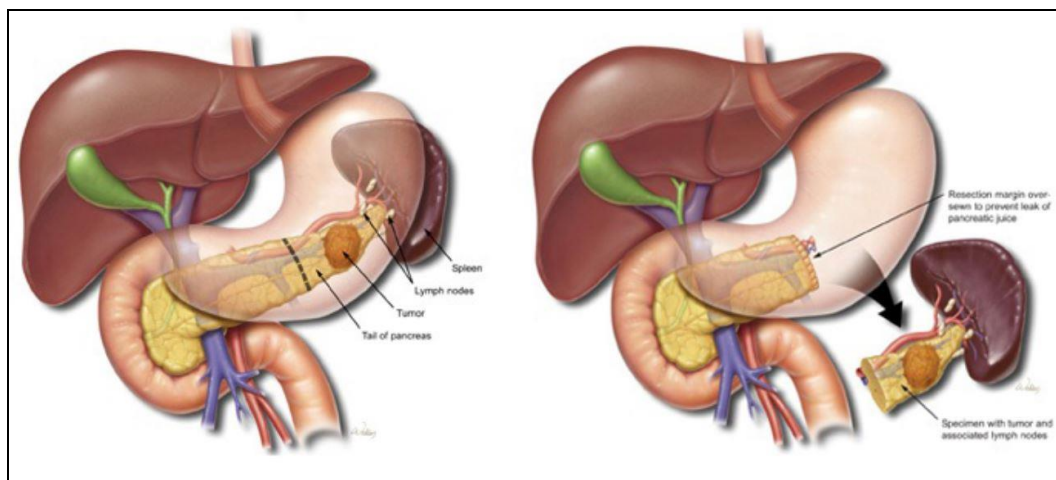


Fig. 10.- Pancreatectomía distal con esplenectomía, para un tumor de cola de páncreas. (Adaptado de; <https://www.bcm.edu/healthcare/care-centers/pancreas-center/procedures>, by Scott Weldon)

En el año 2003, Strasberg et al. describieron la esplenopancreatectomía radical modular anterógrada (RAMPS), una técnica de resección más radical y segura oncológicamente (ver Fig. 11)¹⁰⁷.

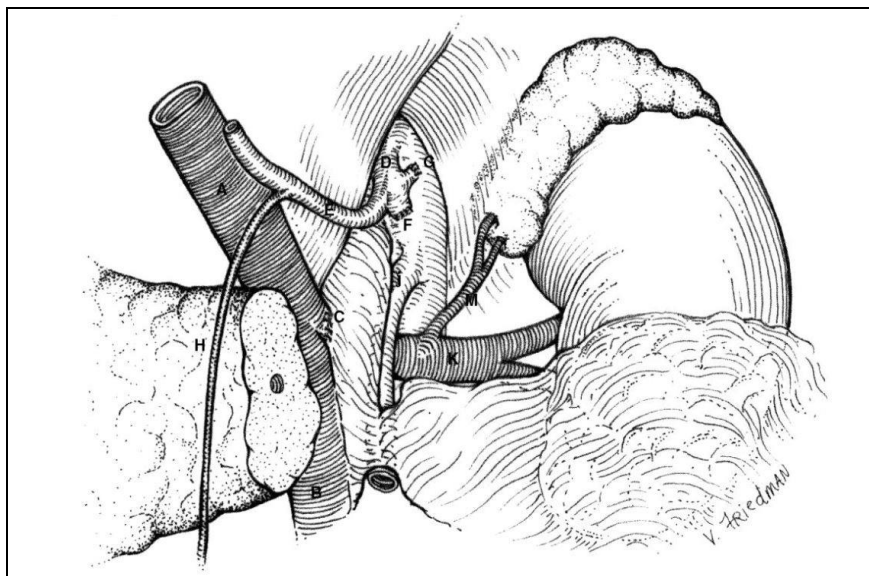


Fig. 11.- Fase exerética en una RAMPS a la glándula suprarrenal izquierda, según técnica descrita por Strasberg¹⁰⁷. A: vena porta; B: vena mesentérica superior; C: muñón de la vena esplénica; D: tronco celíaco; E: arteria hepática común; F: muñón de la arteria esplénica; G: muñón de la arteria gástrica izquierda; H: arteria gastroduodenal; J: arteria mesentérica superior; K: vena renal izquierda; M: vena suprarrenal.

1.1.4.3. Complicaciones postoperatorias

La complicación más frecuente tras una pancreatectomía es la gastroparesia o el retardo del vaciamiento gástrico hacia intestino delgado, y la más significativa por su potencial morbimortalidad es la fístula o fuga de líquido pancreático desde el remanente pancreático^{108,109}. Esta última puede tener un impacto clínico muy variable, desde la ausencia de síntomas hasta la necesidad de reintervención quirúrgica urgente por hemorragia o sepsis, según se especifica en la clasificación del International Study Group for Pancreatic Fistula (ISGPF), y su prevalencia es muy variable oscilando entre el 2 y el 20% según lo revisado por este grupo¹⁰⁹. Las fístulas en las anastomosis pancreatoentérica son más comunes cuando el conducto pancreático de Wirsung es pequeño

(menor o igual a 3 mm) y la glándula es de consistencia muy blanda¹¹⁰.

Las pancreatitis agudas en el postoperatorio de una pancreatectomía son resultado de la activación enzimática de líquido pancreático en el interior de la glándula durante o tras la intervención, que causa su inflamación. Puede evolucionar de forma aguda o crónica hacia la formación de colecciones líquidas o hacia la necrosis del tejido pancreático y adiposo peripancreático, y complicarse potencialmente con la sobreinfección de ambas y/o un síndrome de respuesta inflamatoria sistémico grave¹⁰⁹.

1.1.4.4. Otros tratamientos asociados

El tratamiento con radio-quimioterapia neoadyuvante puede estar indicado en pacientes localmente irreseccables por afectación venosa y sin enfermedad a distancia o borderline¹¹¹. Actualmente el tratamiento mediante quimioterapia adyuvante está indicado en todos los pacientes sometidos a cirugía con intención curativa^{99,112}. Los últimos avances en dianas para terapias no quirúrgicas incluyen las inmunoterapias específicas, como neoadyuvancia o paliación en el tratamiento del ADCP. Sin embargo, a diferencia de otros tumores, no hay evidencia de beneficios clínicos en estudios clínicos en pacientes con ADCP avanzado. Ésto se atribuye a una falta de estímulos inmunológicos (falta de infiltración linfocitaria del tumor, así como un alto número de mutaciones somáticas) que dificultan la acción dirigida de las nuevas moléculas¹¹³⁻¹¹⁵. Sin embargo, recientemente Bailey *et al.* han definido 4 subtipos de cáncer pancreático en base a su análisis molecular, y uno de ellos parece ser más inmunogénico que los demás y, por ende, más susceptible de ser tratado mediante inmunoterapias específicas¹¹⁶. Actualmente se han publicado varios estudios clínicos que evalúan

nuevas terapias en este subtipo de cáncer, con inestabilidad de microsatélites. En concreto, Le Dung *et al.* estudiaron varias moléculas inhibidoras de un factor antiapoptótico, el PD-L1 (programmed death 1-ligando) desde 2015 a la actualidad en el tratamiento del ADCP metastásico, en primer lugar con pembrolizumab, con un tasa de respuesta inmune relacionada del 71%^{117,118} y posteriormente con durvalumab (estudio clínico de fase II en curso; *A Phase Ib and II Open-Label, Multi-Center Study of MEDI4736 Evaluated in Different Combinations in Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*, NCT02583477).

1.1.4.5. Oclusión del conducto de Wirsung en la práctica clínica

La intervención de Whipple fue descrita en 1935 como una duodenopancreatectomía con oclusión del conducto pancreático principal o conducto de Wirsung del remanente pancreático (ver Fig. 12)¹⁰⁴.

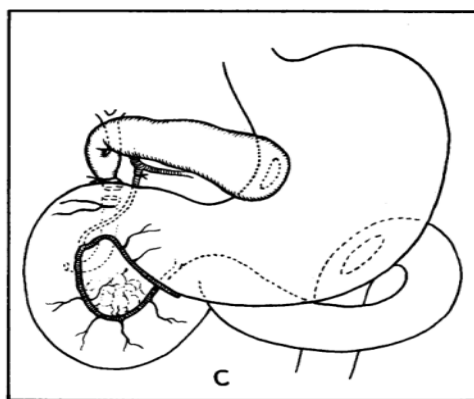


Fig. 12.- Ligadura de los ductos de Wirsung y Santorini, según técnica original descrita en 1935 por Whipple. (Adaptado de; Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater. Ann Surg. 1935¹⁰⁴)

En 1971 Goldsmith *et al.*¹¹⁹ publicó un estudio en que comparaba la eficiencia de la anastomosis y la ligadura tras realizar una duodenopancreatectomía con índices de fístula pancreática similares para ambos procedimientos.

Entre los años 1970 y 1980 se describen múltiples casos de utilización de la oclusión ductal quirúrgica del ducto pancreático para evitar el dolor a pacientes en casos de pancreatitis crónica, sin aparición de fístula pancreática o diabetes posterior en los pacientes, como se muestran en las figuras a continuación (ver Fig. 13 y 14)¹²⁰⁻¹²².

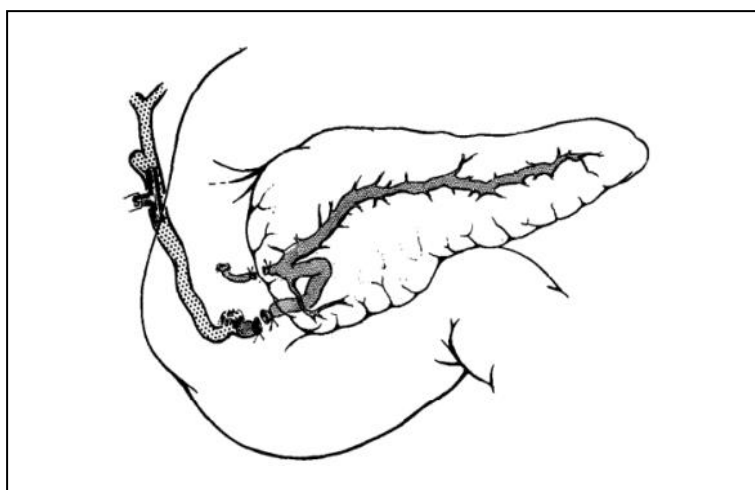


Fig. 13.- Ligadura de los conductos de Wirsung y Santorini en el tratamiento de un paciente con pancreatitis crónica, como alternativa a la resección pancreática, en un caso publicado en 1955 por J.A. Cannon. (Adaptado de; Cannon *et al.*¹²²)

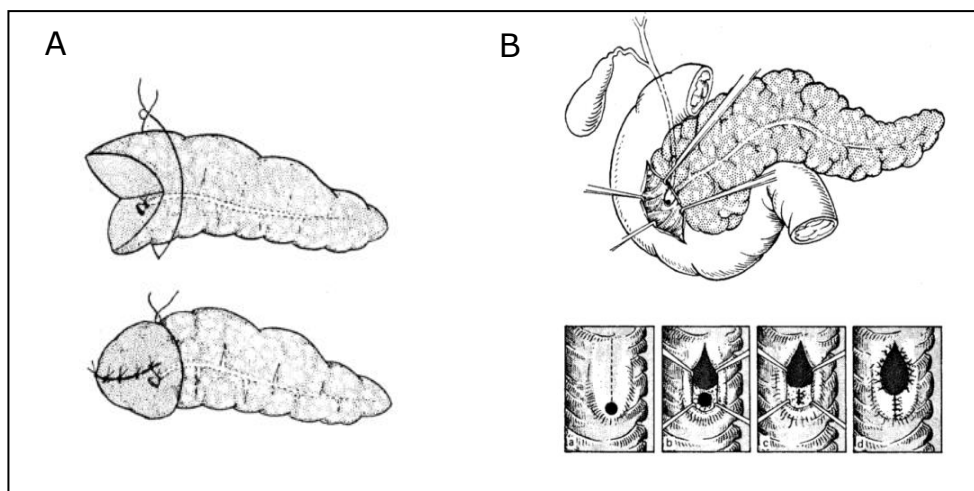


Fig. 14.- Ligadura del conducto de Wirsung. A: Ligadura del Wirsung y posterior sutura del parénquima pancreático seccionado transversal y en masa. B: Ligadura transduodenal del Wirsung. Técnica empleada en el tratamiento quirúrgico de pacientes con pancreatitis crónica, según descrito en 1977 por E. Hoffman. (Adaptado de; Hoffmann *et al.*¹²¹)

La ligadura del ducto quedó en desuso hasta los años 90 en que se publicaron revisiones sobre la duodenopancreatectomía para evitar la anastomosis pancreática. Sin embargo, aunque la mayoría de los estudios relacionaba la ligadura del ducto a índices de fístula mayores¹²³, había otros estudios retrospectivos controvertidos, en los que los valores de incidencia de fístula eran similares entre procedimientos^{124,125}.

Gall *et al.* validaron clínicamente en 1990 la idea de Gebhardt *et al.*¹²⁶, los cuales emplearon en modelo canino una solución alcohólica de prolamina (Ethibloc) para desencadenar la atrofia exocrina del páncreas tras la obstrucción del conducto sugiriendo preservación de la viabilidad endocrina. Esta sustancia se solidificaba y reabsorbía a los 11 días, y conllevó la eliminación de la anastomosis pancreaticoyeyunal durante años. Gall describió la utilización de este pegamento en 328 pacientes, con unas tasas de

1,2% de mortalidad y 12,7% de morbilidad¹²⁷. La oclusión del ducto con pegamentos condujo a la disminución de la tasa de mortalidad y morbilidad asociada. No obstante, tal y como sugieren dos estudios randomizados recientes^{128,129}, las tasa de complicaciones es todavía muy elevada y algunos estudios alertan del riesgo de pancreatitis hemorrágica si la inyección del pegamento se hace a altas presiones¹³⁰ o con un mal sellado, lo que aumentaría la secreción de jugo pancreático por canalículos secundarios¹³¹.

En el apartado 1.3 se amplía información sobre los mecanismos fisiológicos de inducción de la atrofia exocrina tras ambos procedimientos sobre el ducto pancreático principal.

1.2 MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS

La ausencia de signos clínicos y analíticos dificulta el estudio de la fisiología previa al ADCP en humanos por lo que ya desde los años ochenta los modelos murinos de ADCP se han convertido en un punto clave en la investigación básica sobre el cáncer de páncreas. Estos modelos se han desarrollado de forma progresiva y paralela al avance en investigación básica en la etiopatogenia del ADCP.

Los MMGM se establecieron a partir del año 2003³⁵. Sólo se ha conseguido simular de una forma fehaciente el desarrollo del ADCP humano en el ratón *Mus musculus* induciendo, a través de ingeniería genética, una secuencia de lesiones preneoplásicas similar a la observada en los humanos, con una pérdida tardía de la función de p53.

En el modelo transgénico más conocido^{35,132} desarrollado en 2003 o "ratón de Hingorani": el Pdx-1-Cre, LSL-KrasG12D, la expresión del oncogén Kras resulta inducible. La expresión del alelo activo Kras G12D promueve el desarrollo de la secuencia PanIN¹⁵, así como de lesiones displásicas no mucinosas (AFL)^{12,49} y después de una latencia, el ADCP. Guerra *et al.* desarrolló en 2007 un modelo similar sobre un alelo de Kras inducible -en este caso el KrasG12V- con diana en células acinares, que también provoca la secuencia PanIN hacia ADCP¹⁶.

La inducción del alelo Kras se realiza mediante el "knock-in" de una secuencia genética de "stop" transcripcional en el exón 2 antes de la codificación de Kras. En dicho exón, se muta el codón Gly12 para codificar ácido aspártico (G12D) o valina (G12V), lo cual da lugar a las dos mutaciones más predominantes en el ADCP humano. Ambos alelos condicionales se comportan de forma similar^{16,133} La secuencia de "stop" evita la expresión del alelo Kras mutante, que puede ser reconocida y escindida por una proteína Cre-recombinasa activa. Al cruzar ratones Kras inducible con ratones que expresan la enzima Cre-recombinasa (Pdx1 o Ptf1a), se genera una descendencia que expresará de forma heterocigota el alelo Kras mutado oncogénico en todo el páncreas, en lugar de en una sola célula, como ocurre en el ADCP espontáneo en humanos¹³⁴. Estos animales desarrollan lesiones preneoplásicas tipo PanIN a partir de la semana 2 de vida y conforme los ratones crecen, se observan con mayor frecuencia PanINs de mayor grado. Así, se ha descrito que a los 4-5 meses de vida el 68% de los ductos son anormales, cifra que asciende al 82% a los 9 meses de vida y en muchos de los ratones de más edad, en el parénquima pancreático gran parte de los acinos se sustituyen por estructuras de fenotipo ductal-like (MAD), PanINs y por estroma con presencia de

fibroblastos y células inflamatorias^{15,31,135}. También se observa el desarrollo de lesiones AFL a partir de la semana 10 de vida, sobre las cuales algunos autores sostienen que representan uno de los precursores más probables de ADCP en el MMGM $Kras^{G12D/+}; Ptf1a-Cre^{ex1}$ ^{49,136}.

La reacción fibroinflamatoria observada en la etapa final del desarrollo hacia ADCP es muy similar a la observada en pacientes con cáncer pancreático. Tras una latencia aproximada de un año, estos ratones progresan hacia formas de ADCP invasivo. En estos casos, se desarrolla ascitis hemorrágica, pancreatomegalia y metástasis hepáticas e intraperitoneales^{15,137}.

En años posteriores, los MMGM han ido incorporado mutaciones de acuerdo a los progresivos descubrimientos genéticos. Así por ejemplo, los ratones KPC fueron creados por entrecruzamiento de mutantes K-Ras (G12D) y ratones mutantes p53 (Trp53 (R172H)) que habían sido cruzados con Pdx1-Cre para conseguir la expresión de Cre recombinasa bajo el control del promotor Pdx1. Estos ratones demostraron un fenotipo invasor y metastásico debido a la inactivación del gen supresor de tumores p53, y una esperanza de vida reducida¹³³.

1.3 CAMBIOS HISTOLÓGICOS TRAS LA LIGADURA DUCTAL PANCREÁTICA E IMPLICACIONES CLÍNICAS

En la literatura se ha descrito ya hace más de un siglo que el sellado o la ligadura permanente del conducto pancreático, mediante procedimientos quirúrgicos u otras técnicas, es un procedimiento que induce atrofia y cambios fibróticos en el

parénquima pancreático exocrino, preservando los islotes de Langerhans y los conductos excretores biliares^{59,130,146,138-145}.

En 1977, Little *et al.*¹³⁰ estudiaron el efecto de la PDL mediante alquil-alfa-cianacrilato en un modelo de páncreas canino describiendo una atrofia pancreática reproducible con preservación de los islotes. Además, estos autores observaron un fuerte aumento en la amilasa sérica en cada perro, pero en el examen de autopsia a intervalos mensuales después de la operación, no se observó evidencia de pancreatitis crónica y ninguno de los animales presentó diabetes postquirúrgica.

Posteriormente, en 1983 Isaakson *et al.*¹⁴⁷ publicaron el efecto de la PDL en un modelo murino, también mediante el uso de cianacrilato. Se observó una atrofia secundaria del páncreas exocrino marcada con fibrosis e involución grasa macro y microscópicas. Se estudió además la función exocrina mediante la medición de amilasa y tripsina intraglandular, que se encontró disminuída. La función endocrina, medida mediante insulinemia y glicemia basales, no se alteró y los islotes endocrinos no variaron su histología normal.

En 1995 Watanabe describió y cuantificó de una manera precisa los cambios histológicos tras la ligadura del lóbulo esplénico del páncreas (el de mayor tamaño) en un modelo murino. Describió una atrofia exocrina de hasta el 90% de su volumen inicial al 7º día del procedimiento. Las células acinares atróficas acumularon gránulos de zimógeno, se condensó el citoplasma y el núcleo picnótico, con presencia de macrófagos¹⁴⁰.

Más recientemente, se describió la eliminación de las células acinares mediante mecanismos de apoptosis mediada por el gen

p53, según lo descrito en el apartado 1.1.3. En varios trabajos en los que se realizaba una PDL en modelo murino, se observó la presencia de MAD asociada a proliferación epitelial^{52,139}. Nuestro grupo ha confirmado la activación de esta vía de apoptosis en páncreas distal en modelo murino no tumoral mediante el sellado del conducto pancreático principal. La técnica, publicada en 2014, fue la transección parenquimatosa mediante radiofrecuencia. En dicho modelo se confirmó una elevación de las caspasas al 3º día postoperatorio, observándose una atrofia exocrina masiva distal a la transección al mes de la cirugía, con presencia de MAD. Uno de los objetivos de esta línea inicial de investigación fue analizar la seguridad de la técnica quirúrgica, en términos de desarrollo de complicaciones significativas (en concreto, de fístula pancreática). Tanto en este estudio como en otro previo del año 2013, en el cual se genera una transección similar con radiofrecuencia también en modelo porcino, con resección pancreática distal posterior, se descarta el riesgo de fístula pancreática asociada a la propia técnica quirúrgica^{148,149}.

Dado que la MAD está considerada como una condición previa a la posible aparición de PanINs de bajo grado³⁵ y de AFL^{12,49}, interesaba analizar si a largo plazo se conservaba dicha capacidad proliferativa. Por ello, nuestro grupo diseñó un trabajo, publicado en 2015, para estudiar los cambios tisulares tras la transección pancreática mediante radiofrecuencia con sellado del conducto pancreático principal en modelo porcino (al mes; n=4, y a los 6 meses; n=6). Según se muestra en la figura 15, se describió una sustitución del parénquima pancreático exocrino por tejido adiposo y conectivo, y una reducción significativa del área de MAD (del 56 al 21% en relación al área total en la sección transversal del páncreas, analizado entre el 1º y el 6º mes postoperatorios), con

preservación del componente endocrino⁶⁰, hallazgos en línea con los trabajos previamente comentados.

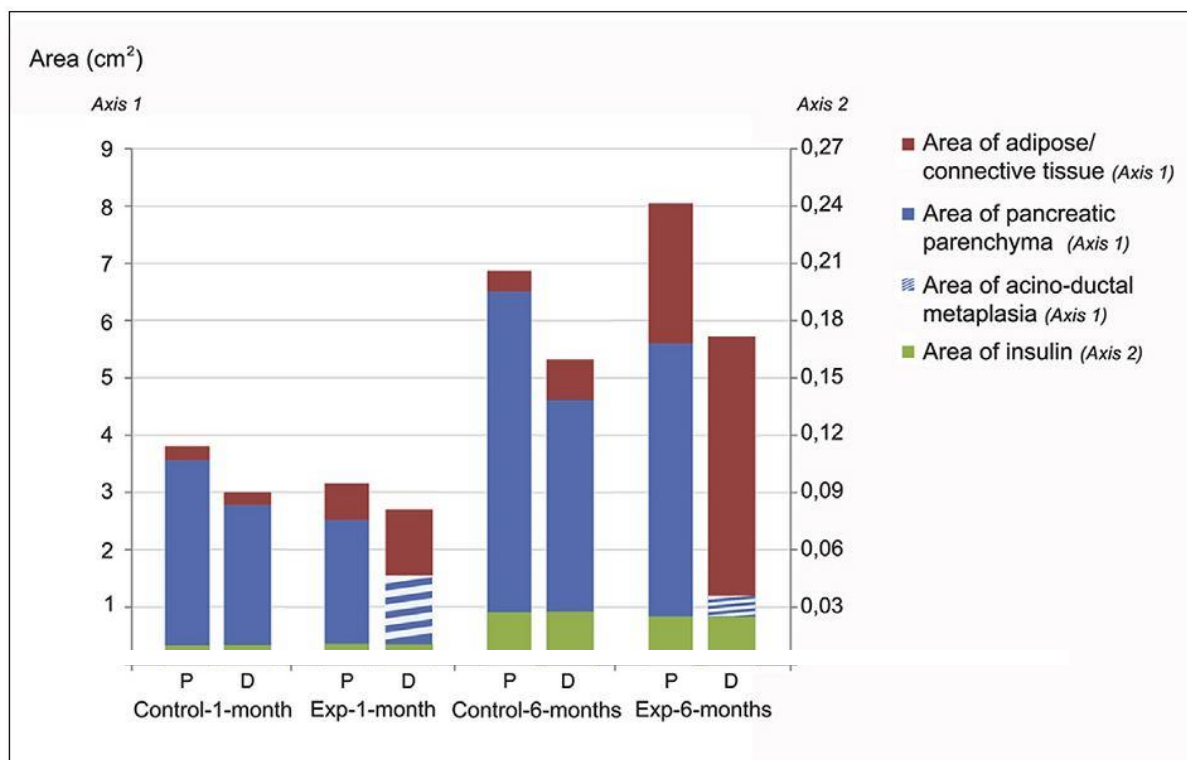


Fig. 15.- Aspectos de interés de la evolución tisular en páncreas proximal (P) y distal (D), tras el sellado del conducto pancreático principal en modelo porcino no tumoral. Destaca un aumento significativo del tejido conectivo y adiposo en el PD en el grupo de animales sometidos al sellado (Exp), al mes y a los 6 meses, respecto al PP. Además, se observa una sustitución parcial del parénquima pancreático normal por MAD, que disminuye en relación al resto de tejidos, conforme avanza el postoperatorio. (Adaptado de; Quesada *et al.*⁶⁰)

Estos estudios en modelo de páncreas sano de origen murino y porcino (más similar al humano) establecen, como respuesta fisiológica a la oclusión del ducto pancreático principal, una atrofia exocrina masiva con presencia de MAD con reducida capacidad proliferativa, y con tendencia a su desaparición con el tiempo.

En la clínica humana múltiples grupos han estudiado la involución del remanente pancreático, así como la pérdida de la función exocrina pancreática, en pacientes sometidos a pancreatectomía y anastomosis pancreatodigestiva posterior por cáncer.

Fish *et al.* fueron los primeros en publicar, en 1969, las alteraciones en la función pancreática tras una pancreatectomía en forma de pérdida de peso y esteatorrea¹⁵⁰. Posteriormente, Christiansen *et al.*¹⁵¹ demostraron un descenso en la secreción de amilasa, lipasa y tripsina pancreáticas.

En 1998 Sato *et al.*¹⁵² describieron la involución volumétrica del remanente pancreático por tomografía axial computarizada (TAC) a los 2-3 años de la pancreatectomía por cáncer en 9 de 16 pacientes analizados sin atrofia pancreática previa a la cirugía.

Leimaire *et al.* publicaron en 2000¹⁵³ un seguimiento prospectivo de 17 pacientes con una mediana de 3 años tras la pancreatectomía por cáncer. En este estudio se describió una atrofia significativa del remanente pancreático respecto al preoperatorio por TAC ($p=0,01$) asociada a una insuficiencia exocrina, pero con función endocrina preservada.

Por su parte Jang *et al.*¹⁵⁴ en 2002 demostraron una atrofia exocrina funcional postoperatoria en 33 de 34 pacientes sometidos a pancreatectomía y reconstrucción pancreatodigestiva, mediante estudio de elastasa fecal. Posteriormente, el mismo grupo realizó en 2003¹⁵⁵ un análisis por TAC de la atrofia postoperatoria del páncreas distal remanente tras pancreatectomía por cáncer. Durante el postoperatorio indujeron una hipergastrinemia mediante la administración de lansoprazol oral, con la intención de disminuir la atrofia exocrina del remanente. Así, el volumen del páncreas

distal disminuía sólo en un 10,7% respecto a su volumen inicial frente a un 44% en el grupo control sin lansoprazol ($p < 0,001$) en el cual se describió en un 53,4% de casos insuficiencia pancreática exocrina asociada.

Igualmente, en nuestro grupo de trabajo, Quesada *et al.*¹⁵⁶ corroboraron en 2019 la involución volumétrica por TAC del remanente distal tras la intervención de Whipple con el paso del tiempo, describiendo una disminución del espesor de la glándula de 0,4mm/mes, un acortamiento de 1,2mm/mes, y una disminución en su volumen de 1,17cm³/mes, tras 2 años de seguimiento. El tiempo de postoperatorio resultó ser el único factor significativo ($p < 0,001$) asociado a esta involución en el análisis multivariante, sobre otros parámetros considerados como; edad del paciente, asociación de fístula postoperatoria, tipo de anastomosis, o técnica quirúrgica.

En la práctica clínica, en relación a la intervención de Whipple, dos factores han potenciado explorar desde la década de 1970¹¹⁹ la PDL como una alternativa a la anastomosis pancreato-digestiva (APD), a través de diferentes técnicas; la oclusión del conducto pancreático principal con pegamento (OP), la sutura manual, o la mecánica. En primer lugar, la elevada incidencia y morbimortalidad de la fístula postoperatoria ocurrida tras realizar la APD, y en segundo lugar, la asunción de que una fístula pancreática del páncreas remanente distal (sin activación enzimática) es menos peligrosa que la ocurrida tras la APD¹²⁹, en la cual las enzimas producidas por el remanente sí se activan tras la reconexión quirúrgica con el tubo digestivo.

Hasta el momento, sin embargo, no se ha conseguido demostrar la superioridad de la PDL frente a la APD en la literatura. Dos estudios prospectivos randomizados publicados en 2002 (Tran et al, con 86 de 169 pacientes tratados mediante OP con Ethibloc®, Neoprene®, o Tissucol+aprotinin®)¹²⁹ y 2003 (Suc et al, con 102 de 182 tratados mediante OP de Tissucol+aprotinin®)¹²⁸, no demostraron una disminución en la incidencia de fístula postoperatoria u otras complicaciones postoperatorias graves a corto plazo, en relación con la OP. En ambos trabajos se describió una mayor incidencia de diabetes postoperatoria. Otros autores han descrito también una no superioridad en revisiones de casos retrospectivas en la OP en relación a la APD¹⁵⁷.

Sin embargo, sí se ha seguido empleando y describiendo en la literatura la PDL del remanente como una alternativa quirúrgica en casos de complicación postoperatoria tras una intervención de Whipple por una fístula pancreática grave¹⁵⁸, que requería una reintervención emergente con alta mortalidad, con el doble objetivo de inhibir la secreción pancreática del remanente y de reducir la necesidad de completar la pancreatectomía total (que asocia una elevada morbimortalidad¹⁵⁹).

Fromm et al.¹⁶⁰ describe el cierre mediante sutura manual del conducto pancreático principal en 3 situaciones: 1. necesidad de finalizar rápidamente la intervención quirúrgica; 2. la presencia de un mesenterio yeyunal corto, que sólo permite realizar sin tensión una de las dos reconstrucciones necesarias tras la intervención de Whipple (biliar y pancreática), y 3. la presencia de edema yeyunal masivo que daría lugar a una anastomosis de riesgo.

Otros autores describen una posible indicación de cierre mediante endograpadora del conducto pancreático principal en pacientes de >65 años, especialmente con páncreas blando y conducto principal <3mm¹⁶¹. Otros trabajos asimismo describen, en series de casos o análisis retrospectivos, la sutura manual o mecánica del remanente pancreático tras la intervención de Whipple, sin un aumento de la incidencia de complicaciones postoperatorias mayores o de fístula pancreática significativa^{162,163}.

Recientemente en 2019, Mazzaferro et al.¹⁶⁴ publicaron un nuevo estudio prospectivo para investigar la seguridad y eficacia de la OP frente a la APD, pero en este caso en una selección de pacientes, de acuerdo al riesgo de desarrollar una fístula postoperatoria. De 100 pacientes sometidos a intervención de Whipple, 51 de ellos presentaban un alto riesgo de fístula pancreática postoperatoria (medida mediante una puntuación de >6 puntos en el Fistula Risk Score desarrollado por Callery et al.¹⁶⁵), y fueron sometidos a una oclusión del conducto pancreático principal mediante inyección de látex de neopreno sin anastomosis del remanente. Destaca que, en esta selección de pacientes de alto riesgo, la tasa de fístula postoperatoria y de complicaciones postoperatorias se iguala a la del subgrupo de menor riesgo, sometido a APD. Se describió sin embargo un riesgo aumentado de diabetes a los 3 años de la intervención.

En 2019 también, nuestro grupo publicó un estudio¹⁶⁶ en el que se describe una técnica novedosa oclusiva del conducto pancreático principal: mediante sellado con radiofrecuencia (aplicada mediante un catéter bipolar endoluminal de 3Fr; Minitrode®, según se muestra en la figura 16), y se demuestra su superioridad frente al uso de pegamento (Glubran®) en un modelo porcino (n=34), en

términos de capacidad de oclusión y de inducción de atrofia exocrina distal al sellado del conducto. Así, en los animales sometidos a inyección de pegamento se observó una permeabilidad del conducto principal en la necropsia en todos los casos, y en el estudio histológico se observó un despegamiento del pegamento que resultó en un patrón de oclusión del conducto irregular. Por el contrario, en el grupo de animales tratados mediante sellado por radiofrecuencia, se observó en el estudio histológico tras la necropsia una necrosis del epitelio del conducto tratado, con una fibrosis de la íntima, y una disminución de su diámetro resultante en su oclusión, sin observarse diferencias significativas en relación a complicaciones postoperatorias.

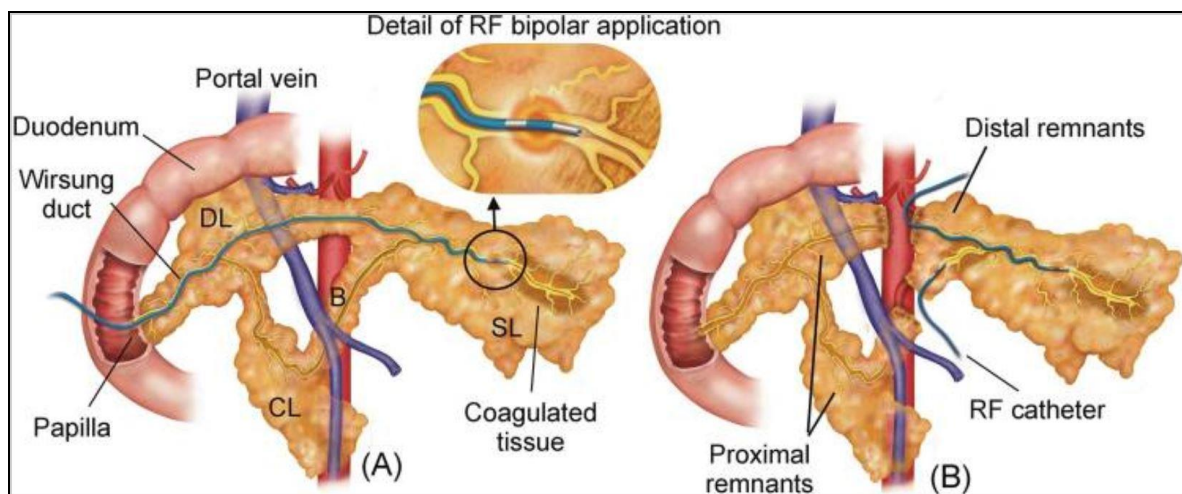


Fig. 16.- Detalle del sellado con radiofrecuencia del ducto pancreático principal en modelo porcino, mediante un catéter endoluminal. En (A) se realiza mediante un abordaje transpapilar, y en (B) en un contexto de transección parenquimatosa previa. SL: lóbulo esplénico; DL: lóbulo duodenal; CL: lóbulo de conexión (CL); B: Puente. (Adaptado de; Andaluz et al.¹⁶⁶)

Previamente habíamos publicado otro trabajo (2016; Burdio et al.¹⁶⁷) en el cual se demuestra una menor incidencia de fístula pancreática tras la transección pancreática distal quirúrgica realizada mediante abordaje laparoscópico en modelo porcino (n=16) utilizando también un dispositivo de sellado del conducto pancreático principal mediante radiofrecuencia, en comparación con la transección mediante sutura mecánica (endograpadora).

Volviendo al ámbito experimental, la inducción de atrofia exocrina pancreática mediada por apoptosis tras la PDL se ha demostrado en modelos porcino y murino no tumoral animal, pero nos preguntábamos si la PDL en un modelo de ADCP evolucionaría de la misma manera; hacia una atrofia exocrina.

Capítulo 2: HIPÓTESIS y OBJETIVO

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta las evidencias publicadas hasta la fecha, nuestra hipótesis de trabajo es que la ligadura del ducto pancreático en ratones Ptf1a-Cre (+/ki); K-ras LSLG12Vgeo (+/ki) a las 12 semanas de vida (previo a la inactivación del gen p53) puede inducir una atrofia exocrina suficiente para evitar la progresión de PanIN y AFL hacia ADCP a pesar del posible efecto pro-oncogénico e inflamatorio del procedimiento quirúrgico de la ligadura.

OBJETIVO

El objetivo del trabajo es valorar el efecto de la PDL del lóbulo esplénico del páncreas en edad temprana sobre el modelo murino Ptf1a-Cre (+/ki); K-ras LSLG12Vgeo (+/ki) a través del análisis histológico y genómico de las lesiones preneoplásicas existentes en comparación con el páncreas no ligado (lóbulos; gástrico y esplénico) y grupos controles.

Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MODELO ANIMAL

Se utilizaron ratones macho y hembra *Mus musculus* // C57B6 Ptf1a-Cre^(+/ki); K-ras LSLG12Vgeo^(+/ki)^{15,16}, a partir de ahora referidos como ratones Kras, cedidos por el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de Madrid (CNIO). Se establecieron controles genéticos de la dos líneas progenitoras del modelo de ratón transgénico: el alelo mutante K-Ras K-RasLSLG12Vgeo^(+/ki) (ratones PDL-G) y la línea progenitora de Cre-recombinasa Ptf1a-Cre^(+/ki) (ratones PDL-Cre).

3.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Dada la ausencia de estudios similares publicados hasta la fecha no fue posible realizar una estimación muestral, por lo que se optó por un diseño piloto en dos fases, con análisis de variables por subgrupos experimentales, según se expone más adelante.

El protocolo de investigación animal fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) con referencia FBP-12-1422 y se realizó de acuerdo con las directrices aprobadas por el Comité de Cuidado de Animales de la Generalitat de Catalunya (DAAM 6529).

El cuidado de los animales se realizó siguiendo los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS)¹⁶⁸.

El personal responsable del proceso experimental tenía competencia acreditada para la manipulación animal.

El estudio se diseñó en dos fases: una fase experimental preliminar o Fase 1, y la Fase 2 o definitiva.

Fase 1 (Preliminar)

Se estableció una fase preliminar cuyo objetivo era el aprendizaje de la técnica quirúrgica y las técnicas de manipulación animal, así como de la anestesia y el procesado de muestras. Se emplearon 15 ratones comunes *Mus musculus*.

En relación a la técnica quirúrgica, el objetivo de esta fase fue reconocer la anatomía murina y completar la disección y realizar de forma segura la PDL del lóbulo esplénico adyacente a la vena mesentérica superior. Para ello, se utilizaron 9 animales de 12 semanas de vida para realizar la PDL y 6 más para la disección y manipulación pancreática sin ligadura (sham).

En la necropsia, prevista a las dos semanas de la cirugía, el objetivo fue la correcta identificación de la ligadura en los animales sometidos a PDL, y la correcta exéresis del bloque esplenopancreático. Al microscopio se investigó la existencia de atrofia exocrina en los casos de PDL.

Fase 2

En la fase definitiva o Fase 2 se analizan todas las variables descritas más adelante (apartado 3.10).

El estudio se diseñó con un total de 88 animales, distribuidos en 18 grupos experimentales para hacer posible el análisis de las variables de interés según el fondo genético, el tiempo del postoperatorio (PO) y la técnica quirúrgica empleada. Teniendo en cuenta la técnica quirúrgica empleada, se diferencian animales

control no operados, animales operados pero no sometidos a PDL, y animales operados y sometidos a PDL, según se muestra en la figura 17.

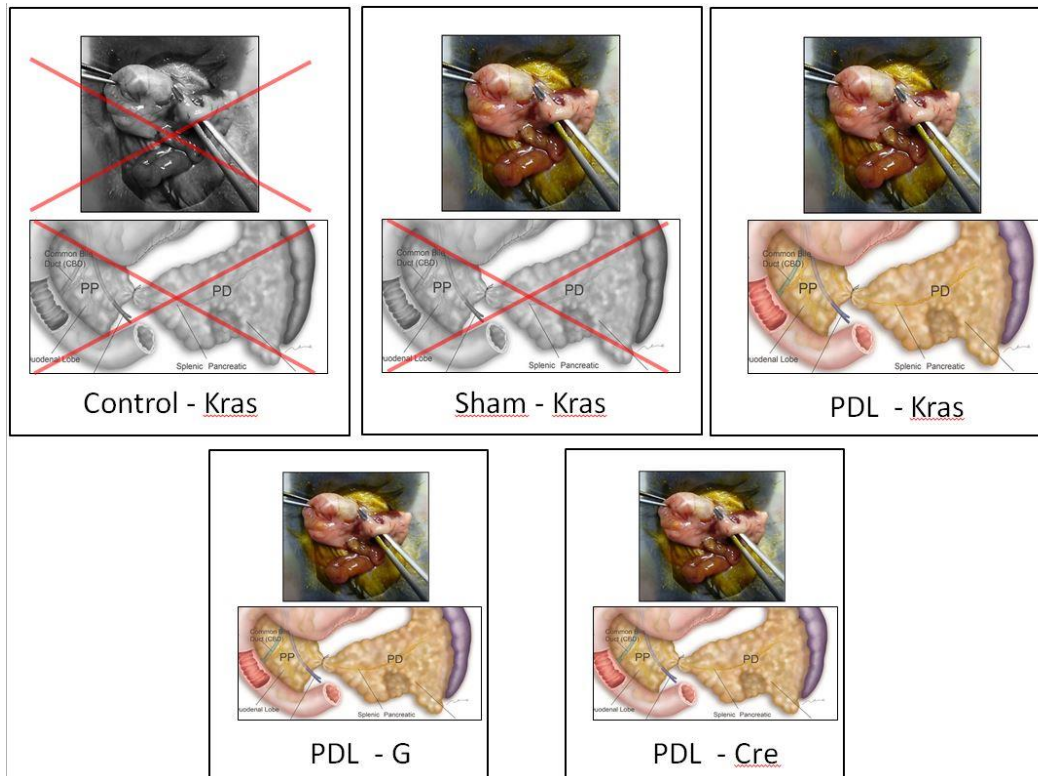


Fig. 17.- Nomenclatura de grupos experimentales según técnica quirúrgica y fondo genético. Los animales "control-Kras" no están sujetos a disección ni a la PDL (no están operados). En los animales "sham-Kras" no se realiza la PDL, aunque sí se les opera y se les hace disección del istmo del lóbulo esplénico del páncreas. Los animales del grupo PDL sí son sometidos a PDL, y son de 3 fondos genéticos diferentes: Kras, G y Cre (ver apartado 3.1)

Los animales de cada grupo se sacrificaron en tres momentos diferentes en base al tiempo de postoperatorio (PO): 1, 3 y 6 meses. En relación al fondo genético, para evaluar el impacto tanto de la técnica quirúrgica como de la propia PDL en el modelo transgénico utilizado, se consideraron dos grupos control de las

líneas progenitoras, ratones PDL-G y PDL-Cre, a los que se realizó una PDL y se sacrificaron también a los 1, 3 y 6 meses.

El análisis histológico en nuestro trabajo incluye 78 de los 88 animales, distribuidos según se muestra en la Tabla 2, correspondientes a los animales que pudieron ser sometidos a la necropsia programada en el momento de interés del postoperatorio, y aquellos con MNE ocurrida más allá del 3er día de PO, según se describe en los apartados 3.6 y 4.3. Para el resto de los análisis (de morbilidad y de amilasemia) se han incluido datos de todos los animales hasta el momento de su muerte.

Tabla 2.- Distribución de los animales. Se muestran los subgrupos considerados, según fondo genético, grupo experimental, y seguimiento postoperatorio.

	NECROPSIA				TOTAL
	No programada	1er mes PO	3er mes PO	6º mes PO	
KRAS: Ptf1a-Cre, LSL-KrasG12V					
Control-Kras	0	3	5	5	13
Sham Kras	4	3	2	3	12
PDL-Kras	9	11	6	9	35
Línea progenitora 1: K-RasLSLG12Vgeo(+/-ki)					
PDL-G	2	3	5	4	14
Línea progenitora 2: Ptf1a-Cre (+/-ki)					
PDL-Cre	3	4	4	3	14

3.3 CUIDADO PREOPERATORIO

Los animales fueron seleccionados y estabulados hasta la 10ª semana de vida, momento en el que fueron importados a las instalaciones del Parc de Recerca Biomédica de Barcelona (PRBB), donde se les realizó la cirugía en la 12ª semana de vida. Se recibieron a lo largo de 15 meses, en grupos de 15 a 30 animales, de acuerdo a la evolución de las camadas y la adecuada selección genética realizada en el CNIO.

Todos los animales tenían acceso a ingesta de alimento en pellets y agua *ad libitum* en un recipiente comercial bajo condiciones ambientales controladas durante 2 semanas para evitar la influencia del estrés.

Antes de realizar el procedimiento, se controló el peso de los animales y se les administró analgesia preoperatoria con meloxicam (3 mg/kg) y buprenorfina (0,001 mg/kg) 30 min antes de la cirugía.

Se realizó la inducción anestésica con isoflurano al 4% y se mantuvo a 2,5% en oxígeno al 100%. Se revisaron los reflejos plantar y palpebral previo a la realización del procedimiento quirúrgico, y se monitorizó la frecuencia respiratoria del animal durante el procedimiento para aumentar la dosis anestesia cuando fuese necesario.

El abdomen del animal se rasuró y preparó con solución antiséptica de yodo y un campo quirúrgico. Durante la cirugía, los animales fueron colocados sobre una manta térmica y bajo una luz infrarroja para prevenir la hipotermia.

3.4 TÉCNICA QUIRÚRGICA

Todas las cirugías y las necropsias fueron realizadas por el mismo equipo de investigadores (Fernando Burdío, Dimitri Dorcaratto, Rita Quesada, Patricia Sánchez y esta doctoranda).

En los animales sham-Kras y aquéllos sometidos a la PDL, se accedió a la cavidad peritoneal a través de una laparotomía en línea media y se movilizaron el estómago, el páncreas y el bazo. El bazo se traccionó lateralmente y se diseccionaron los vasos esplénicos bajo control microscópico para prevenir la devascularización del parénquima pancreático.

En los animales sometidos a PDL, la disección y ligadura se realizó en el istmo del lóbulo esplénico pancreático, en el lado derecho de la vena mesentérica superior, con una sutura de ácido poliglicólico 8/0, tal como se muestra en la figura (ver Fig.18). Posteriormente, se reemplazaron el páncreas y el resto de órganos en su posición anatómica, y se suturó la incisión de la línea media en dos planos; utilizando una sutura de ácido poliglicólico 4/0 en plano subcutáneo, y otra de seda 3/0 en plano cutáneo.

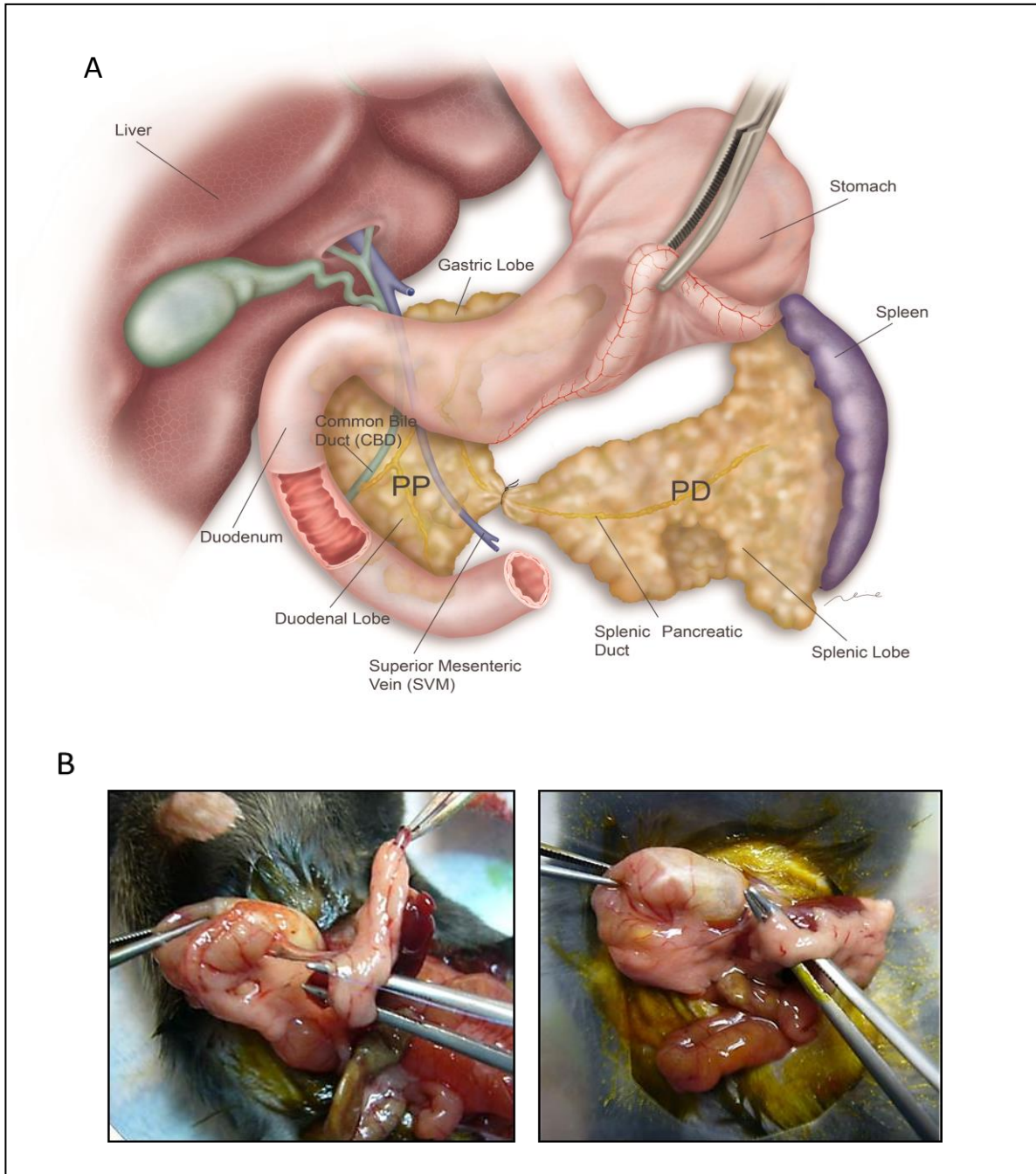


Fig. 18.- Técnica de la PDL en modelo murino utilizada. A: esquema de la ligadura a nivel de la vena mesentérica superior, estableciendo la división del páncreas en; páncreas proximal (PP) a la ligadura que incluye los lóbulos; gástrico y duodenal, y páncreas distal (PD, correspondiente al lóbulo esplénico). B: Exposición y disección intraoperatoria del istmo del lóbulo esplénico (pinza inferior) mediante retracción craneal del estómago (pinza superior) previas a la ligadura.

Tras la cirugía, los animales se recuperaron de la anestesia sobre una manta eléctrica y bajo una luz infrarroja antes de ser transferidos a sus jaulas, una vez recuperados los reflejos plantar y palpebral.

3.5 POSTOPERATORIO Y NECROPSIA

Durante el PO los animales tuvieron libre acceso a alimentos y agua conteniendo una profilaxis antibiótica (Enrofloxacin, 500 mg / kg) durante los tres primeros días.

Se administró buprenorfina (0,001 mg/kg) y meloxicam (3 mg/kg) - por vía subcutánea como terapia analgésica cada 12 horas, durante 3 días.

Durante las primeras 72 horas PO se controlaron los signos de estrés asociados al procedimiento quirúrgico, como actividad física, gestos de autolimpieza y estado de alerta. Se controló también el peso de los animales a las 72 horas PO y a la 1ª, 2ª y 4ª semanas postoperatorias y luego de forma mensual hasta los 6 meses. De acuerdo con los principios éticos de cuidado animal, si se observaba que un animal presentaba signos de estrés a partir del 3er día del postoperatorio se continuaba la administración de analgesia y si el ratón seguía presentando signos de estrés en el 5º día de postoperatorio se sacrificaba.

Se tomó una muestra de sangre de cada animal preoperatoriamente para determinar los niveles basales de amilasas. Después de la cirugía, se registró la amilasemia a las 72 horas postoperatorias, a la 1ª, 2ª y 4ª semanas postoperatorias, y

cada mes posterior. Las muestras se analizaron en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los animales se sacrificaron en el momento establecido para cada grupo experimental según el diseño del estudio con inhalación de CO₂ a una concentración del 70-90% y se realizó una laparotomía lateral para explorar la cavidad peritoneal.

Se observó y anotó la presencia de líquido peritoneal libre, posibles colecciones y adherencias. En todos los animales se disecó el páncreas junto con un segmento del duodeno y el bazo, como referencias anatómicas. Se identificó la ligadura, si estaba presente, y se seccionó el lóbulo esplénico refiriéndolo como PD para un análisis posterior, anotando la presencia de atrofia macroscópica (ver apartado 3.10.3). Los otros lóbulos (gástrico, duodenal) se referenciaron como PP (ver Fig.19).

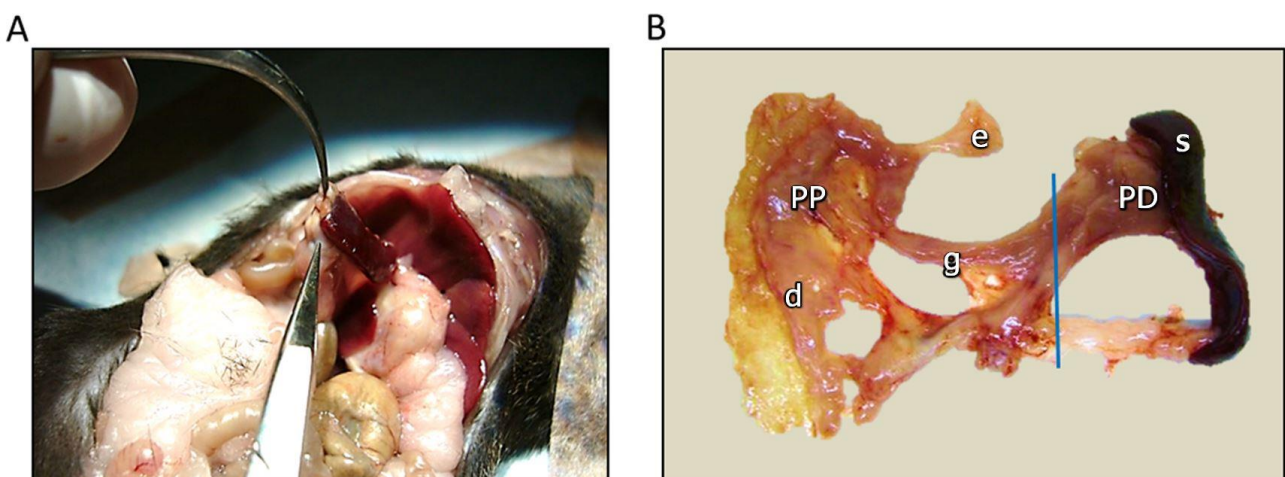


Fig. 19.- Técnica de necropsia. A: Extracción en bloque del páncreas con un segmento de duodeno, estómago (e) y el bazo (s). B: Identificación y sección posterior del lóbulo esplénico del páncreas (PD) junto con el bazo para procesado y análisis independiente del PP y el PD (animal sham-Kras). PP constituido por los lóbulos; gástrico (g) y duodenal (d).

3.6 MUERTES NO ESPERADAS

Se definió muerte no esperada (MNE) como el exitus antes del momento previsto de necropsia.

Los animales que presentaron una MNE precoz (antes del 3º día PO) fueron excluidos del examen histológico final, ya que la inducción de una atrofia exocrina tras la ligadura es evidente a partir del 3º día tras la PDL y no antes, según lo revisado en el apartado 1.3. Sin embargo, sí se analizaron parámetros clínicos y analíticos de estos animales con el objetivo de intentar discernir la causa de la muerte.

Se estudió cada caso de MNE revisando las notas de laboratorio en relación con la dificultad en la intervención quirúrgica, el comportamiento en el PO inmediato, la dificultad en la extracción de analíticas y los hallazgos de laboratorio y anatomopatológicos, en los casos en el que la calidad de los tejidos lo permitía.

Se estudió la posibilidad de pancreatitis secundaria a la intervención quirúrgica en estos casos de MNE, investigando la asociación entre:

- presencia de hiperamilasemia en los análisis de sangre
- presencia de hallazgos microscópicos sugestivos de pancreatitis histológica
- presencia de hallazgos macroscópicos sugestivos de pancreatitis histológica

3.7 GESTIÓN DE LAS MUESTRAS HISTOLÓGICAS

Las muestras de tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10% y se embebieron en parafina. Para el análisis histopatológico los páncreas se seccionaron de forma seriada en cortes de 3 μm hasta un máximo de 160 secciones por animal, 80 para el páncreas proximal y 80 para el páncreas distal. Siguiendo criterios cronológicos y económicos, y con el objetivo de analizar de forma lo más homogénea posible las piezas quirúrgicas, se seleccionó una de cada 20 secciones para teñir con hematoxilina y eosina y su posterior análisis histopatológico.

La preparación de los especímenes (corte en PP y PD, inclusión en formol) y el montaje de los bloques de parafina fue realizado por Rita Quesada y esta doctoranda. El corte seriado de los bloques y tinciones de HE fue realizado por dos técnicos de laboratorio, Laura Fuentes y Tania Lobató, del Parc de Salut Mar/IMIM.

3.8 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El estudio histopatológico se basó en el análisis macroscópico y microscópico de las piezas quirúrgicas.

3.8.1 Estudio macroscópico

En el momento de la necropsia, se identificó y registró si existía presencia de atrofia del páncreas distal a la ligadura, en caso de que la hubiere. Se definió atrofia macroscópica como la reducción del tamaño del PD respecto a ratones no sometidos a ligadura, asociado a un cambio en la coloración (color ocre), de acuerdo a observaciones previas similares¹⁴⁰.

3.8.2 Estudio microscópico

Las muestras seriadas seleccionadas y teñidas con HE de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.7, se analizaron en las instalaciones del servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar, bajo la supervisión de la Dra. Mar Iglesias (anatomopatóloga subespecializada en páncreas humano y murino).

Se diseñó un formulario en la que se identifican los siguientes parámetros histológicos de interés:

- Número total de lesiones PanIN 1, PanIN 2 y PanIN 3, y AFL en el tejido pancreático
- Valoración semicuantitativa de la presencia de atrofia en cada segmento pancreático de cada animal
- Valoración semicuantitativa de la presencia de inflamación en cada segmento pancreático de cada animal
- Presencia, si fuera el caso, de necrosis tisular microscópica, colecciones, o adenocarcinoma.

3.9 ESTUDIO GENÓMICO

Con el objetivo de analizar la expresión génica en las muestras de interés se realizó un estudio mediante análisis de significación de microarrays o SAM (técnica estadística que utiliza la hibridación con sondas de RNA) realizada en las instalaciones del CNIO en Madrid en colaboración del Grupo de Carcinogénesis (Dr. Paco Real, Dra. Mónica Pérez, Dr. Jaime Martínez, Dra. María Villaverde) y el Servicio de Análisis de Microarrays del PRBB.

Se seleccionaron 5 animales del grupo PDL-Kras (animales: 23, 25, 47, 56, 59) para realizar el estudio genómico, con el objeto de disponer de suficiente tejido atrófico en la muestra de PD que

permitiera realizar la microdissección manual que implicaba la técnica.

3.9.1 Muestras genéticas

Las muestras se procesaron tal como se ha descrito previamente¹⁶⁹. El RNA total obtenido tras la hibridación con las sondas de DNA se aisló utilizando el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales RecoverAll de Life Technologies a partir de 40 secciones seriadas de 3 μm de cada una de las muestras de PP y PD. Se evaluó la calidad, pureza e integridad del RNA utilizando, para las dos primeras, un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies) y para la tercera un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Dado que el número de integridad del RNA (RIN) obtenido por el bioanalizador no es informativo en el caso de muestras fijadas en formol y parafinadas, se utilizó como estimación de integridad de RNA un porcentaje de RNA >200nt para cada muestra. La amplificación, análisis, etiquetado e hibridación de los microarrays se realizó de acuerdo al protocolo GeneChip Pico Reagent kit (Affymetrix). Las condiciones de trabajo fueron: 50ng de input de RNA, 12 ciclos de amplificación previa a la reacción en cadena de la polimerasa (prePCR) y 16hr de transcripción in vitro. Después del procesado de las muestras el RNA se hibridizó al GeneChip Mouse Clariom S Array (Affymetrix) en el GeneChip Hybridization Oven 640. El lavado y escaneado de las muestras se realizó utilizando el Expression Washam and Stain y el GeneChip System de Affymetrix (GeneChip Fluidics Station 450 and GeneChip Scanner 3000 7G).

3.9.2 Preprocesamiento de los datos

El control de calidad de datos se realizó con el paquete arrayQualityMetrics¹⁷⁰, sobre los datos en formato .CEL, obtenidos

de las muestras emparejadas de PP y PD de cada animal. Una vez comprobada el estándar de calidad, se ejecutó el preprocesamiento de los datos con oligopackage¹⁷¹. La normalización se realizó usando el algoritmo Robust Multichip Average (RMA)¹⁷², que crea una matriz de expresión a partir de datos de Affymetrix. Los valores de intensidad sin procesar se corrigieron en segundo plano, transformados a expresión log₂ y sometidos a normalización por cuartiles. Las sondas se anotaron usando la función `annotateEset` y los datos de anotación `pd.clarion.s.mouse` del paquete `affycoretools`¹⁷³. A continuación, se ajustó un modelo lineal a los datos normalizados para obtener una medida de expresión para cada conjunto de sondas en cada matriz. Antes de realizar el análisis de expresión génica diferencial, la matriz de expresión obtenida después de la normalización por RMA se filtró por el rango Inter cuartil (IQR) que proporciona una medida de la extensión media del 50% de las puntuaciones de intensidad para cada gen. El análisis de expresión diferencial se realizó para muestras emparejadas usando el paquete Limma (Modelos lineales para datos de microarrays)¹⁷⁴. La matriz de expresión normalizada se utilizó como input para el análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (Gene Set Enrichment Analysis). Los conjuntos de genes con un FDR <0.25 se consideraron significativos.

3.9.3 Análisis de expresión por cuantificación de PCR (qPCR)

Para validar los resultados, se cotejaron mediante qPCR una selección de los genes que resultaron significativos en el SAM: *Prss2*, *Ctrl*, *Try4*, *Tff2*, *Reg1*, *Nupr1*, y como control endógeno *18S*. La técnica empleada para la validación fue más compleja de lo habitual por el tipo de muestra del PD, de tamaño muy reducido. Su producto de amplificación debía ser pequeño, y cada primer específico tenía que poder unirse a dos exones contiguos (para

asegurar la amplificación de cDNA y no de DNA genómico). Para el análisis de qPCR, el cDNA se transcribió de manera inversa desde un máximo de 400ng de RNA total utilizando el SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (ThermoFisher) y se preamplificó utilizando el TaqMan®, PreAmp Master Mix (ThermoFisher) según lo descrito por el fabricante, con 3 verificaciones de cada análisis. El análisis de datos de qPCR se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁷⁵. Para la evaluación estadística, se aplicó una prueba t de Student para datos apareados considerando una expresión genética diferencial con $p < 0,05$.

3.10 VARIABLES ANALIZADAS

3.10.1 Análisis de la morbimortalidad

Se analizó a través de la evolución del peso de los animales, y las MNE, que se diferenciaron en precoces (antes del 3er día PO) y tardías (después del 3er día PO).

3.10.2 Análisis bioquímicos

Se determinó la amilasemia de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.5, definiendo hiperamilasemia como un nivel de amilasa sanguínea 3 veces superior al nivel basal, según artículos previos^{176,177}.

3.10.3 Histología

Se analizaron los siguientes aspectos:

1. Lesiones preneoplásicas en el grupo de animales Kras
 - a. Número total de lesiones PanIN 1, PanIN 2 y PanIN 3, y AFL en el tejido pancreático de acuerdo con el

Consenso Internacional¹⁷⁸ y la definición de AFL (ver apartado 1.1.3).

Tal y como se describe en el apartado 4.3, para la interpretación de los resultados se reagruparon las lesiones como de bajo potencial maligno (PanIN 1) y lesiones preneoplásicas de mayor grado y potencial preneoplásico (HGPL) que incluían: PanIN 2, PanIN 3 y AFL.

- b. Distribución de lesiones preneoplásicas según fondo genético.

Se realizó una validación del modelo murino transgénico utilizado, analizando la distribución de lesiones preneoplásicas en PP y PD tanto en ratones Kras como en los controles de fondo genético. Dos fueron los objetivos: primero, confirmar la presencia del alelo Kras mutado en el grupo de animales Kras, y segundo, confirmar la ausencia de lesiones en los grupos PDL-G y PDL-Cre. En éstos, la ausencia corroboraría que efectivamente no poseen mutaciones en relación al gen Kras, y que el procedimiento quirúrgico en sí no está relacionado con la aparición de las lesiones preneoplásicas.

- c. Análisis intergrupo.

Se efectuó, en primer lugar, un análisis intergrupo del número de las lesiones PanIN 1 y HGPL en el PP de los grupos control-Kras, sham-Kras y PDL-Kras (ver Fig.20). A continuación, se realizó el mismo estudio para el PD.

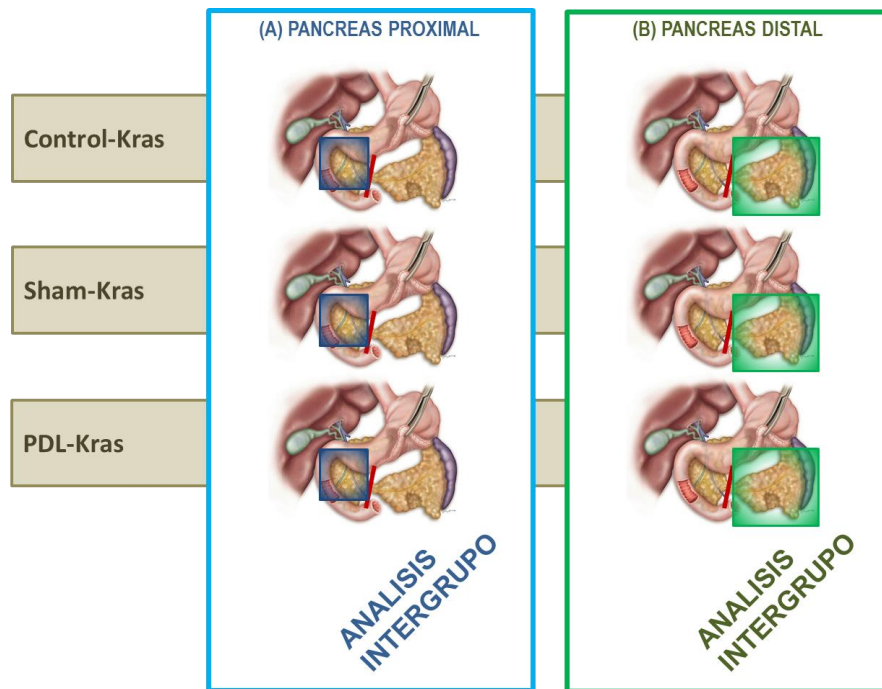


Fig. 20- Esquema del análisis intergrupo.

d. Análisis intragrupo.

Además, se comparó el número de lesiones preneoplásicas entre PP y PD de cada animal, del grupo experimental (ver Fig.21).

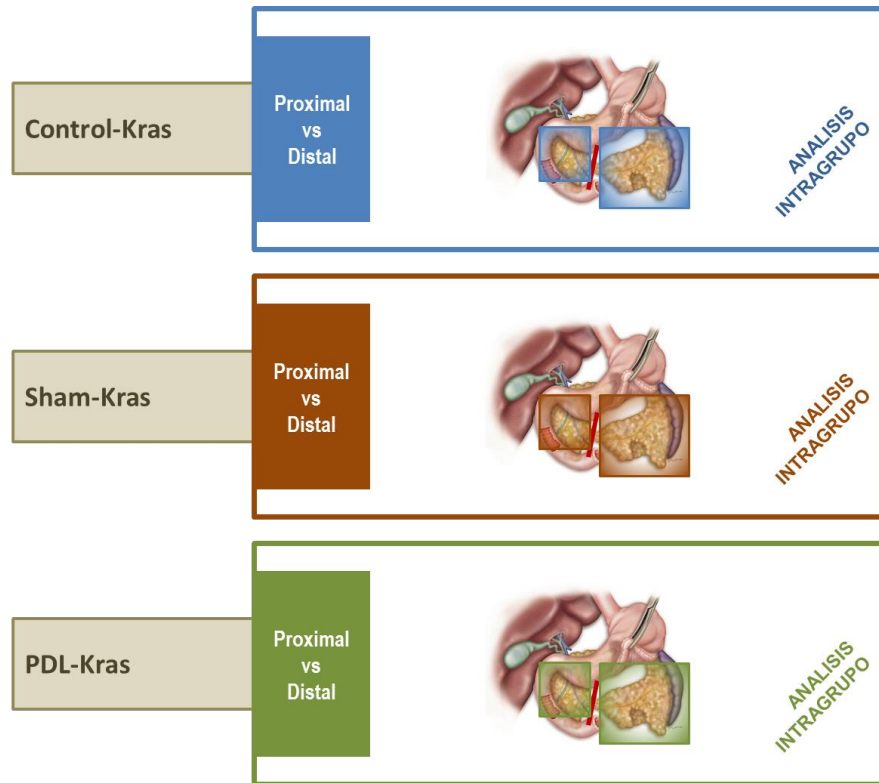


Fig. 21.- Esquema del análisis intragrupo.

2. Análisis de la atrofia

- Presencia de atrofia macroscópica al realizar la necropsia (presente vs. ausente). Se definió un PD con atrofia macroscópica como un parénquima pancreático de color ocre y con reducción del tamaño respecto al PD de los animales control-Kras, de acuerdo a trabajos previos^{59,140}.
- Valoración semicuantitativa de la presencia de atrofia microscópica en cada segmento pancreático de cada animal, de acuerdo a las siguientes categorías: "ausencia", "leve/moderada" (lobulillar), o "extensa" (afectación de múltiples lóbulos o con sólo preservación de islotes endocrinos).

3. Análisis semicuantitativo de la inflamación a nivel microscópico
 - a. Valoración de los infiltrados inflamatorios por segmentos pancreáticos (PP y PD), de acuerdo a las siguientes categorías: “ausente”, “periductal”, “transductal”, o “extensa”, de forma similar a trabajos previos¹⁷⁹⁻¹⁸¹.
 - b. Presencia de infiltrado inflamatorio no fisiológico en ratones sham-Kras o PDL, y asociación con lesiones preneoplásicas.
4. Presencia de pancreatitis histológica:
 - a. Macroscópica, definida como la presencia en la necropsia de fibrina o fluido intraperitoneal libre.
5. Microscópica, definida como la presencia de un infiltrado inflamatorio de PMN extenso asociando necrosis parenquimatosa o grasa extensa.
6. Presencia de otros hallazgos de interés: necrosis tisular microscópica, colecciones, o adenocarcinoma.

3.10.4 Análisis genómico

La variable de interés fue determinar la expresión génica predominante en las muestras seleccionadas de animales PDL-Kras, analizadas por segmentos (PP y PD).

3.11 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media y desviación estándar (DE).

Se emplearon estudios no paramétricos (Chi-Cuadrado, U-Mann Whitney y Kruskal-Wallis) para el análisis univariante.

Se utilizaron modelos de regresión lineal para determinar la mejor ecuación de ajuste del número de lesiones PanIN 1 y HGPL en los momentos definidos del postoperatorio.

Las variables significativas que se consideraron predictoras en el análisis univariante se sometieron a un análisis multivariante (backward stepwise análisis de regresión logística). Los resultados se expresaron como Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC). Las diferencias entre variables se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con software estadístico (SPSS versión 19.0, SPSS, Inc, Chicago, Ill).

En relación al estudio de genómica, se ha descrito el análisis estadístico específico en el apartado previo 3.10.4.

Capítulo 4: RESULTADOS

Fase 1 (Preliminar)

En el estudio preliminar se incluyeron 15 ratones *Mus musculus*, 9 sometidos a PDL y 6 a un procedimiento sham.

En todos los casos se identificó correctamente la anatomía del páncreas murino, y el istmo del lóbulo esplénico, realizándose la ligadura adyacente a la vena mesentérica superior en los 9 casos de PDL.

Fallecieron 5 animales (tres animales PDL y dos sham) lo que resulta en una tasa de supervivencia del 67%. Las principales causas de MNE fueron peroperatorias: en la inducción anestésica, o por hemorragia intraoperatoria (3 animales; dos PDL y un sham). Los otros 2 animales (1 PDL, 1 sham) fallecieron en la primera semana por defectos en la técnica de extracción analítica, que fue modificada con posterioridad para evitar iatrogenia.

En la necropsia reglada se pudo identificar en todos los casos el PD, si bien en tres animales resultó difícil por la presencia de adherencias. En el caso de los animales con PDL se identificó macroscópicamente un páncreas distal de menor tamaño y de color ocre respecto a los sham (ver Fig.22) La ligadura pudo identificarse correctamente en 4 de los 6 animales.

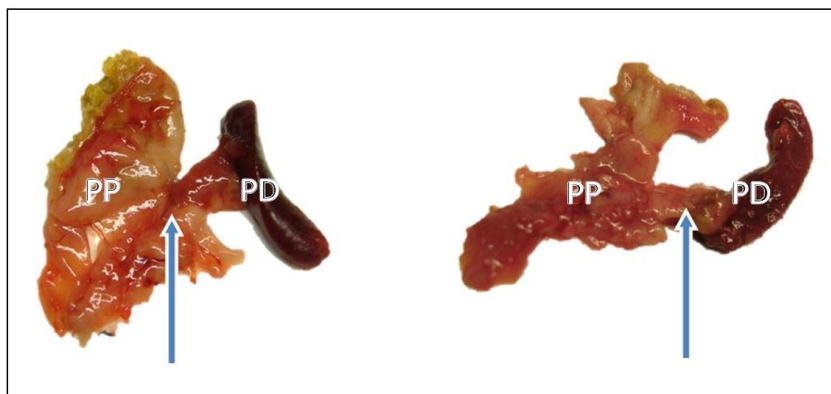


Fig. 22.- Aspecto macroscópico de las piezas quirúrgicas tras la necropsia en dos animales sometidos a PDL. Se delimitan los dos segmentos pancreáticos a estudio; PP: páncreas proximal. PD: páncreas distal. Flecha: ligadura.

Tal como muestra la figura 23, en el estudio microscópico de los ratones con PDL se identificó la presencia de atrofia acinar extensa en 3 animales, y lobulillar o parcial en 2 casos. En un animal no se generó la atrofia esperada debido a un problema técnico con la ligadura. No se identificaron otras lesiones significativas en el PD.

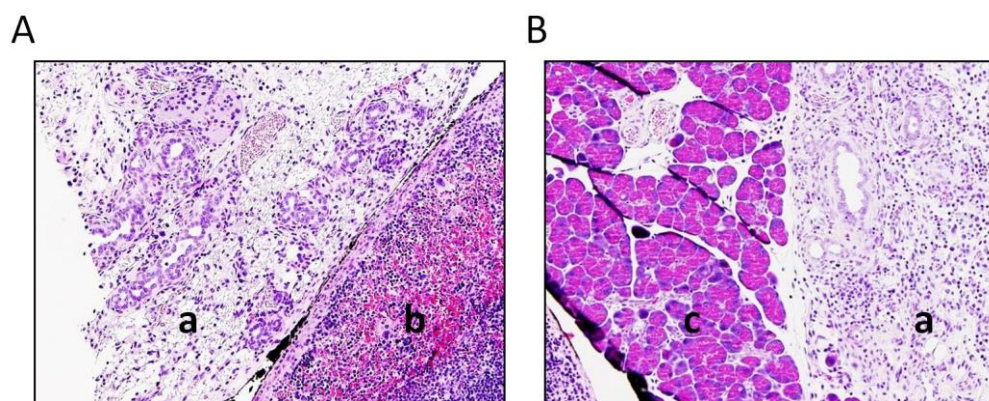


Fig. 23.- Segmentos de páncreas distal tras la PDL (escala: x10). A: Aspecto histológico de una atrofia extensa (tinción HE) (a). Área de atrofia exocrina, (b): bazo. B: Aspecto histológico de una atrofia lobulillar (tinción HE) (a): área de atrofia exocrina, (c): acinos pancreáticos conservados.

Fase 2

4.1 Evolución de las cirugías y morbimortalidad

No se detectaron desviaciones a los protocolos de cuidados peroperatorios de estabulación, manipulación, técnica anestésica o necropsia reglada descritos. En la técnica de extracción de analíticas fue necesaria la asistencia puntual de personal veterinario para algunas de las extracciones, realizadas principalmente en vena safena, y en casos difíciles, en las venas laterales de la cola. Durante el postoperatorio los animales se mostraron activos, con una correcta tolerancia a la ingesta de comida y bebida. Algunos en el postoperatorio

inmediato (primeras 72h) mostraron síntomas de estrés o molestia, como el pelo erizado o la falta de conductas de acicalamiento, lo cual fue considerado normal en el contexto del postoperatorio inmediato. Se les administró pauta de analgesia de acuerdo con las pautas de bienestar animal descritas en el apartado 3.5.

4.1.1 Evolución del peso de los animales

Respecto al impacto del acto quirúrgico, tal y como se muestra en la figura 24, en el tercer día PO se observó una disminución del peso medio en los animales sometidos a cirugías (PDL y sham) en relación al peso preoperatorio, que se recuperó tras la primera semana PO.

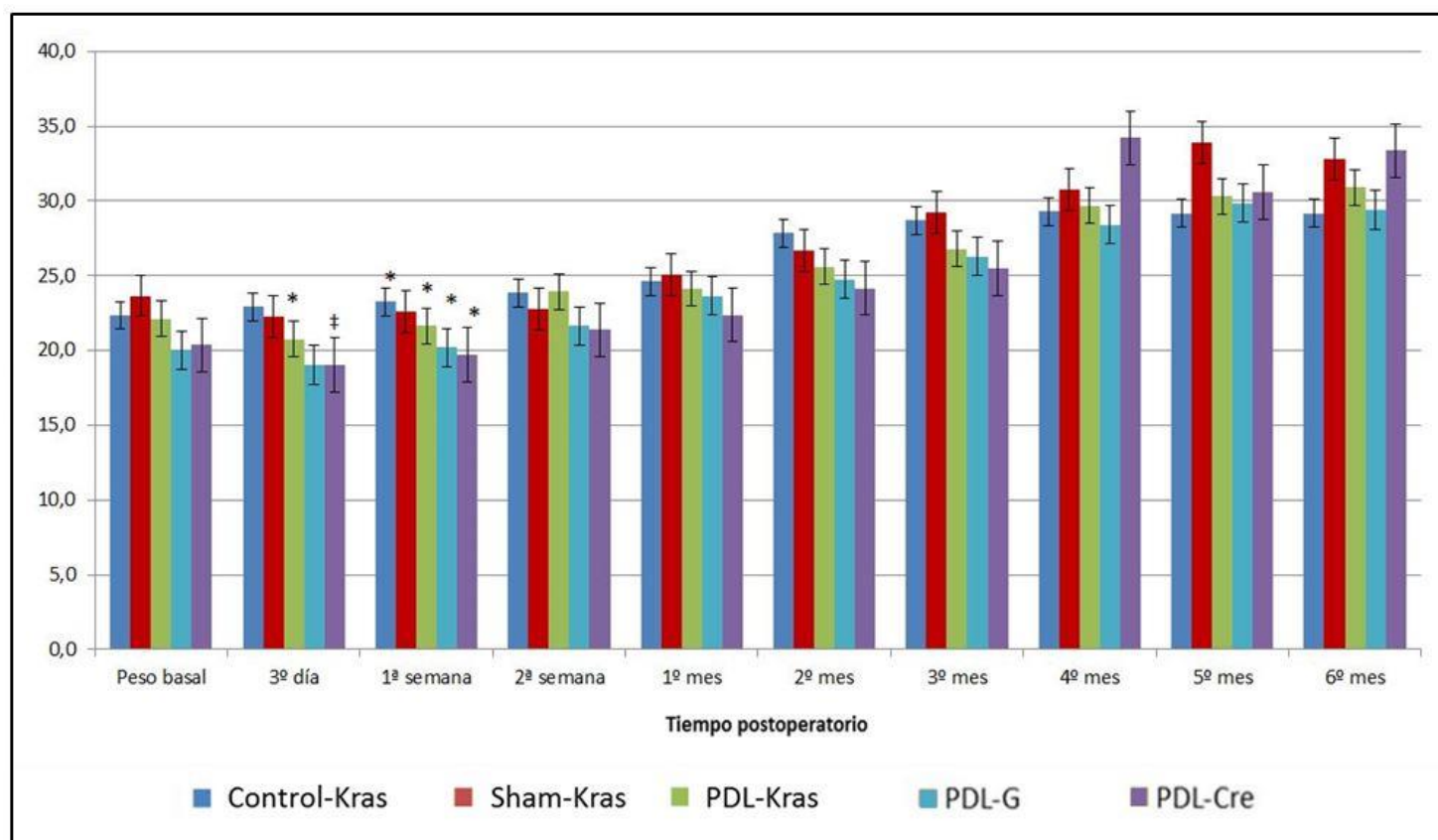


Fig. 24.- Evolución del peso de los animales durante el seguimiento. Se observó en los grupos experimentales sometidos a cirugías (Sham y grupos PDL) una disminución del peso de los animales del grupo al 3er día postoperatorio, con una recuperación a la semana del PO estadísticamente significativa en todos los grupos experimentales, excepto Sham-Kras (*; $p < 0,001$, ‡; $p = 0,05$). Datos expresados en; peso medio (gramos), barras; ES.

Posteriormente, los animales presentaron unas curvas de incremento de peso de acuerdo con lo esperado, sin diferencias significativas entre grupos. El peso medio de los animales en el preoperatorio fue de $21,8 \pm 3,6$ gr. y de $30,4 \pm 6,3$ gr. a los 6 meses.

4.1.2 Análisis de MNE

La mortalidad global del experimento fue del 20,4%, correspondiente a 18 animales. La mortalidad en los animales

intervenidos (PLD y sham) fue del 30,5%; 20,6% en los animales PLD-Kras (n=14), y 33,3% en los sham-Kras (n=4), calculadas sobre el total de animales utilizados (n=88). Los animales control-Kras no tuvieron mortalidad.

En el análisis específico de las MNE, 10 de las 18 fueron precoces (<3 días tras la cirugía), y 8 tardías (6 entre los 0,5-1,5 meses postoperatorios, y 2 entre 1,5-2 meses). Tal y como se muestra en la figura 25, en 15 casos la MNE se relacionó con la técnica peroperatoria, intraoperatoria o anestésica.

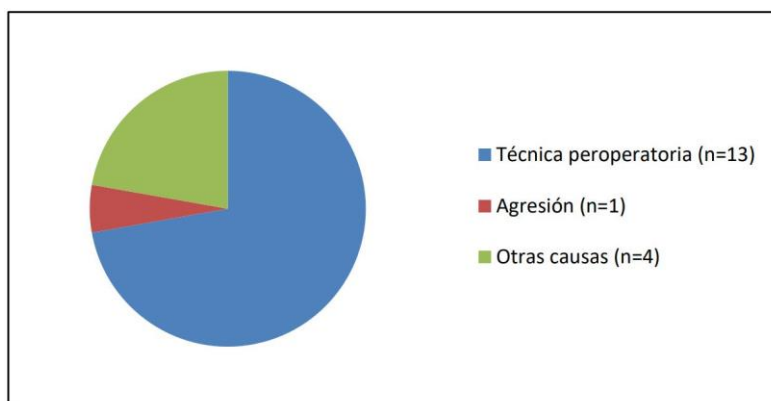


Fig. 25.- Gráfica de las causas de MNE (n=18).

En el análisis clínico pormenorizado se observó que 5 de los 18 animales con MNE presentaron hallazgos macroscópicos y/o microscópicos en la necropsia sugestivos de pancreatitis (ver apartado 3.6 y 3.10). Tal y como se muestra en la tabla 3 con detalles clínicos, tras revisar incidencias intraoperatorias, cabe destacar que en 4 de ellos se describió un sangrado intraoperatorio durante la manipulación del páncreas.

Tabla 3.- Análisis de MNE. Detalles clínicos, histológicos y causa de muerte de los animales con necropsia no programada (Causas de la muerte: "Anest"; 2ª a técnica anestésica. "Quir"; 2ª a técnica quirúrgica (1); evisceración (2); pancreatitis 2ª. "?"; causa desconocida)

Animal	Observaciones clínicas	Pancreatitis micro y/o macro	Causa de la muerte
MNE < 3 días PO			
Sham-Kras 10	Exitus en la inducción anestésica preoperatoria	No	Anest
PDL-Kras 4	Hemorragia leve intraoperatoria en PD. Hematoma peripancreático en necropsia	No	Quir
PDL-Kras 20	Laceración intraoperatoria PD. Requirió dosis extras de analgesia. Necropsia: PP distorsionado, PD con fibrina y adherencias	Sí	Quir
PDL-Kras 33	Desgarro intraoperatorio en PD. Precisó reforzar puntos de la laparotomía en 2 ocasiones (mordidos). Hematoma peripancreático en necropsia	No	Quir
PDL-Kras 36	Hemorragia intraoperatoria leve en PD. Hematoma peripancreático en necropsia.	No	Quir
PDL-Kras 55	Hemorragia intraoperatoria en PD por tracción excesiva. Necropsia: páncreas inflamado con necrosis grasa	Sí	Quir
PDL-Kras 58	Tiempo de cirugía y anestesia largo por anatomía difícil. Requirió dosis extra de analgesia. Tracción intraoperatoria excesiva del PD, hemoperitoneo 2º	No	Quir
PDL-Cre 8	Tracción intraoperatoria excesiva del PD, hemoperitoneo secundario	No	Quir
PDL-Cre 10	Exitus en la inducción anestésica preoperatoria	No	Anest
PDL-G 14	Tracción intraoperatoria excesiva del PD, hemoperitoneo secundario	No	Quir
MNE > 3 días PO			
Sham-Kras 1	Exitus en la inducción anestésica previa a extracción sanguínea	No	Anest
Sham-Kras 24	Evolución PO correcta. Encontrado muerto 2º mes PO	No	?
Sham-Kras 48	Evolución PO correcta. Encontrado muerto 2ª semana PO	No	?
PDL-Kras 17	Evolución PO correcta. Encontrado muerto 1ª semana PO. Necropsia; PD atrofico con necrosis grasa	Sí	?
PDL-Kras 38	Evisceración al 8º día PO. Necropsia muy tardía no concluyente	No	Quir (1)
PDL-Kras 44	Sacrificado al 5º día PO por persistencia de dolor. Hemorragia peripancreática (vasos esplénicos) intraoperatoria, requirió compresión. Necropsia con PD con fibrina	Sí	Quir (2)
PDL-Cre 2	Agresión por otro animal (lesiones en cabeza y extremidades)	No	Agresión
PDL-G 11	Hemorragia intraoperatoria esplénica leve, requirió compresión. Evolución PO correcta. Necropsia: dilatación gástrica, páncreas normal	Sí (micro)	?

En uno de los animales (PDL-G 11), se observó un aumento significativo de amilasa en sangre al 3er día de PO, que se normalizó a la semana, aunque este animal no falleció hasta transcurridos 45 días. En ninguno de los animales se observaron colecciones o abscesos durante la necropsia.

4.2 Análisis bioquímico

A lo largo del estudio, y siguiendo el protocolo descrito, se obtuvieron 507 muestras sanguíneas perioperatorias, de las que se descartaron 49 por hemolización del material. Por tanto, los resultados se centran en 458 muestras.

Teniendo en cuenta el criterio establecido de hiperamilasemia, 9 de 65 animales (3%) presentaron en algún momento del periodo del seguimiento algún pico puntual de hiperamilasemia. En todos animales se ha analizado, de forma pormenorizada, si alguna situación descrita en el curso clínico o un hallazgo necrópsico o histológico pudieran estar explicando la elevación de amilasas. Sólo en un caso (el animal PDL-G 11), que presentó hiperamilasemia al 3er día PO - aunque esta cifra se normalizase a 1ª semana PO - se detectó la presencia de pancreatitis microscópica en la necropsia, realizada 45 días después de la cirugía.

En el análisis estadístico, se observaron diferencias en las concentraciones de amilasa basales entre los grupos experimentales. En concreto, el grupo sham (3148 ± 707 U/L) tenía una amilasemia media superior de forma significativa al resto de grupos, sin que pudiéramos encontrar una explicación a este dato. Por este motivo no se consideró indicado realizar un análisis intergrupo.

Para determinar si existían diferencias en la evolución de los valores de amilasa durante el seguimiento para cada grupo experimental, teniendo en cuenta que las condiciones de partida eran ya diferentes, se realizó un análisis estadístico de muestras apareadas intragrupo. No se observaron diferencias en la concentración de amilasa en sangre entre los diferentes momentos

del seguimiento para ninguno de los grupos experimentales (ver Fig. 26).

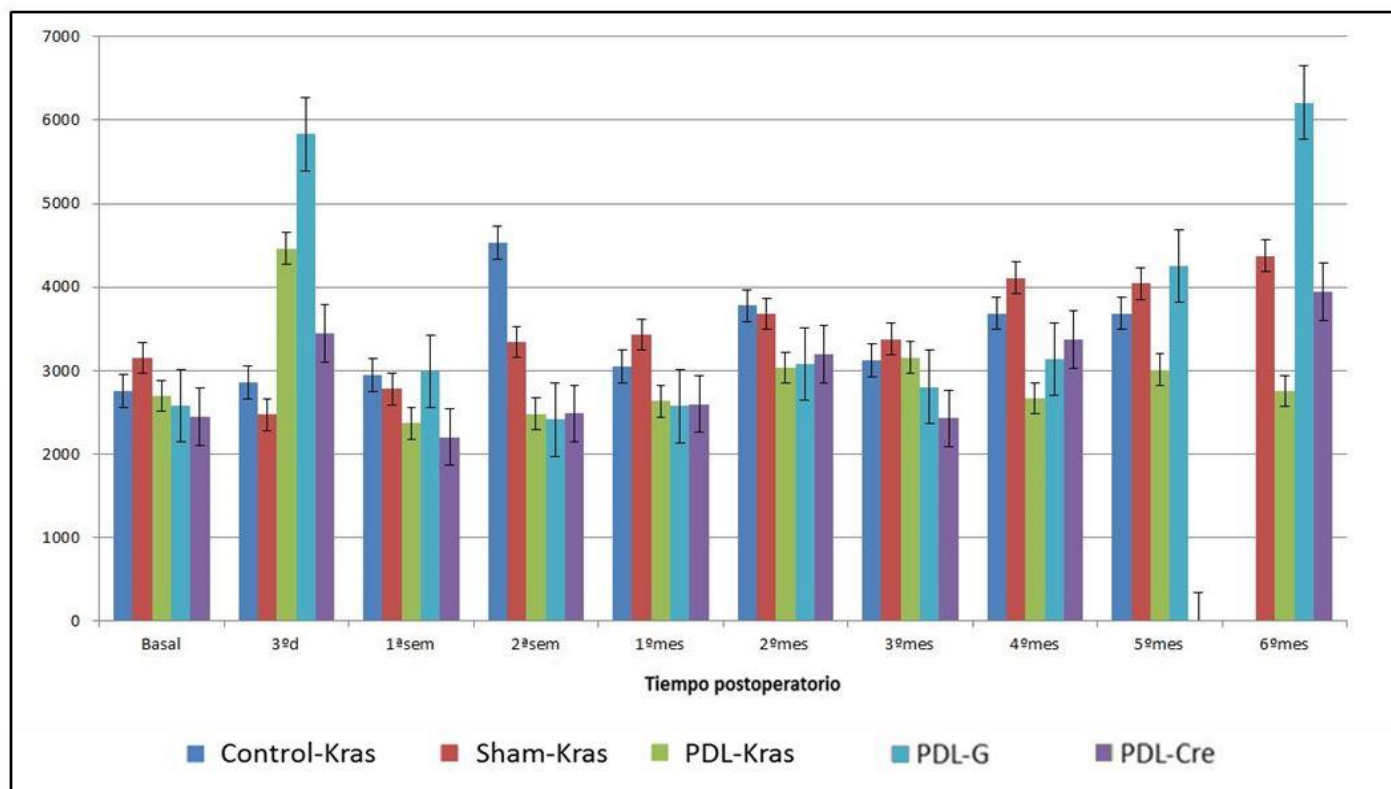


Fig. 26.- Evolución de la amilasemia durante el seguimiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas (datos expresados como; media U/L, barras; ES).

Un animal, el PDL-Cre 9, presentó un valor de amilasa en sangre elevado de 91.010 U/L y 14.024 U/L al 1er y 7º días postoperatorios, con posterior normalización a la 2ª semana. Revisados los datos clínicos e histológicos relativos de este animal, no se identificó ninguna desviación remarcable, y fue sacrificado según lo previsto al mes postoperatorio sin hallazgos destacables en la necropsia. Por ello, se le consideró estadísticamente como un valor atípico en la representación gráfica.

4.3 Análisis histológico

Se realizó el estudio histológico del páncreas en los 70 animales sacrificados en el momento del postoperatorio programado, y en 8 animales con MNE ocurrida a partir del 3º día PO, según se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.- Distribución de animales sometidos a los análisis histológicos, según grupo experimental y momento de la necropsia.

		NECROPSIA		
		PO programado	MNE >3ºd PO	TOTAL
SUBGRUPOS	Control-Kras	13	0	13
	Sham-Kras	8	3	11
	PDL-Kras	26	3	29
	PDL-G	12	1	13
	PDL-Cre	11	1	12
	TOTAL	70	8	78

En ellos, siguiendo el protocolo establecido, se seccionaron de forma seriada el PP y el PD en cortes de 3 µm (total de; 11200). Se seleccionó uno de cada 20 cortes, que se tiñó con HE para su posterior análisis. De esta forma, se analizaron 568 preparaciones, lo que supone una media de 8 preparaciones por animal, que se consideraron representativas de toda la muestra.

En el estudio macroscópico, se observó una atrofia del PD en todos los animales sometidos a PDL (PDL-Kras, PDL-G y PDL-Cre), sin diferencias en relación a su fondo genético, respecto a animales no sometidos a PDL (comparación con los grupos control-Kras y sham-Kras; $p < 0,001$, $p = 0,004$, respectivamente). El PD atrofico presentó

una disminución del tamaño del lóbulo esplénico con una coloración más ocre que el resto del parénquima (ver Fig.27).

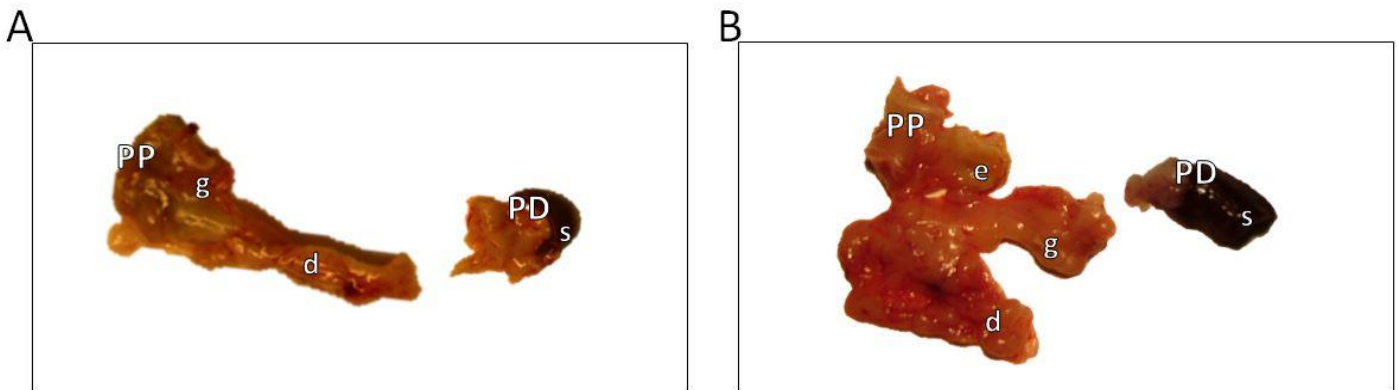


Fig. 27.- Aspecto macroscópico de los diferentes segmentos pancreáticos tras la PDL en animales Kras. A: animal control-Kras. B: animal PDL-Kras. Obsérvese el pequeño tamaño y color ocre del páncreas distal tras la PDL en B, en contraste con la ausencia de PDL en A. PP: segmento de páncreas proximal; lóbulos gástrico (g) y duodenal (d), remanente gástrico (e). PD: segmento de páncreas distal (lóbulo esplénico). Remanente esplénico (s).

En relación al análisis microscópico, se analizó en primer lugar la relación entre el tipo de atrofia microscópica observada (categorías; "ausente", "leve/moderada", "extensa"; ver Fig. 28 y Tabla 5) mediante un análisis intergrupo en el PD entre ratones sometidos a PDL.

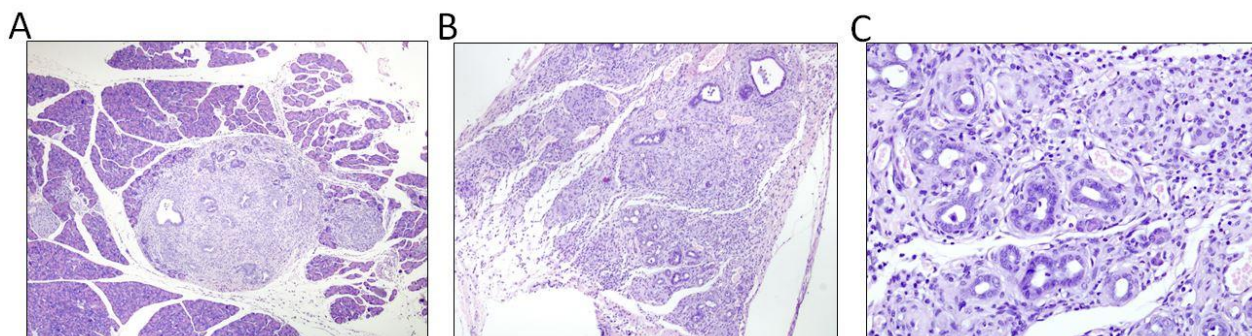


Fig. 28.- Aspectos histológicos del análisis de la atrofia exocrina en el PD de animales PDL. A: Atrofia leve/moderada, o lobulillar (escala: x10). B: Atrofia extensa (escala: x20). C: Detalle de atrofia extensa (escala: x200), donde se aprecia la sustitución de las células acinares por estructuras ductales, fibroblastos y tejido conectivo.

Tabla 5.- Distribución de las categorías de atrofia microscópica consideradas en el PD de los diferentes grupos experimentales.

		CATEGORÍAS DE ATROFIA			
		Ausente	Leve/Mod	Extensa	TOTAL
SUBGRUPOS	Control-Kras	13	0	0	13
	Sham-Kras	5	6	0	11
	PDL-Kras	2	13	14	29
	PDL-G	2	2	9	13
	PDL-Cre	2	2	8	12
	TOTAL	24	23	31	78

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la presencia de atrofia microscópica “extensa” en el PD respecto a los grupos no sometidos a PD (comparación con los grupos control-Kras y sham-Kras; $p < 0,001$, $p = 0,005$, respectivamente), sin diferencias entre fondo genético, ni entre los segmentos de PP. No se observaron diferencias significativas

respecto a la presencia de atrofia categorizada como "leve/moderada". Tampoco se observaron diferencias significativas entre los PD de los ratones sometidos a PDL, tras analizarlos en los diferentes momentos del PO (1, 3, y 6 meses).

En segundo lugar, en el análisis intragrupo, destaca la presencia de una mayor presencia de atrofia microscópicamente "extensa" en el PD respecto al PP de cada animal, dentro de los grupos sometidos a PDL (grupos PDL-Kras, PDL-Cre y PDL-G; $p=0,001$, $p=0,014$ y $p=0,005$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en estos grupos respecto a la categoría de atrofia "leve/moderada" entre segmentos pancreáticos.

Dado que el modelo murino utilizado puede presentar lesiones preneoplásicas con un patrón histológico similar a la atrofia microscópica leve, interesaba analizar la relación entre la atrofia y el número de PanIN 1 y de HGPL. Tal y como muestra la figura 29 A y C, se observó una reducción significativa del número medio de lesiones por animal en el PD de los animales que presentan atrofia extensa, respecto al de los animales sin atrofia, tanto PanIN1 ($8,2\pm 29,8$ vs. $43,8\pm 46,6$; $p<0,001$), como de HGPL ($0,4\pm 2,1$ vs. $1,3\pm 3,7$; $p=0,059$).

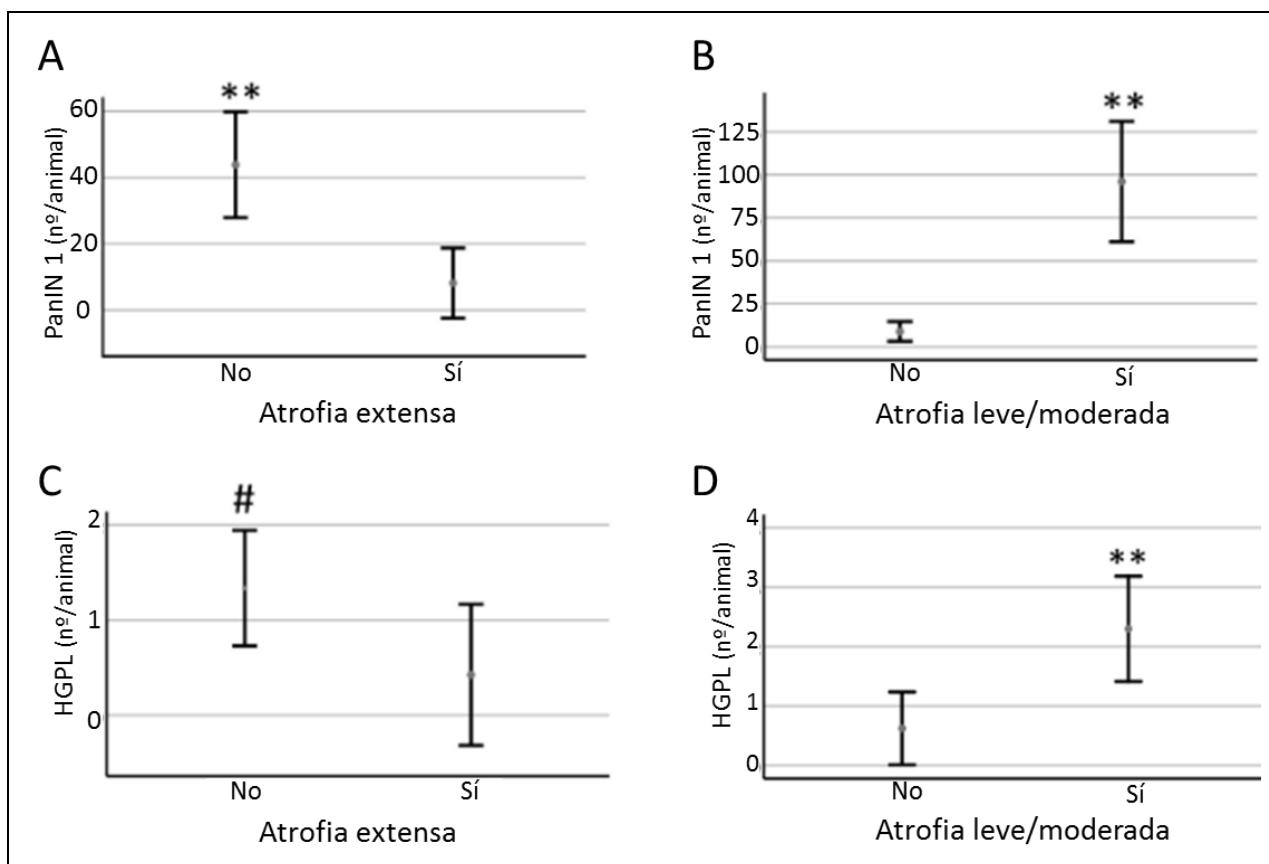


Fig. 29.- Relación de la presencia de lesiones preneoplásicas y la atrofia microscópica tras la PDL. La atrofia extensa se asoció a un menor número de PanIN 1 (A) y HGPL (C), mientras que la leve/moderada a un aumento de ambas; PanIN 1 (B) y HGPL (D). Datos expresados como; media del nº de lesiones por animal, barras; ES (**p<0,01; # p=0,059).

En cambio, en el estudio microscópico de los animales con atrofia leve del PD no se demostró una reducción significativa del número de lesiones preneoplásicas respecto a los animales sin atrofia (ver Fig. 29 B y D).

Análisis semicuantitativo de la inflamación a nivel microscópico:
 Teniendo en cuenta la posible relación de la PDL con la presencia de inflamación como estrés quirúrgico, se hizo una estimación de los infiltrados inflamatorios según las cuatro categorías consideradas, tal y como se describe en el apartado 3.10.3: "ausente", "periductal", "transductal/reactiva", o "extensa" (ver Fig.30 y tabla 6).

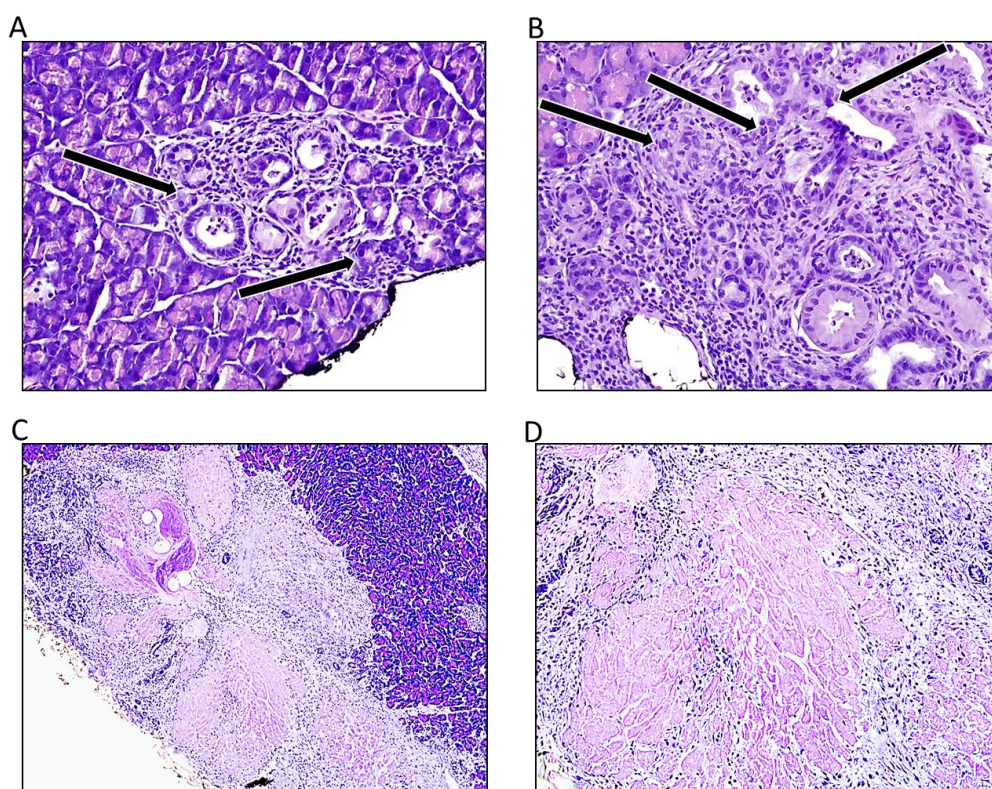


Fig. 30.- Infiltrados inflamatorios observados en ratones Kras. A: Infiltrado de polimorfonucleares periductal en el PP del animal sham-Kras 32 (PO 3 meses). Estos infiltrados se describen como propios del modelo murino utilizado. Flecha: leucocitos adyacentes a células del epitelio ductal (escala: x20). B: Cambios inflamatorios reactivos a la cirugía o infiltrado inflamatorio transductal, en el mismo animal. Flecha: infiltrado de PMN y linfocitos que atraviesa el epitelio ductal (escala: x20). C y D (detalle): Foco local de necrosis pancreática con infiltrado inflamatorio extenso agudo y crónico en PP del animal PDL- Kras 38 (presentó MNE por evisceración al 8º día PO) (escala: x4, x10).

Tabla 6.- Distribución de las categorías de inflamación microscópica consideradas en el PP y PD de los diferentes grupos experimentales.

		SEGMENTOS PANCREÁTICOS								TOTAL
		PP				PD				
		CATEGORÍAS DE INFLAMACIÓN				CATEGORÍAS DE INFLAMACIÓN				
		Ausente	Periductal	Transductal	Extensa	Ausente	Periductal	Transductal	Extensa	
SUBGRUPOS	Control-Kras	10	3	0	0	8	5	0	0	26
	Sham-Kras	5	3	2	1	5	4	1	1	22
	PDL-Kras	19	8	1	1	21	2	3	3	58
	PDL-G	11	2	0	0	11	1	1	0	26
	PDL-Cre	8	3	1	0	6	5	1	0	24
TOTAL		53	19	4	2	51	17	6	4	156

Al analizar la presencia o ausencia de infiltrados inflamatorios no propios del modelo (categorías "transductal" y "extensa") en el PD de los animales sometidos a cirugía (grupos; sham-Kras, PDL-Kras, PDL-Cre, PDL-G) vs. los no sometidos a cirugía (control-Kras); no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En el análisis paralelo del PP, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas. De la misma manera, en el análisis intragrupo tampoco se observaron diferencias significativas respecto a las categorías de inflamación transductal y extensa analizadas entre PP y DP de cada animal, analizado de forma independiente para cada subgrupo experimental (grupos sham-Kras, PDL-Kras, PDL-Cre, PDL-G).

Con el objetivo de descartar la PDL como factor inductor de la presencia de infiltrados inflamatorios a nivel histológico, se analizó la posible relación entre alguna de las lesiones preneoplásicas consideradas en los grupos sham-Kras y PDL-Kras, y la presencia de inflamación; "transepitelial" y "extensa". No se observó una

variación en su número estadísticamente significativa para ninguna lesión preneoplásica, tras el análisis intergrupo e intragrupo.

4.3.1 Distribución de lesiones preneoplásicas en ratones *Kras*

Con el objetivo de validar el modelo murino transgénico empleado, se estudió la presencia de lesiones preneoplásicas en las líneas progenitoras (PDL-G y PDL-Cre), descartándose su presencia. Únicamente se observaron lesiones preneoplásicas en los ratones *Kras* (control-*Kras*, sham-*Kras* y PDL-*Kras*), resultados que validan el modelo murino transgénico utilizado. Por tanto, de aquí en adelante nos centramos únicamente en el análisis del grupo PDL-*Kras*.

La lesión preneoplásica más observada fue el PanIN 1 (n=6394), con una media de lesiones observadas para cada animal de $60,3 \pm 108$ equivalente al 97% del total de lesiones preneoplásicas observadas. Le siguen las AFL (n=142), con una media de lesiones por animal de $1,3 \pm 2,6$ (2,5% del total), las PanIN 2 (n=32) con una media de $0,3 \pm 0,8$ lesiones por animal (0,4% del total) y finalmente las PanIN 3 (n=10) con $0,09 \pm 0,6$ lesiones por animal (equivalente a 0,1%).

Según lo expuesto en el apartado previo 3.10.3, se analizaron los resultados de PanIN 1 y por separado los de las lesiones de mayor potencial preneoplásico (HGPL) que incluyen lesiones; PanIN 2, PanIN 3 y AFL.

Análisis de PanIN 1

En el análisis intergrupo de estas lesiones se observó que en el PP de todos los grupos Kras aumenta el número de lesiones conforme avanza el tiempo. Este aumento tiene un buen ajuste con una correlación lineal ($r=0,57$; $p<0,01$) sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En relación al PD, se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Es evidente un incremento del número de PanIN 1 en los grupos sham-Kras y control-Kras durante el seguimiento, con buen ajuste a la correlación lineal ($r=0,503$, $p=0,02$ e IC 95% 12,96-135,63), pero no así en el grupo PDL-Kras. En concreto para PDL-Kras, tal como muestra la figura 31 (i), a los 3 meses se observa un descenso en el número de PanIN 1 que es estadísticamente significativo a los 6 meses, en comparación con los grupos no sometidos a PDL (control-Kras y sham-Kras).

Si analizamos los cambios intragrupo, se observó en el grupo PDL-Kras un número significativamente menor de PanIN 1 en el PD en comparación con el PP en cada periodo de seguimiento. Tal y como muestra la figura 31 (i), las diferencias entre PP y PD son estadísticamente significativas al 1er y 6º mes ($p=0,001$; $p=0,002$) y rozan la significación al 3er mes de PO ($p=0,053$). Cabe destacar que a los 6 meses de PO, el número de PanIN 1 en PD es casi 24 veces menor que en PP (7 ± 21 vs. 169 ± 151 lesiones medias por animal \pm DS).

Por el contrario, en los grupos control-Kras y sham-Kras no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de PanIN 1 entre segmentos de PP y PD en ningún periodo del seguimiento.

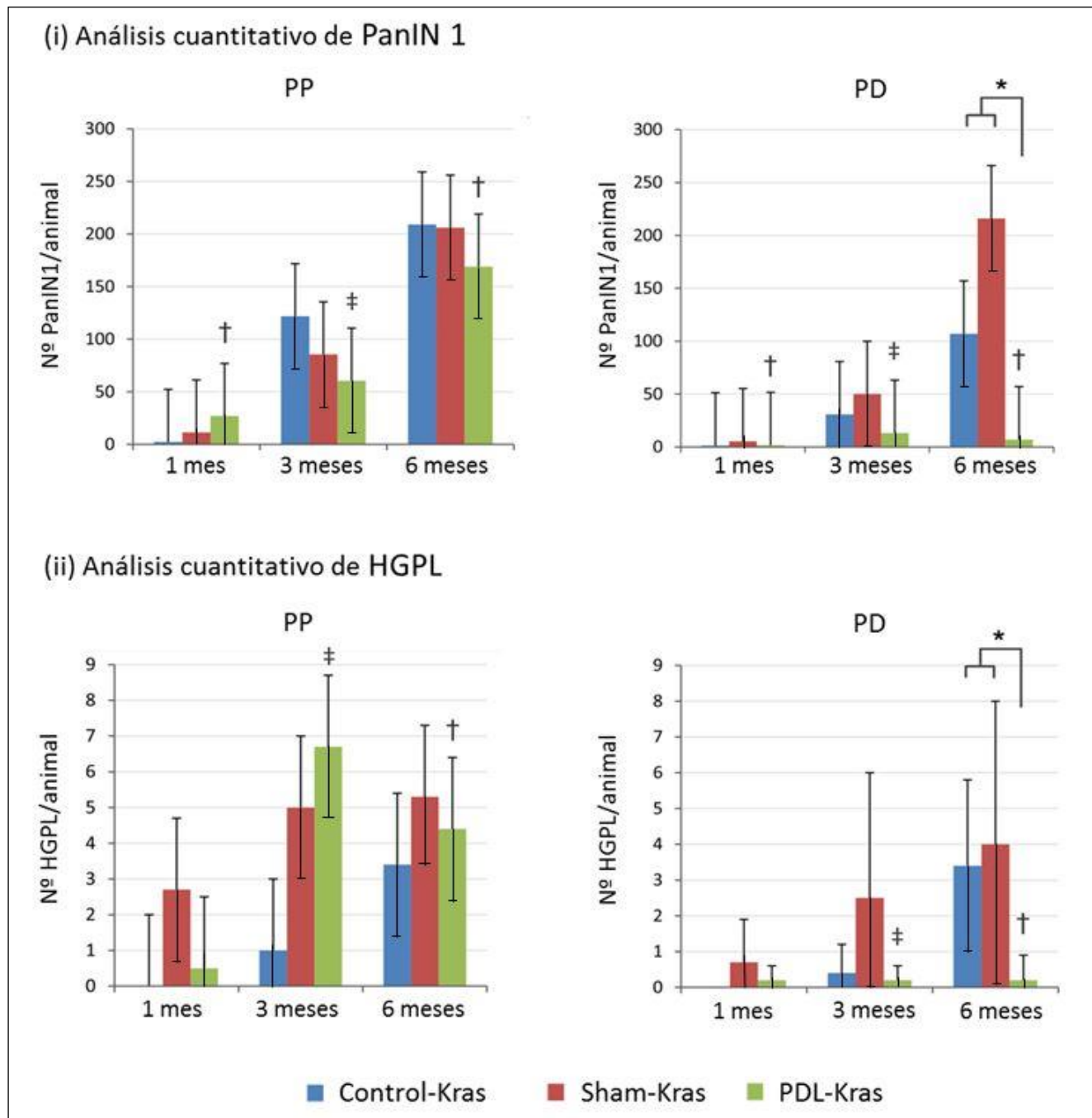


Fig. 31.- Evolución en el tiempo de las diferentes lesiones preneoplásicas analizadas por segmentos pancreáticos. Datos expresados en; nº lesiones medias por animal, barras; ES)

En (i) se muestra el ascenso con el tiempo del número de PanIN1 en los PP de todos los grupos. En relación a los PD destaca el descenso de PanIN1 en el grupo PDL-Kras vs. el resto de grupos, estadísticamente significativo a los 6 meses de PO (*; $p=0,01$). En el análisis intragrupo de los PDL-Kras se observa un descenso de PanIN1 en el PD respecto al PP en todos los momentos analizados del PO (+; $<0,05$), (\ddagger ; $p=0,05$).

En (ii) se muestra la tendencia al ascenso con el tiempo del número de HGPL en los PP de todos los grupos. En relación a los PD destaca el descenso de HGPL en el grupo PDL-Kras vs. el resto de grupos, estadísticamente significativo a los 6 meses de PO (*; $p=0,01$). De nuevo, en el análisis intragrupo de los PDL-Kras se observa un descenso de HGPL en el PD respecto al PP a los 3 y los 6 meses del PO (+; $<0,05$), (\ddagger ; $p=0,05$).

Análisis de HGPL

En el análisis intergrupo de los segmentos de PP se observó también un incremento de lesiones conforme avanzaba el seguimiento, aunque no de forma estadísticamente significativa [Fig. 31 (ii)] y no hubo diferencias entre grupos.

En relación al PD, se observaron de nuevo diferencias significativas en el número de HGPL entre los grupos experimentales. Hubo un incremento en el número de HGPL en los grupos control-Kras y sham-Kras durante el seguimiento con buen ajuste a una correlación lineal ($r=0,562$; $p=0,008$). Por el contrario, no se observó dicho incremento en el número de HGPL en los segmentos de PD del grupo PDL-Kras. En concreto en el 6^o mes de seguimiento el número de HGPL fue significativamente menor ($p=0,01$) que en el resto de grupos no sometidos a PDL (control-Kras y sham-Kras). Además, cabe destacar que al mes de PO, se identificó ya un descenso en el número de HGPL que persistió a los 3 meses, aunque no alcanzó significación estadística.

De manera similar a lo observado en relación a los PanIN 1, en el análisis intragrupo de HGPL se constató en el grupo PDL-Kras un

número menor de estas lesiones en el PD en comparación con el correspondiente segmento de PP en todos los periodos del PO. Esta disminución no fue estadísticamente significativa al mes, rozó la significación a los 3 meses ($p=0,05$) y resultó significativa a los 6 meses de PO ($p=0,035$), según se muestra en la figura 31 (ii). En este caso, analizando el número de lesiones a los 6 meses, se observa que la disminución de lesiones HGPL en PD respecto el PP es de hasta 22 veces menor, con una $0,2 \pm 0,7$ lesiones medias por animal \pm DS en el PD, que ascienden a $4,4 \pm 5,5$ en el PP.

En concreto, al analizar los diferentes tipos de HGPL en el grupo PDL-Kras, se observó una disminución casi significativa tanto de PanIN 2 como de AFL en el PD respecto al PP ($p=0,058$ y $p=0,05$; respectivamente) a los 3 meses de PO que finalmente resultó estadísticamente significativa a los 6 meses de PO para las lesiones PanIN 2 ($p=0,01$). Aunque las AFL también disminuyeron a los 6 meses en el PD respecto al PP ($0,2\pm 0,7$ vs. 3 ± 4 lesiones medias por animal \pm DS), estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. En cuanto a los PanIN 3, a diferencia de lo observado en los grupos control-Kras y sham-Kras, a los 6 meses de PO no se observaron estas lesiones ni en PP ni en PD.

De forma similar al análisis previo de los PanIN 1, en los grupos control-Kras y sham-Kras no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de HGPL entre segmentos de PP y PD en ningún periodo del seguimiento.

Los resultados del análisis univariante y multivariante, permitieron identificar qué factores predisponen a la presencia de HGPL en el PD. En el análisis univariante dos variables resultaron significativas: el tiempo postoperatorio ($p=0,03$) y la inclusión en un grupo experimental determinado (control-Kras, sham-Kras, PDL-Kras; CSL, $p=0,003$). En el análisis multivariante se observó cómo, por cada aumento de periodo PO considerado (de 1-3 meses y de 3-6 meses), se incrementó hasta 3 veces la probabilidad de presencia de HGPL en el PD de forma estadísticamente significativa (OR: 2,9; IC95% 1,09-8,02; $p=0,028$). En relación a la variable grupo CSL, se observó que pertenecer al grupo PDL-Kras es un factor protector de presencia de HGPL en PD respecto a control-Kras (OR: 0,14; IC95% 0,20-10,03; $p=0,03$). Dicho de otra

manera, pertenecer al grupo sham-Kras supone un incremento del riesgo de presentar HGPL en el PD de hasta 9,8 veces en relación a los PDL-Kras (OR: 9,84; IC95% 1,21-785,92; $p=0,028$), y pertenecer al grupo control-Kras de hasta 6,9 veces en relación a PDL-Kras (OR: 6,876; IC95% 1,21-39,17; $p=0,03$).

4.3.2 Otros hallazgos histológicos

En la revisión histológica de las muestras se detectaron otros hallazgos destacables. En 5 animales (cuatro PDL y un sham; 6% del total) se observaron colecciones líquidas peripancreáticas, en 3 casos compatibles con abscesos (ver Fig. 32 A y B) y en 2 casos pseudoquistes (ver Fig. 32 C y D). En el análisis de estos casos no se observó una asociación significativa de la presencia de colección peripancreática con ninguna de las variables siguientes: grupo experimental (PDL-Kras vs sham-Kras vs control-Kras), fondo genético (Kras vs no Kras), tiempo de PO, presencia de HGPL, hiperamilasemia, o causa de muerte del animal.

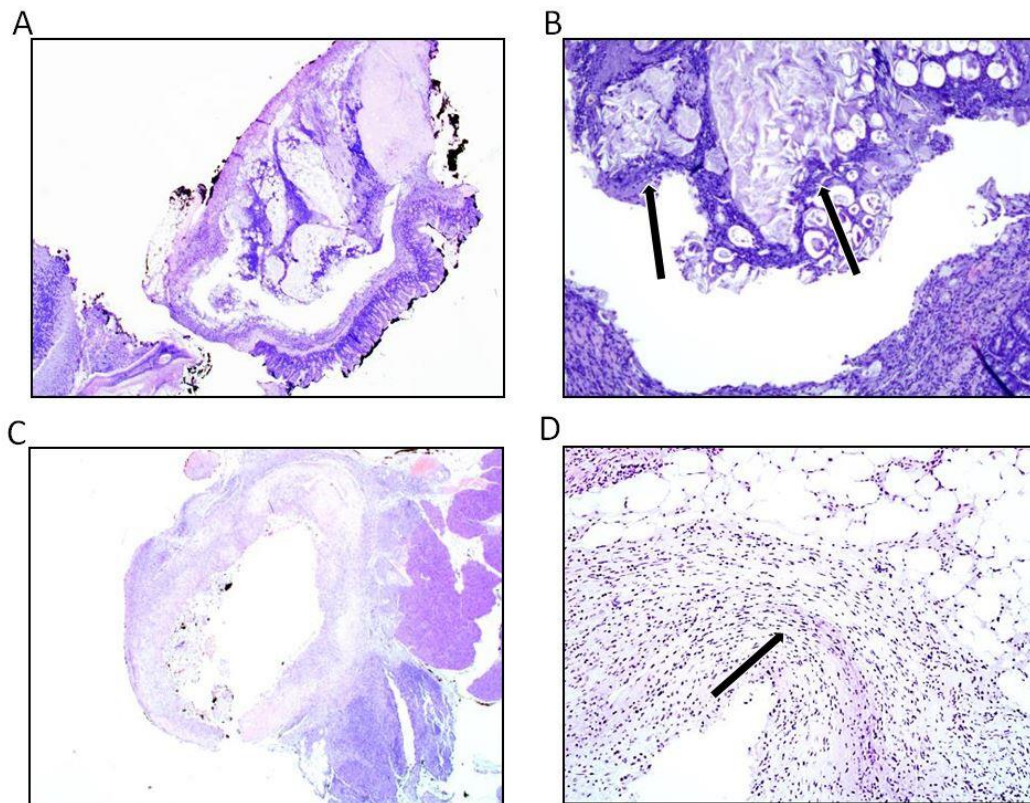


Fig. 32.- Hallazgos histológicos en necropsias programadas de animales. A y B (detalle): área de necrosis grasa abscesificada en PD de animal PDL-Kras (PO 1 mes). Obsérvese el infiltrado leucocitario (flecha en B) (escala; x2, x10). C y D (detalle): pseudoquiste en PD de animal PDL-Cre 3 (PO 6 meses). Obsérvese infiltrado linfocitario (flecha en D) (escala; x2, x10).

Se ha observado asimismo la presencia de un adenocarcinoma bien diferenciado en un único animal, el PDL-Kras 9 (ver Fig. 33).

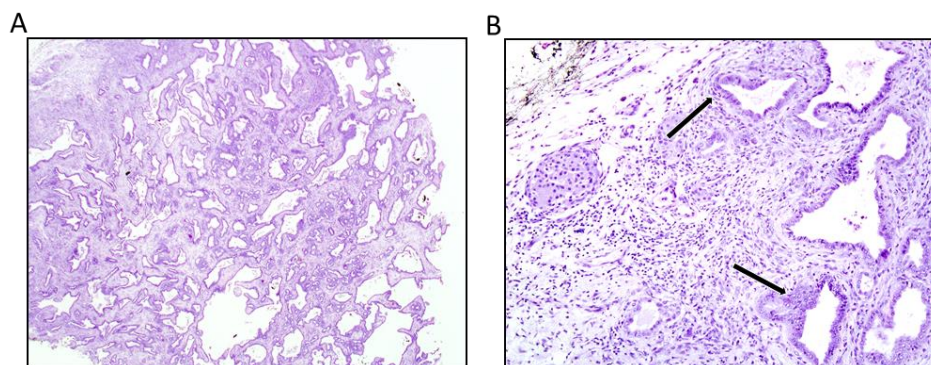


Fig. 33.- Adenocarcinoma como hallazgo en necropsia programada en animal PDL-Kras (PO 6 meses). A: pseudoductos desestructurados reemplazando el tejido pancreático normal, sin infiltrar órganos adyacentes (escala: x2). B (Detalle): se asocian lesiones PanIN 2 y 3 (flechas; superior e inferior respectivamente) sin presencia de infiltrados inflamatorios (escala: x10).

Se revisaron los registros de laboratorio y la necropsia para ver si el animal pudiera haber presentado algún tipo alteración del curso clínico, que no fue el caso. El animal fue sacrificado de forma programada los 6 meses PO, sin poderse identificar la ligadura en la necropsia. Macroscópicamente se describió un páncreas de consistencia aumentada y forma redondeada.

4.4 Análisis genómico (Microarrays)

En la tabla 4 se recogen los 38 genes en los que se detectaron expresiones con diferencias estadísticamente significativas entre los animales PDL-Kras analizados, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.10.4. En el PD sometido a ligadura, 36 de estos genes presentaban una expresión disminuída y otros 2 aumentada.

La gran mayoría de los genes regulados negativamente (expresión disminuída) correspondían a enzimas acinares o estaban relacionados con la función acinar (ver Tabla 7 y Fig. 34 C).

Tabla 7.- Expresión génica diferencial. Selección de 38 genes con expresión diferencial significativa entre PP y PD (FDR<0,25) en nimaes PDL-Kras. Se detallan; nombre del gen, fold change (PD-PP) y p-valor

Gen (símbolo)	Gen (nombre)	LogFold Change	p valor ajustado
Cel	carboxyl ester lipase	-3,63	0,0002
Sycn	syncollin	-3,42	0,0012
Klk1	kallikrein 1	-3,01	0,0014
Pnliprp1	pancreatic lipase related protein 1	-3,04	0,0014
Nupr1	nuclear protein transcription regulator 1	-2,82	0,0016
Gm5409	predicted pseudogene 5409	-2,42	0,0017
Try5	trypsin 5	-2,92	0,0017
2210010C04Rik	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	-2,14	0,0019
Prss1	protease, serine 1 (trypsin 1)	-2,74	0,002
Prss2	protease, serine 2	-2,93	0,002
Rnase1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	-4,17	0,0024
Zg16	zymogen granule protein 16	-2,23	0,0024
Cpb1	carboxypeptidase B1 (tissue)	-2,71	0,0025
Try10	trypsin 10	-2,42	0,0025
Gm5771	predicted gene 5771	-2,3	0,0026
Cpa1	carboxypeptidase A1, pancreatic	-2,51	0,0026
Ctrl	chymotrypsin-like	-2,55	0,003
Cela2a	chymotrypsin-like elastase family, member 2A	-2,39	0,003
Cela1	chymotrypsin-like elastase family, member 1	-2,07	0,0049
Gp2	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	-2,29	0,0068
Clps	colipase, pancreatic	-3,26	0,007
Pnlip	pancreatic lipase	-1,7	0,007
Try4	trypsin 4	-2,58	0,007
Cpa2	carboxypeptidase A2, pancreatic	-2,91	0,0073
Pnliprp2	pancreatic lipase-related protein 2	-2,24	0,0077
Ctrb1	chymotrypsinogen B1	-3,45	0,0089
Amy2a1	amylase 2a1	-3,1	0,0095
Cela3b	chymotrypsin-like elastase family, member 3B	-2,23	0,0095
Cela3a	chymotrypsin-like elastase family, member 3A	-1,89	0,0152
Mt1	metallothionein 1	-2,05	0,0162
Nhs1	NHS-like 1	1,55	0,0181
Dmbt1	deleted in malignant brain tumors 1	-1,55	0,0189
Ggt1	gamma-glutamyltransferase 1	-2,1	0,026
Reg1	regenerating islet-derived 1	-2,39	0,0283
Gm10334	predicted gene 10334	-1,5	0,0304
Tff2	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	-2,96	0,0429
Srpr	signal recognition particle receptor (docking protein)	-1,31	0,0488
Zdhhc16	zinc finger, DHHC domain containing 16	2,04	0,0491

El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) mostró también esta inhibición en la función acinar en el PD de ratones PDL-Kras (ver Fig. 34 B).

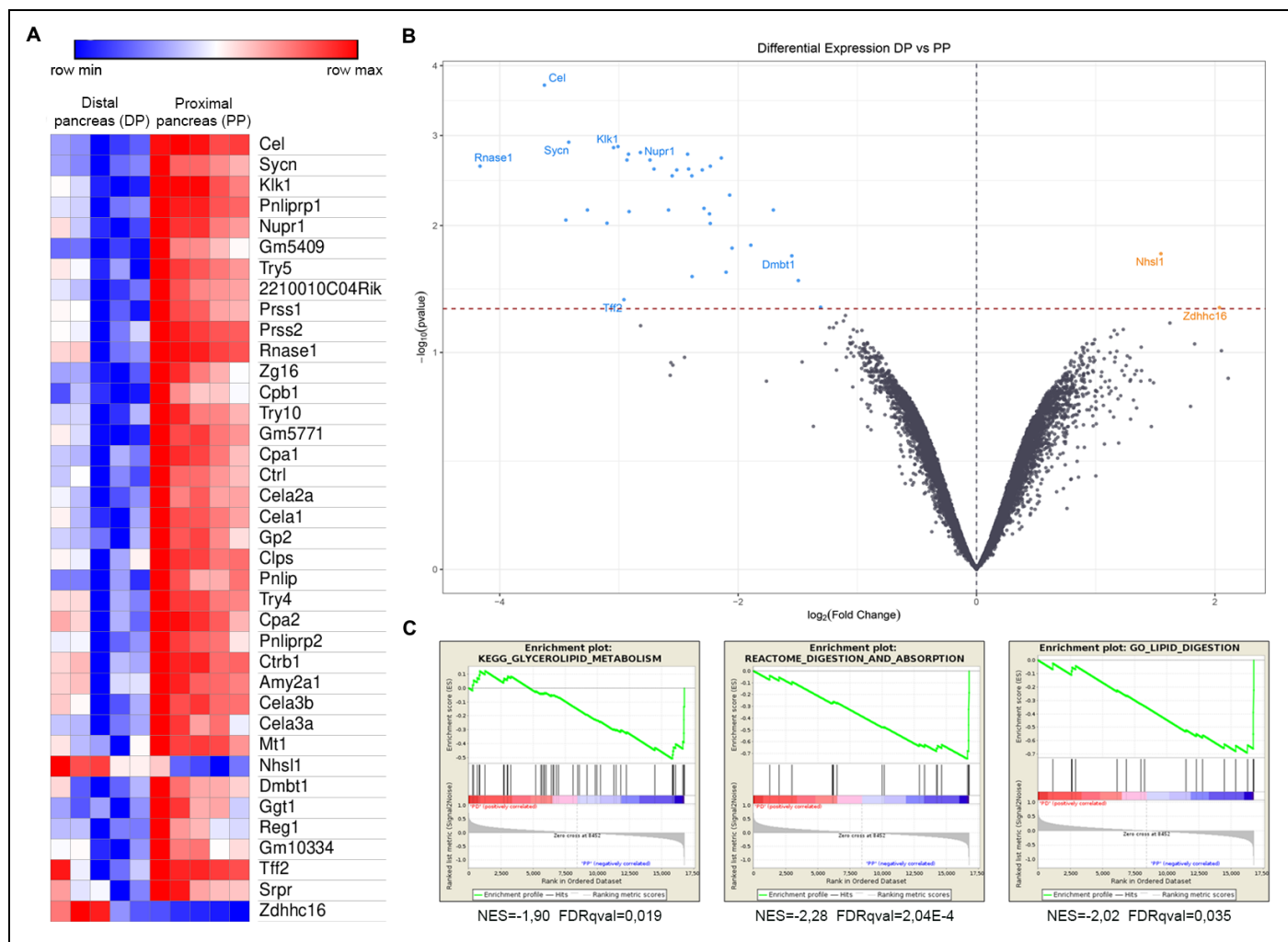


Fig. 34.- Expresión diferencial de genes tras la PDL. (A) Clúster jerárquico de los 38 genes expresados diferencialmente entre segmentos pancreáticos ($p < 0,05$). (B) Gráfica tipo Volcano plot que muestra genes expresados de manera significativa, algunos de los cuales están relacionados previamente con la fisiopatología del ADCP (azul: sobreexpresado en PP; amarillo: sobreexpresado en DP) ($p < 0,05$). (C) El análisis mediante GSEA muestra asimismo la inhibición en la función acinar en el PD de ratones PDL-Kras después de la PDL ($p < 0,05$).

Cabe destacar la relación que se ha observado entre algunos de los genes inhibidos identificados (*Sycn*, *Nupr1*, *Klk1*, *Tff2*, *Pnlip*, *Dmbt1*, *Cel*, *Cpa1*, *Mt1*, *Pnlipr1*, *Sycn*, *Prss1*, *Prss2*, *Rnase*) y el desarrollo del ADCP. Los genes *Zdhhc16* y *Nhs1* estuvieron sobreexpresados en el PD en comparación con el PP. El gen *Zdhhc16* se relaciona con procesos de reparación de DNA y con el desarrollo de la apoptosis.

De los genes descritos, se validaron mediante qPCR 6 genes con sobreexpresión de interés en relación al páncreas (*Prss2*, *Ctrl*, *Try5*, *Tff2*, *Reg1*, *Nupr1*), utilizando como control endógeno *18S*. Estos genes se estudiaron en 10 muestras apareadas de PP y PD (PDL-Kras 23, 25, 47, 56, 59). Debido al pequeño tamaño de las muestras de páncreas atrófico del PD, la técnica de microdissección necesaria para la qPCR fue compleja y fue preciso realizar una preamplificación del DNA previo a su análisis. Tras 3 análisis de qPCR, no se demostró expresión significativa diferencial en ninguno de ellos, aunque sí se corroboró una mayor expresión de *Nupr1* en PP que en el PD en la mayoría de animales analizados (ver Fig. 35).

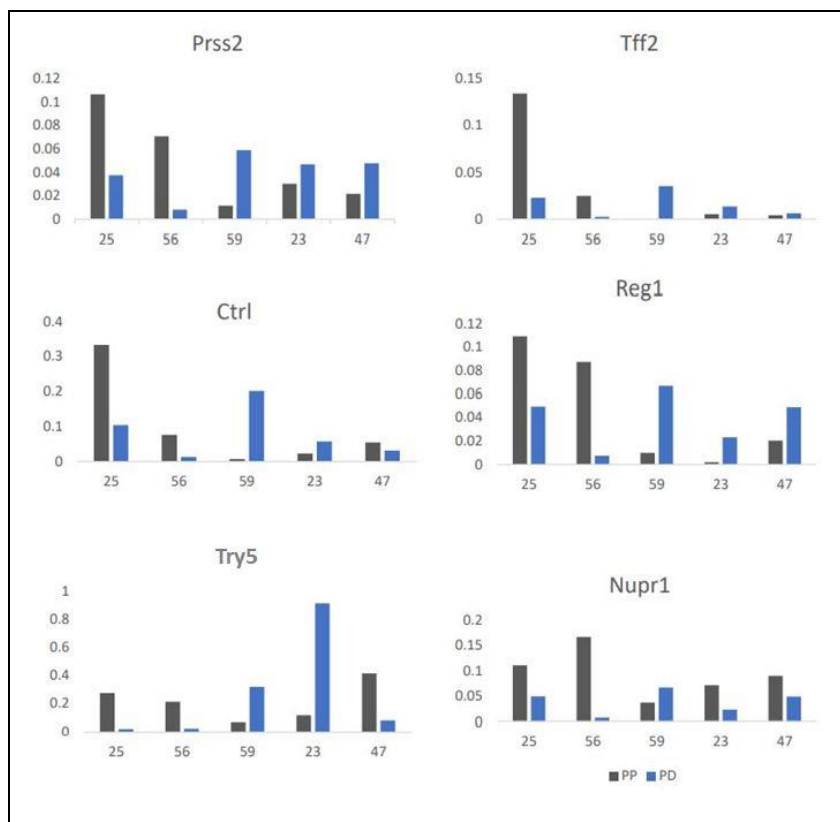


Fig. 35.- Validación de resultados mediante qPCR en genes de interés. Comparativa de expresión diferencial entre PD y PP. Nupr1 se halla sobreexpresado en PP en relación a PD en la mayoría de los animales ($p > 0,05$).

Capítulo 5: DISCUSIÓN

La evolución hacia un ADCP sigue siendo un problema clínico no resuelto. Aunque la secuencia PanIN en los acinos pancreáticos (páncreas exocrino) está bien descrita, en la actualidad no se dispone de prueba diagnóstica alguna que permita su detección en el hombre. En ese contexto, no cabe plantear un tratamiento quirúrgico radical precoz del ADCP posibilidad que, en el momento actual, sólo es posible en menos del 5% de los casos. Además, en la práctica clínica se plantean dilemas diagnóstico-terapéuticos, como el hallazgo de un PanIN de alto grado en el margen de resección de la pieza tras una pancreatometomía quirúrgica y su implicación en un mayor riesgo de desarrollo de una segunda neoplasia pancreática en el remanente. Otros problemas clínicos habituales son la incertidumbre terapéutica ante el hallazgo de una lesión incidental con potencial neoplásico en el páncreas. A pesar de existir algoritmos diagnósticos de seguimiento vs. tratamiento quirúrgico, los casos clínicos reales siguen siendo a veces difíciles de clasificar mediante los algoritmos actuales.

Se hace patente así la necesidad de estudios que profundicen en este desarrollo preneoplásico preclínico, con la esperanza de generar nuevas hipótesis diagnósticas y terapéuticas más precoces y efectivas que las actuales, muchas veces ya tardías.

Esta tesis tiene como objetivo ampliar el conocimiento de los mecanismos fisiológicos asociados al desarrollo oncológico del ADCP, utilizando un modelo animal transgénico específico que desarrolla una forma conocida la secuencia PanIN hasta el desarrollo de ADCP. La hipótesis del trabajo está basada en que la inducción de una atrofia exocrina en el remanente pancreático podría inhibir la progresión hacia el ADCP. Para ello, se realizó la ligadura del conducto pancreático para inducir atrofia exocrina en

el PD en un modelo murino de ADCP, y se analizó el impacto de la ligadura desde el punto de vista histológico y genético.

En primer lugar se validó el modelo murino transgénico empleado y, al igual que otros autores^{15,49}, se observaron lesiones preneoplásicas tipo PanIN y AFL, y no así en los animales controles de sus dos líneas progenitoras, sometidos a las mismas técnicas quirúrgicas.

La supervivencia global en los ratones sometidos a PDL fue del 80%, sin comparación posible con otros datos de la literatura ya que no se han encontrado datos publicados en relación a supervivencia en aquellos trabajos en los que se empleó la técnica de la PDL^{61,182,183}. Llama la atención la menor supervivencia de los animales sham-Kras (67%). Tras analizar las causas de exitus en estos animales, no tenemos una explicación clara más allá de que la ausencia de PDL en estos animales no estimuló la atrofia exocrina, por lo que el parénquima pancreático podría haber estado más reactivo tras la disección provocando complicaciones y reduciendo la supervivencia en estos animales. La cirugía *per se* supone un estrés metabólico, factor que ha sido descrito previamente en la literatura¹⁸⁴. Ésto se correlaciona con la disminución de peso observada en los animales intervenidos al 3er día postoperatorio, que posteriormente se recupera.

A pesar de que algunos estudios han descrito la aparición de una pancreatitis como posible efecto adverso de la PDL^{79,80,185}, nuestros resultados no parecen apoyar esta hipótesis. La monitorización de los niveles de amilasa en sangre durante el postoperatorio de los animales muestra que sólo un 2% de los animales sometidos a cirugía presenta hiperamilasemia. Al analizar la posible existencia

de una relación entre la hiperamilasemia y la presencia de pancreatitis o una MNE, no se detectó ninguna asociación estadísticamente significativa. La hiperamilasemia es un dato que contribuye al diagnóstico de pancreatitis aguda, pero que se observa también en otras situaciones clínicas. Así, se ha descrito en el postoperatorio de cirugías abdominales, en el cáncer de páncreas, en gastroenteritis, cuadros de oclusión intestinal, de infección de las glándulas salivales, de colecistitis, o de úlcus perforado¹⁸⁶. En otros estudios experimentales similar al nuestro realizados por nuestro grupo observamos un aumento de amilasa en sangre en ratones sometidos a PDL, que se normaliza en días posteriores^{60,148}. Sin embargo, en nuestro estudio no se ha observado diferencias significativas en las concentraciones de amilasa sérica entre los grupos experimentales.

Algunos autores, como Meyerholz o Yuan *et al.*^{185,187}, describieron la inducción de una pancreatitis grave mediante una PDL quirúrgica del ducto pancreático principal adyacente a la desembocadura en el duodeno, proximal al drenaje biliar, que causa una oclusión total del drenaje del jugo pancreático y biliar hacia el sistema digestivo. En estos estudios no se analizaron lesiones preneoplásicas, sino efectos sistémicos del síndrome de respuesta inflamatoria. Esta técnica difiere de la nuestra, en el cual la PDL es distal, hecho que permite un drenaje de alrededor del 60% del páncreas del animal, evitando la pancreatitis grave sistémica. No se tratan de técnicas quirúrgicas comparables. Por otra parte Rhim *et al.*¹⁸⁸ describieron un aumento del número de PanIN en el páncreas ligado, aunque analizaron resultados únicamente en la primera semana postoperatoria.

Recientemente, se han publicado dos trabajos^{79,80} en los cuales se utiliza la PDL para estudiar la línea celular de origen del ADCP: acinar o ductal. En ambos se sugiere que las lesiones preneoplásicas que se observan son de origen ductal, y describen como habíamos hipotetizado en este trabajo una estimulación de p53 en células acinares relacionada con la aparición de atrofia en ese compartimento. Para el desarrollo del ADCP desde línea ductal es probable que intervengan factores epigenéticos aún desconocidos, además de varias mutaciones genéticas ya conocidas, tal y como se ha descrito en el apartado 1.1.3. En los dos trabajos previos citados se utiliza un modelo murino en el cual se activa el oncogén Kras en ratones ya adultos, portadores de la Ptf1a recombinasa CreER (línea acinar) o del alelo Sox9- CreER (línea ductal), inducibles mediante la administración de tamoxifeno oral en las primeras semanas de vida.

Esta metodología difiere de la nuestra, ya que nuestro modelo murino de knock in para Kras se activa en estado embrionario, y está presente en todas las líneas celulares (acinar y ductal), sin necesidad de una inducción química. Sin embargo, y de forma similar a nuestro trabajo, en ambos se analiza la presencia de lesiones preneoplásicas en el páncreas ligado.

En el primero de ellos, Cheng *et al.*⁷⁹ detectan un aumento de MAD y complejos tubulares (CT: lesiones similares a las AFL⁵⁰) en muestras de páncreas distal a la PDL, en comparación con otras muestras de PD de otros grupos control. Con estos resultados infieren el origen ductal del ADCP. Sin embargo, hemos identificado algunas limitaciones en el estudio. En primer lugar, las muestras de PD no se comparan con las de PP en los animales sometidos a PDL y, en segundo lugar, la descripción histológica de las lesiones

analizadas según apuntan, no implica *per se* un desarrollo irrevocable hacia el ADCP. De hecho, en ningún momento observan células con carácter invasivo o con displasia severa. Además no se realiza una cuantificación concreta de los PanIN, y las conclusiones se basan en la evaluación de índices de proliferación, evaluados únicamente hasta las 2 semanas postoperatorias.

Cheng *et al.* citan en su trabajo el doble origen acinar y ductal de los CT, asociando una menor expresión de p53 y p21 en células ductales respecto a las acinares, y describen las de origen ductal como más proliferativas y con menor actividad de p53 en tinciones histológicas a las 2 semanas PO (n=5) y a los 5 meses PO (n=5) - cuando describen un descenso “dramático” en la expresión de p53- como un argumento para demostrar la carcinogénesis hacia ADCP. Sin embargo, ésto se podría explicar por la acción de la propia atrofia fisiológica exocrina tras la PDL, que implica precisamente una desaparición de los acinos pancreáticos en relación a las células ductales y, en consecuencia, una menor inducción de la apoptosis y activación de p53 cuando se comparan ambas líneas celulares. Por otro lado, la consideración de la MAD como lesión preneoplásica resulta discutido ya que, tal y como han sugerido algunos autores⁷⁴⁻⁷⁶, podría ser un mecanismo reversible de transdiferenciación celular, de adaptación al estrés celular y del estroma (como el producido tras una cirugía, por ejemplo), y que puede continuar desdiferenciándose hacia el desarrollo de una neoplasia, o rediferenciarse de nuevo hacia un fenotipo acinar. De hecho, hay publicaciones recientes en los que se estudia la posibilidad de revertir terapéuticamente la MAD^{189,190}, o incluso de utilizar esta capacidad multipotencial de la célula acinar en metaplasia para inducir la formación de células beta (utilizando precisamente una Cre-recombinasa Ptf1a, como en nuestro

estudio)⁹⁶. Además, teniendo en consideración otros estudios recientes^{80,191-193}, lo más probable es que el criterio para definir una MAD no sea únicamente histológico, sino que existan diferentes mecanismos de reprogramación acino-ductal, en base a diferentes desregulaciones genéticas que pueden tener una influencia variable en la carcinogénesis, la agresividad, y el pronóstico del ADCP.

El trabajo de Shi *et al.*⁸⁰, recientemente publicado, utiliza también una PDL, en este caso a nivel del cuerpo del páncreas, para estudiar la línea celular origen de lesiones preneoplásicas de ADCP. Los autores concluyen que la PDL colabora en el desarrollo hacia el ADCP sólo en la línea ductal, tras describir, al mes de la realización de la PDL, lesiones positivas para tinción con CK19 (marcador de línea ductal) en el páncreas ligado tipo AFL, y muy pocas lesiones tipo PanIN. Describen también lesiones tipo PanIN en el páncreas no sometido a ligadura. A los 2,5-4 meses de la PDL, describen en 3 de 6 animales áreas de carcinoma in situ e invasión histológica. Repetido el experimento con otro marcador ductal (SOX9), 8-10 meses tras la PDL hallan entre un 20-50% de lóbulos pancreáticos con alguna lesión invasiva. Sin embargo, el gen Sox9 está descrito en la literatura con potencial en la inducción en el desarrollo postnatal de lesiones precursoras de ADCP³², por lo que es discutible hasta qué punto influye el segundo marcador ductal utilizado en los resultados. Por otro lado, de forma similar a nuestro trabajo, describen, en línea acinar del páncreas ligado (marcador Ptf1a), la presencia de una atrofia exocrina distal apoptosis mediada (con tinciones positivas de las muestras para p53 y p21) por la ligadura, sin presencia significativa de lesiones preneoplásicas. Sin embargo, llama la atención que también describan lesiones tipo PanIN y MAD en el páncreas proximal no

sometido a ligadura (como también ocurría en línea ductal) a los 4 meses postoperatorios. Este hallazgo no está acorde con lo descrito en la literatura previa^{14,86,179}, que da soporte a que la inducción de estas lesiones en un contexto de Kras mutado en la etapa adulta exige la presencia de un estímulo proinflamatorio (pancreatitis aguda o crónica), que el páncreas proximal no habría recibido¹.

En línea con los trabajos previos descritos, así como otros anteriores^{59,140}, en nuestro estudio observamos una atrofia del páncreas distal a la PDL quirúrgica, que se caracteriza por una disminución de tamaño y un color ocre, conforme a lo descrito por otros autores^{59,183}. Desde el punto de vista microscópico esta atrofia puede ser catalogada como "extensa", tal y como se define en el apartado 3.10.3. Si se analiza la atrofia categorizada como "leve/moderada", las diferencias no fueron significativas entre PP y DP. De hecho, en los PDL-Kras la atrofia leve era superponible a nivel histológico a la MAD, situación que ya ha sido descrita como propia del modelo a edades tempranas^{15,135}.

En esta tesis, la lesión preneoplásica predominante en las muestras del PD tras la realización de la PDL fue el PanIN 1, tal y como describen la mayoría de estudios que realizan una PDL con este modelo murino, y en menor proporción de PanIN 2 y 3^{15,135,194}. El bajo número de PanIN 2 y 3 observado concuerda con lo publicado por algunos autores^{15,137} que describen la aparición tardía de estas lesiones (al año y medio de vida), asociadas al desarrollo de metástasis. En nuestro estudio, la HGPL predominante observada en el PD de los animales PDL-Kras es la AFL, resultando significativa su reducción tras la PDL.

Si nos centramos en la evolución de las lesiones preneoplásicas de los animales PDL-Kras -principal objetivo del estudio- se observa que, en presencia de atrofia extensa, el número PanIN 1 y de HGPL fue 24 y 22 veces menor respectivamente, en el PD a los 6 meses respecto a su correspondiente control en PP. Este dato es congruente con nuestra hipótesis de que la PDL puede inducir una atrofia exocrina suficiente para evitar la progresión de lesiones PanIN y AFL en la secuencia hacia ADCP. En la misma línea, en el análisis multivariante hubo un aumento estadístico del riesgo de presentar HGPL en el PD de 6,87 y 9,8 veces, respectivamente, entre los animales PDL-Kras, control-Kras y sham-Kras y en todo caso es la primera referencia en la literatura en la que se cuantifica de esta manera el número de lesiones preneoplásicas tras PDL en un modelo prooncogénico como el Kras. Este dato puede sugerir un efecto "protector" de la técnica de la PDL frente al hecho de no manipular al animal, o incluso un aumento del riesgo de aparición de HGPL relacionado con la manipulación quirúrgica sin incluir una PDL. Este aumento del riesgo podría explicarse por el efecto de estrés metabólico sobre las lesiones preneoplásicas de la propia intervención quirúrgica, según lo desarrollado previamente.

En esta tesis se hizo también una valoración semicuantitativa de la presencia de infiltrado inflamatorio en las muestras analizadas (apartado 4.3) para estudiar la relación entre inflamación y oncogénesis, dado que no hay estudios publicados diseñados específicamente para evaluar el impacto en el desarrollo neoplásico que supone el estímulo proinflamatorio de una intervención quirúrgica, aunque sí con modelos químicos^{16,195}. De hecho, tras analizar el riesgo/beneficio, la cirugía se considera el tratamiento de elección no sólo en el ADCP sino en otras situaciones de mayor riesgo como la pancreatitis crónica¹⁹⁶. En este escenario, hemos

observado histológicamente la presencia de un infiltrado inflamatorio secundario a la manipulación quirúrgica en algunos animales intervenidos respecto a los no intervenidos, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, ni se observó tampoco un incremento de ningún tipo de lesión preneoplásica. Como se ha comentado, la cirugía supone un estímulo proinflamatorio, pero dado que el primer análisis histológico se realizó al mes de la cirugía era esperable que la reacción inflamatoria aguda inicial se hubiera resuelto según los mecanismos fisiológicos habituales^{197,198}. Analizar en profundidad el mecanismo fisiopatológico de la inflamación en la evolución postquirúrgica requeriría diseñar un nuevo experimento que estudiara el tipo de célula implicada, lo cual no era objeto de estudio en este trabajo.

En relación a otros hallazgos histológicos, tal y como se describe en el apartado 4.3, en un animal PDL-Kras se observó un adenocarcinoma bien diferenciado en la necropsia programada a los 9 meses de vida, sin invasión locorregional, ni repercusión clínica y sin poderse precisar si era en el PP o el PD de ese animal. Al microscopio, este ADCP se asoció con la presencia de PanIN 2 y 3, pero no se observó infiltrado inflamatorio asociado. Algunos autores han detectado el desarrollo de ADCP y metástasis a partir de las 10 semanas de vida en un 10% de los animales^{15,134,137} en este modelo murino, lo cual coincide con el hallazgo observado.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos asociados a la inhibición del número de lesiones preneoplásicas en el páncreas ligado respecto al no ligado, se realizó el análisis genómico de las muestras PDL-Kras. Los resultados mostraron expresión diferencial entre PP y PD en una gran cantidad de genes relacionados con

función exocrina. Un ejemplo de ello es la mayor expresión, significativa desde el punto de vista estadístico, de los relacionados con la secreción acinar en el PD. Este hallazgo se correlaciona con la pérdida de la función pancreática y los hallazgos histológicos, macro y microscópicos del PD.

En cuanto a la expresión de genes relacionados con la fisiopatología del ADCP, tal y como se detalla en los resultados, cabe destacar las diferencias de expresión significativas entre el PP y el PD para los genes *Nupr1*, *Sycn*, *Klk1*, *Pnliprp1*, *Cel*, *Cpa1*, *Dmbt1*, *Tff2*, *Prss1*, *Prss2*, *Rnase1*, y *Zdhhc16*.

El gen *Nupr1*, sobreexpresado en muestras de PP, se considera actualmente una diana terapéutica contra el ADCP. Es conocido que confiere resistencia a tratamientos antineoplásicos. Ésto es debido a que codifica una proteína que coopera con KrasG12D para inducir la formación de lesiones tipo PanIN, como demostraron Grasso *et al.* en un modelo murino knock out para este gen, en el cual el oncogén Kras G12D no es capaz de desarrollar las lesiones preneoplásicas^{199,200}. Además, se ha descrito por otros autores (Hamidi *et al.*) como fundamental en la aparición del ADCP, en su progresión, y en la resistencia a la quimioterapia^{200,201}.

Los genes *Sycn* y *Klk1* destacan por haber sido descritos como potenciales marcadores de ADCP. La sincolina es una proteína sintetizada por las células acinares del páncreas exocrino, que regula la fusión de los gránulos de zimógeno entre sí y su exocitosis^{202,203}. En el análisis proteómico de líneas celulares y muestras de jugo pancreático realizado por Makawita *et al.* lo describen como un posible biomarcador de ADCP²⁰⁴. Como biomarcador, en un panel conjunto con CA19.9 y la proteína

regeneradora derivada de islotes 1-beta (REG1B), mejora el diagnóstico bioquímico del ADCP, con una sensibilidad del 73% y una especificidad del 95%.

El *Klk1*, pertenece a la familia de las kalikreínas, unas serínproteasas sintetizadas por las células epiteliales involucradas en remodelar la matriz extracelular y la proliferación celular en diversos tumores²⁰⁵. Varios autores han publicado estudios demostrando la implicación de varias de estas proteínas en la carcinogénesis del ADCP y otras neoplasias^{206,207}, algunas de ellas con potencial oncogénico propio como demuestran JP Du et al²⁰⁸. Un estudio genómico de Zhou *et al.* publicado en 2019 constata, en muestras de pacientes con ADCP, que algunos de los genes que hemos observado sobreexpresados de forma diferencial en muestras de PP en relación al DP establecían una “firma diagnóstica” en relación al ADCP. Así la combinación de *Syca*, *Pnliprp1*, *Cap2*, y *Mt1h*, junto con *Cel* y *Cpa1* conforman un modelo matemático predictivo pronóstico²⁰⁹. Además, *Cel* también se ha descrito en un metaanálisis sobre microarrays, publicado en 2018, como un posible gen supresor de tumores diana terapéutica en el tratamiento del ADCP²¹⁰.

Aunque el gen *Dmbt1*, sobreexpresado también en las muestras de PP, se ha considerado como un gen supresor en diversos tumores desde su descripción (como lo es en relación al meduloblastoma cerebral²¹¹), varios autores lo describen sobreexpresado en relación a lesiones premalignas y malignas tanto pancreáticas como gástricas²¹²⁻²¹⁴. Codifica una glucoproteína que interacciona entre el sistema inmune y diversos patógenos; bacterias, virus y células tumorales. Así, Hruban *et al.* en su análisis de muestras de jugo pancreático en casos de cáncer pancreático, demuestra una

prevalencia de expresión de este gen del 68 %²¹³. Cheung *et al.* en un análisis de 38 muestras de IPMN también describen su sobreexpresión en el 82% de los casos²¹⁴.

El gen *Tff2* codifica varios péptidos que participan en la reparación epitelial, tanto en el ADCP como en el adenocarcinoma gástrico²¹⁵. Sin embargo, también se considera que puede tener un papel significativo en relación con el ADCP, facilitando el movimiento de células pancreáticas tumorales, según describieron en 2012 Guppy *et al.* tras el análisis IHQ y los estudios de migración celular in vitro sobre 60 muestras pancreáticas (16 de ADCP, que compararon con otras de pacientes sanos o con pancreatitis crónica)¹⁸¹.

Otros genes sobreexpresados en PP respecto a PD tras la PDL y que resultan de interés son *Prss1*, *Prss2* (codificadores del tripsinógeno) y *Rnase1*. Se han descrito mutaciones de *Prss1* que promueven la carcinogénesis del ADCP a través de la vía JAK1-STAT5, de tal manera que en un modelo murino transgénico representativo se observa un aumento de lesiones PanIN²¹⁶. A través de la vía Trypsin-PAR2 también estaría implicado en promover la proliferación y capacidad invasiva de la célula de ADCP²¹⁷. *Prss2*, a su vez, se ha descrito como un gen carcinogénico²¹⁸ y como un biomarcador de ADCP. De hecho los niveles sanguíneos entre 1,8 y 19,9 µg/L de la proteína que codifica son altamente sugestivos de ADCP²¹⁹. Por último, el gen *Rnase1* ha sido descrito también como un posible biomarcador en ADCP ya desde la década de 1970 en múltiples trabajos^{220,221}. Codifica la ribonucleasa 1 pancreática, una de las proteínas considerada diana en terapias de síntesis de anticuerpos para la detección precoz del ADCP²²².

En relación a las muestras de PD de animales PDL-Kras, nuestros resultados mostraron la sobreexpresión del gen *Zdhhc16* con respecto al PP. Codificador del dominio *zinc finger*, está implicado en el correcto funcionamiento de la apoptosis a través de la palmitoilación de proteínas y la activación secundaria de p53 tras procesos de daño celular, inhibiendo el desarrollo de ADCP^{223,224}. Según describen Cao *et al.*²²³, en animales *knock-out* respecto a este gen se reproducen a nivel celular defectos en la respuesta de reparación del DNA.

Estos resultados sugieren que la atrofia inducida del PD podría inhibir la expresión de algunos genes relacionados con la carcinogénesis del ADCP, genes que parecen sobreexpresados en el PP de los animales sometidos a PDL.

Como se ha descrito en la introducción, a pesar de las potenciales dianas terapéuticas que están en estudio, no se ha conseguido una aplicabilidad de las mismas con la misma efectividad que el tratamiento quirúrgico. Ésto hace evidente la búsqueda de nuevas líneas de estudio terapéuticas. En este trabajo se describe una disminución significativa en el número y grado de lesiones preneoplásicas tras la PDL. El origen de estas lesiones aún es controvertido, pero se acepta que ocurren como una transdiferenciación de células acinares, a través de un acúmulo secuencial de mutaciones prooncogénicas^{225,226}. Además, hemos observado que estos procesos se pueden inhibir a través de una PDL precoz, aún cuando el estímulo prooncogénico de la mutación de *Kras* esté presente (de acuerdo al modelo murino utilizado). En pacientes con historia de ADCP hereditario, el gen que más frecuentemente muta es el *Brca2*²²⁷⁻²²⁹, y su relación con la mutación de *Kras* *esta bien estudiada*^{230,231}. En concreto, Rowley *et*

al. observaron, en 2011, que la inactivación de *Brca2* en un modelo murino *KrasG12D*, inhibía el crecimiento de lesiones premalignas de ADCP a través del mecanismo de la apoptosis²³². Así, se abre una potencial línea de investigación terapéutica para pacientes de este tipo, con un aumento basal del riesgo de ADCP.

Nuestros hallazgos plantean también una posible línea terapéutica en relación con la inducción y la utilización de una atrofia que facilite el manejo clínico de ciertas enfermedades pancreáticas que involucran a lesiones preneoplásicas y su evolución, como se revisa a continuación. Se ha descrito una prevalencia de hasta el 24% de una segunda neoplasia pancreática *in situ* en las muestras de resección tras cirugías radicales del cáncer de páncreas primario²³³. Además, se han publicado múltiples casos de segundas neoplasias pancreáticas y recidivas en el remanente pancreático después de una cirugía radical inicial para el cáncer²³⁴ y se ha discutido la indicación de completar la pancreatectomía total en estos pacientes, sobre todo tras demostrar un aumento significativo de la supervivencia tras esta conducta por Moletta y Hashimoto^{235,236}. Otro aspecto discutido es la decisión de reoperar a un paciente o no cuando se evidencian lesiones PanIN 3 en el análisis histológico del margen de resección del segmento de páncreas resecado por su posible implicación en la recidiva cancerosa. La utilización de un procedimiento de inducción de atrofia exocrina en el páncreas remanente después de una cirugía radical podría ser una alternativa terapéutica en estos problemas clínicos.

La inducción de la atrofia podría conseguirse con una PDL quirúrgica como en nuestro trabajo, o incluso de forma

mínimamente invasiva a través de una ligadura u obstrucción del ducto por vía endoscópica transpapilar, en pacientes con lesiones preneoplásicas conocidas, con el objetivo de detener su evolución hacia el ADCP. De hecho, nuestro grupo de investigación (METABLATE, www.metablate.com) ha diseñado, y publicado su experiencia ex vivo e in vivo, un electrodo de 3Fr asistido por radiofrecuencia (5W) que permite la oclusión transluminal del ducto pancreático, comprobado mediante un test de ausencia de permeabilidad en la necropsia así como por análisis histológico de las muestras²³⁷. Tras estudiar sus efectos in vivo en modelo porcino (n=34), se demostró que el sellado del ducto obtenido de esta nueva manera inducía una atrofia exocrina, al igual que la PDL. Además, cuando se utilizaba tras una pancreatectomía, permitía disminuir la tasa de fístula pancreática de forma muy significativa al inducir una mayor atrofia, en comparación a un sellado del ducto con pegamento¹⁶⁶. Nuestro grupo con esta novedosa línea de investigación terapéutica, iniciada tras los hallazgos de este trabajo, con claro interés traslacional al contexto clínico.

A pesar de los buenos resultados obtenidos, como muchos trabajos experimentales, nuestro estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, la necesidad de establecer grupos experimentales control para cada variable contemplada (trasfondo genético, impacto del estrés quirúrgico..) hace que en ocasiones el tamaño muestral de cada subgrupo experimental sea bajo. Asimismo, el carácter preliminar de este estudio requiere el diseño posterior de otro randomizado que permita corroborar nuestros resultados o a la realización de un estudio similar en otras líneas transgénicas de ratón. Un ejemplo de ello sería la utilización de ratones KO en relación al gen *p53*, para estudiar el efecto de la PDL y comprobar

si los resultados obtenidos en el modelo actual se ven afectados por la inhibición de la apoptosis p53 mediada, y se estimula la progresión a ADCP, estudio que actualmente está realizando nuestro grupo. Finalmente, el papel de la inflamación en los procedimientos quirúrgicos inductores de atrofia debe ser estudiado y caracterizado con marcadores específicos de líneas celulares. Así, se requieren nuevos estudios que corroboren nuestros hallazgos y continúen las nuevas líneas de investigación iniciadas.

Capítulo 6: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La PDL distal es un procedimiento seguro que induce la atrofia exocrina macro y microscópica del PD en el modelo Ptf1a-Cre(+/-ki); K-ras LSLG12Vgeo(+/-ki)
2. La PDL distal es un procedimiento que no produce inflamación masiva en la glándula pancreática, evaluada desde el punto de vista clínico (pancreatitis) o sérico (hiperamilasemia), en el modelo Ptf1a-Cre(+/-ki); K-ras LSLG12Vgeo(+/-ki)
3. Los animales control-Kras y sham-Kras tienen 7 y 9 veces más riesgo de presentar en su PD lesiones PanIN 2, 3 y AFL a los 6 meses de postoperatorio, que los animales sometidos a una PDL.
4. La PDL en ratones Ptf1a-Cre(+/-ki); K-ras LSLG12Vgeo(+/-ki) induce una reducción significativa en el número de lesiones preneoplásicas tipo PanIN 1, 2 y AFL en el páncreas distal ligado, en comparación con su PP.
5. La PDL en ratones Ptf1a-Cre(+/-ki); K-ras LSLG12Vgeo(+/-ki) parece inhibir la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis del ADCP, los cuales se hallan sobreexpresados en el PP de los animales sometidos a PDL, en relación al PD.

Capítulo 7: BIBLIOGRAFÍA

1. (SEOM), S. E. de O. M. Las cifras del cáncer en España 2020. *Depósito Legal: M-3266-2020*
https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf.
2. Global Cancer Observatory. *IARC, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France* <https://gco.iarc.fr/>.
3. Klein, A. P. Pancreatic cancer: a growing burden. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* vol. 4 895–896 (2019).
4. Han, H. & Von Hoff, D. D. SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer Cell* **23**, 424-424.e1 (2013).
5. Ilic, M. & Ilic, I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* **22**, 9694–9705 (2016).
6. Basturk, O. *et al.* A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 1730–41 (2015).
7. Lowenfels, A. B. *et al.* Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **20**, 197–209 (2006).
8. Chanjuan Shi, MD, PhD, Ralph H. Hruban, MD, and Alison P. Klein, P. Familial Pancreatic Cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **133**, 365–374 (2009).
9. Couch, F. J. *et al.* The Prevalence of BRCA2 Mutations in Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomarkers* **16**, 342–346 (2007).
10. Haugk, B. Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer? *Histopathology* **57**, 503–14 (2010).
11. Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K. & Hruban, R. H. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **12**, 81–91 (2005).
12. Haeberle, L. & Esposito, I. Pathology of pancreatic cancer. *Translational Gastroenterology and Hepatology* vol. 4 27;4:50 (2019).
13. Sommers, S. C., Murphy, S. A. & Warren, S. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology* **27**, 629–40 (1954).

14. Brembeck, F. H. *et al.* The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res.* **63**, 2005–2009 (2003).
15. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–50 (2003).
16. Guerra, C. *et al.* Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* **11**, 291–302 (2007).
17. Brockie, E., Anand, A. & Albores-Saavedra, J. Progression of atypical ductal hyperplasia/carcinoma in situ of the pancreas to invasive adenocarcinoma. *Ann. Diagn. Pathol.* **2**, 286–92 (1998).
18. Brat, D. J., Lillemoe, K. D., Yeo, C. J., Warfield, P. B. & Hruban, R. H. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* **22**, 163–9 (1998).
19. Hruban, R. H. *et al.* Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, 579–86 (2001).
20. Iacobuzio-Donahue, C. A. Genetic evolution of pancreatic cancer: Lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. *Gut* vol. 61 1085–1094 (2012).
21. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N. D. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition - WHO - OMS* -. (WHO, 2010).
22. Koorstra, J.-B. M., Hustinx, S. R., Offerhaus, G. J. A. & Maitra, A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* **8**, 110–25 (2008).
23. Hruban, R. H. *et al.* An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 977–87 (2004).
24. Almoguera, C. *et al.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549–554 (1988).
25. Wilentz, R. E., Argani, P. & Hruban, R. H. Loss of heterozygosity or intragenic mutation, which comes first? *Am. J. Pathol.* **158**, 1561–

- 3 (2001).
26. Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B. & Lüttges, J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* **7**, 17–23 (2005).
 27. van Heek, N. T. *et al.* Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* **161**, 1541–7 (2002).
 28. Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R. H. & Maitra, A. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **14**, 224–32 (2007).
 29. Redston, M. S. *et al.* p53 Mutations in Pancreatic Carcinoma and Evidence of Common Involvement of Homocopolymer Tracts in DNA Microdeletions. *Cancer Res.* **54**, 3025–33 (1994).
 30. Maitra, A. *et al.* Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod. Pathol.* **16**, 902–912 (2003).
 31. Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C. M., Hruban, R. H. & Konieczny, S. F. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* **171**, 263–273 (2007).
 32. Kopp, J. L. *et al.* Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 737–50 (2012).
 33. Ray, K. C. *et al.* Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to KrasG12D-initiated tumorigenesis in a mouse model. *PLoS One* **6**, e16786 (2011).
 34. von Figura, G., Morris, J. P., Wright, C. V. E. & Hebrok, M. Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut* **63**, 656–64 (2014).
 35. Pérez-Mancera, P. A., Guerra, C., Barbacid, M. & Tuveson, D. A. What We Have Learned About Pancreatic Cancer From Mouse Models. *Gastroenterology* **142**, 1079–1092 (2012).
 36. Fernández-del Castillo, C. & Warshaw, A. L. Cystic Neoplasms of

- the Pancreas. *Pancreatology* **1**, 641–647 (2001).
37. Del Chiaro, M. *et al.* European experts consensus statement on cystic tumours of the pancreas. *Dig. Liver Dis.* **45**, 703–711 (2013).
 38. Kimura, W., Nagai, H., Kuroda, A., Muto, T. & Esaki, Y. Analysis of small cystic lesions of the pancreas. *Int. J. Pancreatol.* **18**, 197–206 (1995).
 39. Kosmahl, M. *et al.* [Cystic pancreas tumors and their classification: features old and new]. *Pathologe* **26**, 22–30 (2005).
 40. Klöppel, G., Kosmahl, M. & Lüttges, J. [Intraductal neoplasms of the pancreas: cystic and common]. *Pathologe* **26**, 31–6 (2005).
 41. Campbell, F. & Azadeh, B. Cystic neoplasms of the exocrine pancreas. *Histopathology* **52**, 539–551 (2008).
 42. Castellano-Megías, V. M., Andrés, C. I., López-Alonso, G. & Colina-Ruizdelgado, F. Pathological features and diagnosis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *World J. Gastrointest. Oncol.* **6**, 311–24 (2014).
 43. Crippa, S. *et al.* Mucinous cystic neoplasm of the pancreas is not an aggressive entity: lessons from 163 resected patients. *Ann. Surg.* **247**, 571–9 (2008).
 44. Adsay, N. V. Cystic Neoplasia of the Pancreas: Pathology and Biology. *J. Gastrointest. Surg.* **12**, 401–404 (2008).
 45. Society for Surgery of the Alimentary Tract. SSAT patient care guidelines. Cystic neoplasms of the pancreas. *J. Gastrointest. Surg.* **11**, 1225–7 (2007).
 46. Adsay, V. *et al.* Pathologic Evaluation and Reporting of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas and Other Tumoral Intraepithelial Neoplasms of Pancreatobiliary Tract: Recommendations of Verona Consensus Meeting. *Ann. Surg.* **263**, 162–77 (2016).
 47. Le Borgne, J., de Calan, L., Partensky, C. & Association, the F. S. Cystadenomas and cystadenocarcinomas of the pancreas: a multiinstitutional retrospective study of 398 cases. French Surgical Association. *Ann. Surg.* **230**, 152–61 (1999).

48. Farrell, J. J. Prevalence, Diagnosis and Management of Pancreatic Cystic Neoplasms: Current Status and Future Directions. *Gut Liver* **9**, 571–589 (2015).
49. Aichler, M. *et al.* Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J. Pathol.* **226**, 723–34 (2012).
50. Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M. & Klöppel, G. [New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]. *Pathologe* **33 Suppl 2**, 189–93 (2012).
51. Brune, K. *et al.* Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 1067–76 (2006).
52. Schuler, M., Bossy-Wetzel, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P. & Green, D. R. P53 Induces Apoptosis By Caspase Activation Through Mitochondrial Cytochrome C Release. *J. Biol. Chem.* **275**, 7337–7342 (2000).
53. Lane, D. Curing cancer with p53. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2711–2712 (2004).
54. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. & Bertrand, R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **8**, 377–97 (2007).
55. Mendelsohn, J. *et al.* *The molecular basis of cancer. The Molecular Basis of Cancer* (Elsevier Inc., 2008).
56. Coleman, W. B. & Tsongalis, G. J. *Essential concepts in molecular pathology.* (Elsevier/Academic Press, 2010).
57. Bailey, J. M. *et al.* P53 mutations cooperate with oncogenic Kras to promote adenocarcinoma from pancreatic ductal cells. *Oncogene* **35**, 4282–4288 (2016).
58. Ferreira, R. M. M. *et al.* Duct- and Acinar-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Show Distinct Tumor Progression and Marker Expression. *Cell Rep.* **21**, 966–978 (2017).
59. Pound, A. W. & Walker, N. I. Involution of the pancreas after

- ligation of the pancreatic ducts. I: a histological study. *Br. J. Exp. Pathol.* **62**, 547–58 (1981).
60. Quesada, R. *et al.* Long-term evolution of acinar-to-ductal metaplasia and β -cell mass after radiofrequency-assisted transection of the pancreas in a controlled large animal model. *Pancreatology* **16**, 1–6 (2015).
 61. Scoggins, C. R. *et al.* p53-Dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G827–836 (2000).
 62. Gu, G., Dubauskaite, J. & Melton, D. A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447–2457 (2002).
 63. Arda, H. E., Benitez, C. & Kim, S. K. Gene regulatory networks governing pancreas development Pancreas development and cell differentiation. *Dev. Cell* **25**, 5–13 (2013).
 64. Kawaguchi, Y. *et al.* The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* **32**, 128–34 (2002).
 65. Lin, J. W. *et al.* Differential requirement for ptf1a in endocrine and exocrine lineages of developing zebrafish pancreas. *Dev. Biol.* **270**, 474–486 (2004).
 66. Beres, T. M. *et al.* PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 117–30 (2006).
 67. Holmstrom, S. R. *et al.* LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function. *Genes Dev.* **25**, 1674–9 (2011).
 68. Haumaitre, C., Lenoir, O. & Scharfmann, R. Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6373–83 (2008).
 69. Pierreux, C. E. *et al.* The Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-6 Controls the Development of Pancreatic Ducts in the Mouse. *Gastroenterology* **130**, 532–541 (2006).

70. Zhang, H. *et al.* Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation. *Mech. Dev.* **126**, 958–73 (2009).
71. Kopp, J. L. *et al.* Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Development* **138**, 653–65 (2011).
72. Delous, M. *et al.* Sox9b is a key regulator of pancreaticobiliary ductal system development. *PLoS Genet.* **8**, e1002754 (2012).
73. Manfroid, I. *et al.* Zebrafish sox9b is crucial for hepatopancreatic duct development and pancreatic endocrine cell regeneration. *Dev. Biol.* **366**, 268–278 (2012).
74. Cohen, D. E. & Melton, D. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 243–252 (2011).
75. Cherry, A. B. C. & Daley, G. Q. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* **148**, 1110–1122 (2012).
76. Puri, S., Folias, A. E. & Hebrok, M. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: Development, homeostasis, and disease. *Cell Stem Cell* vol. 16 18–31 (2015).
77. Dizenzo, D. *et al.* Induced Mist1 expression promotes remodeling of mouse pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **143**, 469–80 (2012).
78. Pin, C. L., Rukstalis, J. M., Johnson, C. & Konieczny, S. F. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J. Cell Biol.* **155**, 519–30 (2001).
79. Cheng, T. *et al.* Ductal obstruction promotes formation of preneoplastic lesions from the pancreatic ductal compartment. *Int. J. Cancer* **144**, 2529–2538 (2019).
80. Shi, C. *et al.* Differential Cell Susceptibilities to KrasG12D in the Setting of Obstructive Chronic Pancreatitis. *CMGH* **8**, 579–594 (2019).
81. Pour, P. M. Histogenesis of exocrine pancreatic cancer in the hamster model. *Environ. Health Perspect.* **56**, 229–43 (1984).

82. Cleveland, M. H., Sawyer, J. M., Afelik, S., Jensen, J. & Leach, S. D. Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 711–9 (2012).
83. Seymour, P. A. *et al.* SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1865–1870 (2007).
84. Kopinke, D. *et al.* Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1+ cells to the developing and adult pancreas. *Development* **138**, 431–41 (2011).
85. Stanger, B. Z. *et al.* Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* **8**, 185–195 (2005).
86. Sabiston D. C., & Townsend, C. M. Sabiston textbook of surgery: The biological basis of modern surgical practice. in 40–66 (Elsevier Saunders, 2012).
87. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–45 (2001).
88. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–99 (2010).
89. De La O, J.-P. & Murtaugh, L. C. Notch and Kras in pancreatic cancer: at the crossroads of mutation, differentiation and signaling. *Cell Cycle* **8**, 1860–4 (2009).
90. Morris, J. P., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C. & Hebrok, M. β -catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 508–520 (2010).
91. Guerra, C. *et al.* Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **19**, 728–39 (2011).
92. Logsdon, C. D. & Ji, B. Ras activity in acinar cells links chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, S40–3 (2009).
93. Habbe, N. *et al.* Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of

- oncogenic Kras in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 18913–18918 (2008).
94. Folias, A. E., Penaranda, C., Su, A. L., Bluestone, J. A. & Hebrok, M. Aberrant Innate Immune Activation following Tissue Injury Impairs Pancreatic Regeneration. *PLoS One* **9**, e102125 (2014).
 95. Jensen, J. N. *et al.* Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* **128**, 728–41 (2005).
 96. Pan, F. C. *et al.* Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development* **140**, 751–64 (2013).
 97. Sancho, R., Gruber, R., Gu, G. & Behrens, A. Loss of Fbw7 reprograms adult pancreatic ductal cells into α , δ , and β cells. *Cell Stem Cell* **15**, 139–153 (2014).
 98. Moreno Planas J.M., Sánchez Ortega A., García Bueno J.M., R. C. C. *Avances en cáncer de páncreas, del laboratorio a la clínica (AECC)*. (UCLM, 2010).
 99. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)* **378**, 607–20 (2011).
 100. Bilici, A. Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10802–10812 (2014).
 101. Chun, Y. S., Pawlik, T. M. & Vauthey, J.-N. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 845–847 (2018).
 102. Alexakis, N. *et al.* Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* **91**, 1410–1427 (2004).
 103. W., K. Das Carcinom der Papilla duodeni und seine radikale Entfernung. *Beitr Klin Chir.* 439–86 (1912).
 104. Whipple, A. O. *et al.* TREATMENT OF CARCINOMA OF THE AMPULLA OF VATER ALLEN. *Ann. Surg.* **102**, 763–79 (1935).
 105. Watson, K. Carcinoma of ampulla of vater successful radical resection. *Br. J. Surg.* **31**, 368–373 (1944).

106. Van Berge Henegouwen, M. I. *et al.* Postoperative weight gain after standard Whipple's procedure versus pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: The influence of tumour status. *Br. J. Surg.* **85**, 922–926 (1998).
107. Strasberg, S. M., Drebin, J. A., Linehan, D. & Louis, S. Radical antegrade modular pancreateosplenectomy. 521–527 (2003).
108. Tanaka, M. Gastroparesis after a pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Surgery Today* vol. 35 345–350 (2005).
109. Bassi, C. *et al.* Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. *Surgery* **138**, 8–13 (2005).
110. Mathur, A. *et al.* Fatty pancreas: a factor in postoperative pancreatic fistula. *Ann. Surg.* **246**, 1058–64 (2007).
111. Gillen, S., Schuster, T., Büschenfelde, C. M. Zum, Friess, H. & Kleeff, J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Medicine* vol. 7 e1000267 (2010).
112. Eileen M, O. Refinement of adjuvant therapy for pancreatic cancer. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 304 1124–1125 (2010).
113. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465 (2012).
114. Royal, R. E. *et al.* Phase 2 Trial of Single Agent Ipilimumab (Anti-CTLA-4) for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Immunother.* **33**, 828–833 (2010).
115. Le, D. T. *et al.* Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* **357**, 409–413 (2017).
116. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).
117. Wolchok, J. D. *et al.* Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7412–7420 (2009).
118. Le, D. T. *et al.* PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).

119. Goldsmith, H. S., Ghosh, B. C. & Huvos, A. G. Ligation versus implantation of the pancreatic duct after pancreaticoduodenectomy. *Surg. Gynecol. Obstet.* **132**, 87–92 (1971).
120. Madding, G. F. & Kennedy, P. A. Chronic alcoholic pancreatitis. Treatment by ductal obstruction. *Am. J. Surg.* **125**, 538–41 (1973).
121. Hoffmann, E., Usmiani, J. & Gebhardt, C. Die Ausschaltung der exokrinen Funktion des Pankreas als Behandlungskonzept der chronischen Pankreatitis. *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **102**, 392–395 (1977).
122. Cannon, J. A. Experience with ligation of the pancreatic ducts in the treatment of chronic relapsing pancreatitis. *Am. J. Surg.* **90**, 266–280 (1955).
123. Bartoli, F. G., Arnone, G. B., Ravera, G. & Bachi, V. Pancreatic fistula and relative mortality in malignant disease after pancreaticoduodenectomy. Review and statistical meta-analysis regarding 15 years of literature. *Anticancer Res.* **11**, 1831–48 (1991).
124. Grobmyer, S. R. *et al.* Pancreatic anastomotic failure after pancreaticoduodenectomy. *Am. J. Surg.* **180**, 117–20 (2000).
125. Dencker, H. The management of the pancreatic duct at pancreatectomy. *Acta Chir. Scand.* **138**, 620–3 (1972).
126. Gebhardt, C., Stolte, M., Schwille, P. O., Zirngibl, H. & Engelhardt, W. Experimental studies on pancreatic duct occlusion with prolamine. *Horm. Metab. Res. Suppl.* 9–11 (1983).
127. Gall, F. P., Gebhardt, C., Meister, R., Zirngibl, H. & Schneider, M. U. Severe chronic cephalic pancreatitis: use of partial duodenopancreatectomy with occlusion of the pancreatic duct in 289 patients. *World J. Surg.* **13**, 809–16; discussion 816–7 (1989).
128. Suc, B. *et al.* Temporary fibrin glue occlusion of the main pancreatic duct in the prevention of intra-abdominal complications after pancreatic resection: prospective randomized trial. *Ann. Surg.* **237**, 57–65 (2003).
129. Tran, K. *et al.* Occlusion of the pancreatic duct versus pancreaticojejunostomy: A prospective randomized trial. *Ann.*

- Surg.* **236**, 422–428 (2002).
130. Little, J. M., Lauer, C. & Hogg, J. Pancreatic duct obstruction with an acrylate glue: a new method for producing pancreatic exocrine atrophy. *Surgery* **81**, 243–9 (1977).
 131. Ohwada, S. *et al.* Fibrin glue sandwich prevents pancreatic fistula following distal pancreatectomy. *World J. Surg.* **22**, 494–8 (1998).
 132. Aguirre, A. J. *et al.* Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **17**, 3112–26 (2003).
 133. Hingorani, S. R. *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–83 (2005).
 134. Guerra, C. & Barbacid, M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol. Oncol.* **7**, 232–247 (2013).
 135. Ijichi, H. Genetically-engineered mouse models for pancreatic cancer: Advances and current limitations. *World J. Clin. Oncol.* **2**, 195 (2017).
 136. Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M. & Klöppel, G. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J. Gastroenterol.* **20**, 13833–41 (2014).
 137. Herreros-Villanueva, M., Hijona, E., Cosme, A. & Bujanda, L. Mouse models of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **18**, 1286–94 (2012).
 138. Walker, N. I. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am. J. Pathol.* **126**, 439–51 (1987).
 139. Walker, N. I., Winterford, C. M. & Kerr, J. F. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. II. Duct and stromal cell proliferation, differentiation, and deletion. *Pancreas* **7**, 420–34 (1992).
 140. Watanabe, S., Abe, K., Anbo, Y. & Katoh, H. Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation: a qualitative and quantitative histological study. *Arch. Histol. Cytol.* **58**, 365–74

- (1995).
141. Scoggins, C. R. *et al.* p53-Dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **270**, 827–836 (2000).
 142. Ekberg, H. *et al.* Long-term duct-occluded segmental pancreatic autografts. Does fibrosis lead to graft loss? *Transplantation* **46**, 21–5 (1988).
 143. Gooszen, H. G., Bosman, F. T. & van Schilfgaarde, R. The effect of duct obliteration on the histology and endocrine function of the canine pancreas. *Transplantation* **38**, 13–7 (1984).
 144. Williamson, P. *et al.* Long-term canine duct-occluded segmental pancreatic autografts: endocrine function. *Pancreas* **3**, 646–52 (1988).
 145. Meister, R., Berger, I., Schwille, P. O. & Gebhardt, C. Maximal stimulation of pancreatic islet B-cells, and A-cell response to arginine, in dogs with longterm pancreatic acinar atrophy. *Eur. J. Surg.* **157**, 333–40 (1991).
 146. Ambromovage, A. M., Parent, F. W. & Howard, J. M. Pancreatic exocrine insufficiency. V. The effects of long-term pancreatic duct ligation on serum insulin levels and glucose metabolism in the dog. *Ann. Surg.* **177**, 338–43 (1973).
 147. Isaksson, G., Lundquist, I. & Ihse, I. Effects on the exocrine and endocrine pancreas of duct occlusion with two different tissue glues in the rat. *Eur. Surg. Res.* **15**, 136–144 (1983).
 148. Quesada, R. *et al.* Radiofrequency pancreatic ablation and section of the main pancreatic duct does not lead to necrotizing pancreatitis. *Pancreas* **43**, 931–7 (2014).
 149. Dorcaratto, D. *et al.* Radiofrequency is a secure and effective method for pancreatic transection in laparoscopic distal pancreatectomy: results of a randomized, controlled trial in an experimental model. *Surg. Endosc.* **27**, 3710–9 (2013).
 150. Fish, J. C., Smith, L. B. & Williams, R. D. Digestive function after radical pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* **117**, 40–5 (1969).
 151. Christiansen, J., Olsen, J. H. & Worning, H. The pancreatic function following subtotal pancreatectomy for cancer. *Scand. J.*

- Gastroenterol. Suppl.* **9**, 189–93 (1971).
152. Sato, N. *et al.* Long-term morphological changes of remnant pancreas and biliary tree after pancreatoduodenectomy on CT. *Int. Surg.* **83**, 136–40 (1998).
 153. Lemaire, E. O'Toole, D. Sauvanet, A. *et al.* Functional and morphological changes in the pancreatic remnant following pancreaticoduodenectomy with pancreaticogastric anastomosis. *Br. J. Surg.* **87**, 434–8 (2000).
 154. Jang, J.-Y., Kim, S.-W., Park, S.-J. & Park, Y.-H. Comparison of the functional outcome after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: pancreatogastrostomy and pancreatojejunostomy. *World J. Surg.* **26**, 366–71 (2002).
 155. Jang, J.-Y. *et al.* Randomized Prospective Trial of the Effect of Induced Hypergastrinemia on the Prevention of Pancreatic Atrophy After Pancreatoduodenectomy in Humans. *Ann. Surg.* **237**, 522–529 (2003).
 156. Quesada, R. *et al.* Morphological changes of the pancreas after pancreaticoduodenectomy. *Sci. Rep.* **9**, 14517 (2019).
 157. Di Carlo, V. *et al.* Pancreatoduodenectomy with occlusion of the residual stump by Neoprene® injection. *World J. Surg.* **13**, 105–110 (1989).
 158. AF, B. *et al.* Pancreas-preserving management in reinterventions for severe pancreatic fistula after pancreatoduodenectomy: a systematic review. *Langenbeck's Arch. Surg.* **401**, 141–9 (2016).
 159. Zhou, Y. M., Zhou, X., Wan, T., Xu, D. & Si, X. Y. An evidence-based approach to the surgical interventions for severe pancreatic fistula after pancreatoduodenectomy. *Surgeon* vol. 16 119–124 (2018).
 160. Fromm, D. & Schwarz, K. Ligation of the pancreatic duct during difficult operative circumstances. *J. Am. Coll. Surg.* **197**, 943–8 (2003).
 161. Mauriello, C. *et al.* Pancreatic stump closure after pancreatoduodenectomy in elderly patients: a retrospective clinical study. *Aging Clin. Exp. Res.* **29**, 35–40 (2017).
 162. Theodosopoulos, T. *et al.* Pancreatic Remnant Occlusion after

- Whipple's Procedure: An Alternative Oncologically Safe Method. *ISRN Surg.* **2013**, 1–3 (2013).
163. Alfieri, S. *et al.* Indications and results of pancreatic stump duct occlusion after duodenopancreatectomy. *Updates Surg.* **68**, 287–293 (2016).
164. Mazzaferro, V. *et al.* Permanent Pancreatic Duct Occlusion With Neoprene-based Glue Injection After Pancreatoduodenectomy at High Risk of Pancreatic Fistula: A Prospective Clinical Study. *Ann. Surg.* **270**, 791–798 (2019).
165. Callery, M. P., Pratt, W. B., Kent, T. S., Chaikof, E. L. & Vollmer, C. M. A prospectively validated clinical risk score accurately predicts pancreatic fistula after pancreatoduodenectomy. *J. Am. Coll. Surg.* **216**, 1–14 (2013).
166. Andaluz, A. *et al.* Endoluminal radiofrequency ablation of the main pancreatic duct is a secure and effective method to produce pancreatic atrophy and to achieve stump closure. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
167. Burdío, F. *et al.* Radiofrequency-induced heating versus mechanical stapler for pancreatic stump closure: in vivo comparative study. *Int. J. Hyperth.* **32**, 272–280 (2016).
168. Iclas, C. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. <http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-research-in> (2012).
169. Gámez-Pozo, A. *et al.* Combined Label-Free Quantitative Proteomics and microRNA Expression Analysis of Breast Cancer Unravel Molecular Differences with Clinical Implications. *Cancer Res.* **75**, 2243–2253 (2015).
170. Kauffmann, A., Gentleman, R. & Huber, W. arrayQualityMetrics—a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinforma. Appl. NOTE* **25**, 415–416 (2009).
171. Carvalho, B. S. & Irizarry, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. **26**, 2363–2367 (2010).
172. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. in *Selected Works of Terry Speed* vol. 4 601–616 (2012).

173. MacDonald, J. W. *Affycoretools: Functions useful for those doing repetitive analyses with Affymetrix GeneChips. R package version 1.56.0.* (2010).
174. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
175. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
176. Simmons, Meisenger, G. H. *Principles of Medical Biochemistry.* 342-349. Elsevier (2017).
177. Forsmark, C. E., Vege, S. S. & Wilcox, C. M. Acute Pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 596–599 (2017).
178. Hruban, R. H. *et al.* Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res.* **66**, 95–106 (2006).
179. Smith, J. P. *et al.* Cholecystokinin receptor antagonist halts progression of pancreatic cancer precursor lesions and fibrosis in Mice. *Pancreas* **43**, 1050–1059 (2014).
180. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501 (2015).
181. Guppy, N. J. *et al.* Trefoil Factor Family Peptides in Normal and Diseased Human Pancreas. *Pancreas* **41**, 888–896 (2012).
182. Yasuda, H. *et al.* Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 637–44 (1999).
183. De Groef, S. *et al.* Surgical Injury to the Mouse Pancreas through Ligation of the Pancreatic Duct as a Model for Endocrine and Exocrine Reprogramming and Proliferation. *J. Vis. Exp.* e52765 (2015).
184. Desborough, J. P. The stress response to trauma and surgery. *Br. J. Anaesth.* **85**, 109–117 (2000).
185. Yuan, Z. *et al.* Systemic inflammation with multiorgan dysfunction is the cause of death in murine ligation-induced acute pancreatitis.

- J. Gastrointest. Surg.* **15**, 1670–8 (2011).
186. Martin, L. J. & Lal Subodh, Zieve David, O. I. Amilasa en sangre: MedlinePlus enciclopedia médica. *13-02-2017* **2**, 2 (2017).
187. Meyerholz, D. K., Williard, D. E., Grittmann, A.-M. & Samuel, I. Murine pancreatic duct ligation induces stress kinase activation, acute pancreatitis, and acute lung injury. *Am. J. Surg.* **196**, 675–82 (2008).
188. Rhim, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **148**, 349–361 (2012).
189. Wong, C. H., Li, Y. J. & Chen, Y. C. Therapeutic potential of targeting acinar cell reprogramming in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* vol. 22, 7046-57 (2016).
190. Krah, N. M. *et al.* Prevention and Reversion of Pancreatic Tumorigenesis through a Differentiation-Based Mechanism. *Dev. Cell* **50**, 744–754 (2019).
191. Niu, N. *et al.* Loss of Setd2 promotes Kras-induced acinar-to-ductal metaplasia and epithelia-mesenchymal transition during pancreatic carcinogenesis. *Gut* **69**, 715–726 (2020).
192. Kibe, S. *et al.* Cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia within the invasive front of pancreatic cancer contributes to local invasion. *Cancer Lett.* **444**, 70–81 (2019).
193. Liou, G. Y. *et al.* Mutant KRas-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Acinar Cells Upregulates EGFR Signaling to Drive Formation of Pancreatic Precancerous Lesions. *Cell Rep.* **14**, 2325–36 (2016).
194. Collins, M. A. M. A. *et al.* Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 639–653 (2012).
195. Smith, J. P., Fonkoua, L. K. & Moody, T. W. The role of gastrin and CCK receptors in pancreatic cancer and other malignancies. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 283–291 (2016).
196. Ueda, J., Tanaka, M., Ohtsuka, T., Tokunaga, S. & Shimosegawa, T. Surgery for chronic pancreatitis decreases the risk for pancreatic cancer: A multicenter retrospective analysis. *Surg. (United States)* **153**, 357–364 (2013).

197. Lennard, T. W. *et al.* The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br. J. Surg.* **72**, 771–6 (1985).
198. Allendorf, J. D. *et al.* Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg. Endosc.* **11**, 427–30 (1997).
199. Grasso, D. *et al.* Pivotal Role of the Chromatin Protein Nupr1 in Kras-Induced Senescence and Transformation. *Sci. Rep.* **5**, 17549 (2015).
200. Grasso, D. *et al.* Genetic inactivation of the pancreatitis-inducible gene Nupr1 impairs PanIN formation by modulating KrasG12D-induced senescence. *Cell Death Differ.* **21**, 1633–1641 (2014).
201. Hamidi, T. *et al.* Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis. *J. Clin. Invest.* **122**, 2092–2103 (2012).
202. Antonin, W., Wagner, M., Riedel, D., Brose, N. & Jahn, R. Loss of the Zymogen Granule Protein Syncollin Affects Pancreatic Protein Synthesis and Transport but Not Secretion. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1545–1554 (2002).
203. Wäsle, B. *et al.* Syncollin is required for efficient zymogen granule exocytosis. *Biochem. J.* **385**, 721–727 (2005).
204. Makawita, S. *et al.* Validation of four candidate pancreatic cancer serological biomarkers that improve the performance of CA19.9. *BMC Cancer* **13**, 1 (2013).
205. Yousef GM1, Obiezu CV, Luo LY, Magklara A, Borgoño CA, Kishi T, Memari N, Michael IP, Sidiropoulos M, Kurlender L, Economopolou K, Kapadia C, Komatsu N, Petraki C, Elliott M, Scorilas A, Katsaros D, Levesque MA, D. E. Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv Clin Chem.* **39**, 11–79 (2005).
206. Avgeris, M., Mavridis, K. & Scorilas, A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol. Chem.* **391**, 505–11 (2010).
207. Linardoutsos, D., Gazouli, M., Machairas, A., Bramis, I. & Zografos, G. C. Kallikrein-related peptidases in cancers of gastrointestinal tract: an inside view of their role and clinical

- significance. *J. BUON.* **19**, 53–9 (2014).
208. Du, J. P. *et al.* Kallikrein-related peptidase 7 is a potential target for the treatment of pancreatic cancer. *Oncotarget* **9**, 12894–12906 (2018).
209. Zhou, Y. Y. *et al.* Integrated transcriptomic analysis reveals hub genes involved in diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Mol. Med.* **25**, 47 (2019).
210. Goonesekere, N. C. W., Andersen, W., Smith, A. & Wang, X. Identification of genes highly downregulated in pancreatic cancer through a meta-analysis of microarray datasets: implications for discovery of novel tumor-suppressor genes and therapeutic targets. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **144**, 309–320 (2018).
211. Mollenhauer, J. *et al.* DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3–26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat. Genet.* **17**, 32–39 (1997).
212. Garay, J. *et al.* Increased expression of deleted in malignant brain tumors (DMBT1) gene in precancerous gastric lesions: Findings from human and animal studies. *Oncotarget* **8**, 47076–47089 (2017).
213. Hustinx SR1, Cao D, Maitra A, Sato N, Martin ST, Sudhir D, Iacobuzio-Donahue C, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Mollenhauer J, Pandey A, H. R. Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther.* **12**, 1254–61 (2004).
214. Cheung, W. *et al.* Application of a global proteomic approach to archival precursor lesions: Deleted in malignant brain tumors 1 and tissue transglutaminase 2 are upregulated in pancreatic cancer precursors. *Pancreatology* **8**, 608–616 (2008).
215. Yamaguchi, J. *et al.* Loss of Trefoil Factor 2 From Pancreatic Duct Glands Promotes Formation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms in Mice. *Gastroenterology* **151**, 1232–1244.e10 (2016).
216. Liu, Q. *et al.* PRSS1 mutation: A possible pathomechanism of pancreatic carcinogenesis and pancreatic cancer. *Mol. Med.* **25**, 44 (2019).
217. Søreide, K., Roalsø, M. & Aunan, J. R. Is There a Trojan Horse to

- Aggressive Pancreatic Cancer Biology? A Review of the Trypsin-PAR2 Axis to Proliferation, Early Invasion, and Metastasis. *J. Pancreat. Cancer* **6**, 12–20 (2020).
218. Vilen, S. T. *et al.* Trypsin-2 enhances carcinoma invasion by processing tight junctions and activating promt1-mmp. *Cancer Invest.* **30**, 583–592 (2012).
219. Cao, J. *et al.* Correlations between serum trypsinogen-2 and pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology.* **62**, 435–440 (2015).
220. Reddi, K. K. & Holland, J. F. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2308–2310 (1976).
221. Doran, G., Allen-Mersh, T. G. & Reynolds, K. W. Ribonuclease as a tumour marker for pancreatic carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **33**, 1212–1213 (1980).
222. Nakata, D. Increased N-glycosylation of Asn88 in serum pancreatic ribonuclease 1 is a novel diagnostic marker for pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **4**, 6715 (2014).
223. Cao, N. *et al.* A potential role for protein palmitoylation and zDHHC16 in DNA damage response. *BMC Mol. Biol.* **17**, 12 (2016).
224. Li, B., Cong, F., Tan, C. P., Wang, S. X. & Goff, S. P. Aph2, a protein with a zf-DHHC motif, interacts with c-Abl and has pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 28870–28876 (2002).
225. Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J. & Kern, S. E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2969–2972 (2000).
226. Hruban, R. H., Wilentz, R. E. & Kern, S. E. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Pathol.* **156**, 1821–5 (2000).
227. Petersen, G. M. Familial Pancreatic Cancer. *Semin Oncol.* **43**, 548–553 (2016).
228. Zhen, D. B. *et al.* BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study. *Genet. Med.* **17**, 569–77 (2015).
229. Hruban, R. H., Klein, A. P., Eshleman, J. R., Axilbund, J. E. & Goggins, M. Familial pancreatic cancer: from genes to improved

- patient care. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **1**, 81–8 (2007).
230. Skoulidis, F. *et al.* Germline Brca2 Heterozygosity Promotes KrasG12D -Driven carcinogenesis in a murine model of familial pancreatic cancer. *Cancer Cell* **18**, 499–509 (2010).
231. Feldmann, G. *et al.* Inactivation of Brca2 cooperates with Trp53(R172H) to induce invasive pancreatic ductal adenocarcinomas in mice: a mouse model of familial pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 959–68 (2011).
232. Rowley, M. *et al.* Inactivation of Brca2 promotes Trp53-associated but inhibits KrasG12D-dependent pancreatic cancer development in mice. *Gastroenterology* **140**, 1303-1313.e1–3 (2011).
233. Cubilla, A. L. & Fitzgerald, P. J. Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer. *Cancer Res* **36**, 2690–2698 (1976).
234. Shima, Y. *et al.* Completion pancreatectomy for recurrent pancreatic cancer in the remnant pancreas: report of six cases and a review of the literature. *Langenbeck's Arch. Surg.* **400**, 973–8 (2015).
235. Moletta, L. *et al.* Surgery for Recurrent Pancreatic Cancer: Is It Effective? *Cancers (Basel)*. **11**, 991 (2019).
236. Hashimoto, N., Yasuda, T., Haji, S., Nomura, H. & Ohyanagi, H. Comparison of the functional and morphological changes in the pancreatic remnant between pylorus-preserving pancreatoduodenectomy and pancreatoduodenectomy. *Hepatogastroenterology*. **50**, 2229–32 (2003).
237. Ewertowska, E. *et al.* Development of a catheter-based technique for endoluminal radiofrequency sealing of pancreatic duct. *Int. J. Hyperth.* **36**, 677–686 (2019).

Capítulo 8: ANEXOS



OPEN

Pancreatic duct ligation reduces premalignant pancreatic lesions in a Kras model of pancreatic adenocarcinoma in mice

Marta Cáceres¹, Rita Quesada¹, Mar Iglesias¹, Francisco X. Real², Maria Villamonte¹, Jaime Martínez de Villarreal², Mónica Pérez², Ana Andaluz³, Xavier Moll³, Enrique Berjano⁴, Dimitri Dorcaratto⁵, Patricia Sánchez Velazquez¹, Luís Grande¹ & Fernando Burdío¹✉

Pancreatic duct ligation (PDL) in the murine model has been described as an exocrine pancreatic atrophy-inducing procedure. However, its influence has scarcely been described on premalignant lesions. This study describes the histological changes of premalignant lesions and the gene expression in a well-defined model of pancreatic ductal adenocarcinoma by PDL. Selective ligation of the splenic lobe of the pancreas was performed in Ptf1a-Cre^(+/ki); K-ras LSLG12Vgeo^(+/ki) mice (PDL-Kras mice). Three experimental groups were evaluated: PDL group, controls and shams. The presence and number of premalignant lesions (PanIN 1–3 and Atypical Flat Lesions—AFL) in proximal (PP) and distal (DP) pancreas were studied for each group over time. Microarray analysis was performed to find differentially expressed genes (DEG) between PP and PD. Clinical human specimens after pancreaticoduodenectomy with ductal occlusion were also evaluated. PDL-Kras mice showed an intense pattern of atrophy in DP which was shrunk to a minimal portion of tissue. Mice in control and sham groups had a 7 and 10-time increase respectively of risk of high-grade PanIN 2 and 3 and AFL in their DP than PDL-Kras mice. Furthermore, PDL-Kras mice had significantly less PanIN 1 and 2 and AFL lesions in DP compared to PP. We identified 38 DEGs comparing PP and PD. Among them, several mapped to protein secretion and digestion while others such as Nupr1 have been previously associated with PanIN and PDAC. PDL in Ptf1a-Cre^(+/ki); K-ras LSLG12Vgeo^(+/ki) mice induces a decrease in the presence of premalignant lesions in the ligated DP. This could be a potential line of research of interest in some cancerous risk patients.

In spite of advanced basic and applied research, the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has not improved for the last 20 years, being the overall 5-year survival of less than 5%¹. Only less than 20% patients are diagnosed early enough to benefit from a definitive surgical treatment^{2,3} and PDAC is projected to surpass breast, prostate, and colorectal cancers as the leading cause of cancer-related death in the US by the year 2030². For those reasons, the development of the first genetically defined model of PDAC that recapitulates the morphological spectrum of the human disease was welcomed with enthusiasm. In that regard, the conditional knock-in Kras^{G12D/+} mouse model, first described by Hingorani et al.⁴ has been used in basic research to study the importance of Kras mutations in PDAC initiation. Upon activation of mutant Kras during pancreatic development, mice develop premalignant lesions starting at week 10 and this model has become the most widely used to study the evolution to PDAC⁵. Additionally, atypical flat lesions (AFL) have been described in this genetically engineered mouse model (GEMM) of adenocarcinoma and in humans as preneoplastic lesions^{6–8}.

Kras mutations are one of the earliest genetic abnormalities in the progression model to PDAC^{5,9}. Ninety percent of human PDAC contain activating mutations in the GTPase signaling protein—Kras oncogene, leading to PanIN-sequence initiation^{10,11}. The p53 tumor suppressor gene is the central integrator of the cellular response to DNA damage and apoptosis^{12,13}. Loss of p53 function causes deregulation in cell death and cell division^{14,15}.

¹Department of Surgery, Hospital del Mar, Barcelona, Spain. ²Epithelial Carcinogenesis Group, Molecular Oncology Programme, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain. ³Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴BioMIT, Department of Electronic Engineering, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain. ⁵Hospital Clínico de Valencia, Valencia, Spain. ✉email: fburdio@hotmail.com

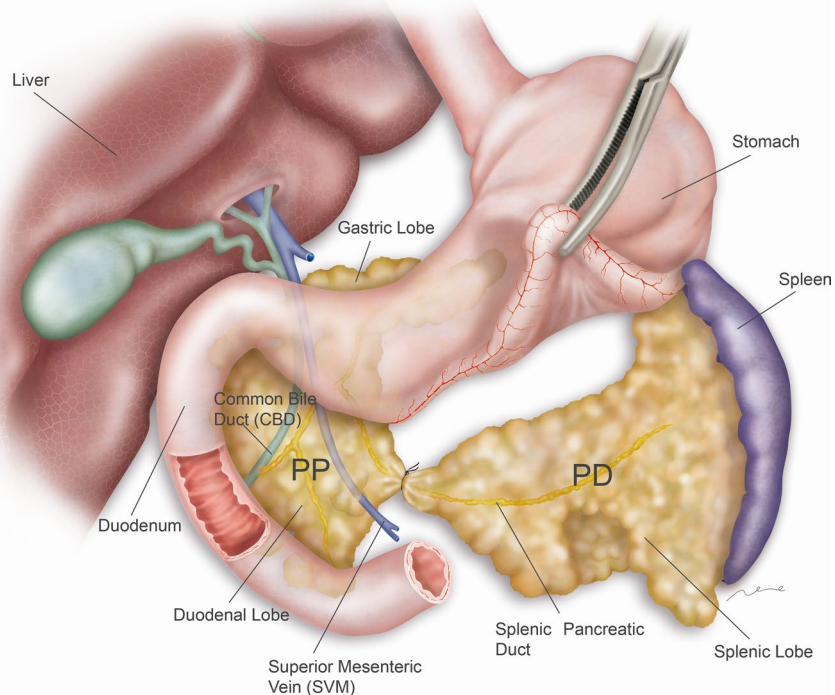


Figure 1. Surgical ligation of splenic pancreatic lobe in $Ptf1a-Cre^{(+/ki)}$; $K-ras\ LSLG12Vgeo^{(+/ki)}$ mice. Pancreatic ligation was performed including the main splenic pancreatic duct adjacent to the superior mesenteric vein. Two pancreatic segments, proximal pancreas (PP) and distal pancreas (DP) were thus delimited and separately analyzed.

Interestingly, p53 mutation, assessed by nuclear overexpression of p53 protein, is a late event in the progression model of pancreatic adenocarcinoma^{5,15} (Figure S1).

On the other hand, ultrastructural and immunohistochemical studies in normal and transgenic mice have demonstrated that after experimental pancreatic duct ligation (PDL), most of the acinar cells are rapidly and massively deleted by apoptosis-mediated exocrine atrophy. This process is also regulated by p53 active protein^{13,16–19}. In this regard, our group has demonstrated a complete acinar cell deletion both in short and long-term evolution with no sign of acinar regeneration after an efficient model of PDL in murine and also in pig normal pancreas^{20,21}.

Taken these pieces of evidences in mind, our hypothesis is that selective PDL in $Ptf1a-Cre^{(+/ki)}$; $K-ras\ LSLG12Vgeo^{(+/ki)}$ mice at an early stage (in the absence of p53 inactivation) can induce apoptotic-mediated exocrine atrophy, and may avoid progression to PDAC, overcoming pro-oncogenic stimulation. To study this, we examined the histological changes and the gene expression that take place in the distal and proximal pancreas after PDL.

Materials and methods

Study design. Twelve-week old $Ptf1a-Cre^{(+/ki)}$; $K-ras\ LSLG12Vgeo^{(+/ki)}$ mice referred as *Kras* mice and two control groups $K-RasLSLG12Vgeo^{(+/ki)}$ mice and $Ptf1a-Cre^{(+/ki)}$ mice referred to as *G* and *Cre* mice respectively^{22,23} were used in this study. All animals were bred and raised until 8–10 weeks at the Spanish National Cancer Research Center (CNIO, Madrid), then imported to Barcelona's Biomedical Research Park (PRBB) facilities. The research protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of PRBB (Ref.: FBP-12-1422) and the study was conducted according to the approved guidelines of the Government of Catalonia's Animal Care Committee (Ref.: DAAM 6529). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Kras mice were divided in three experimental groups: non operated animals referred to as “control group” ($n = 13$), animals that were operated and surgically manipulated but did not undergo pancreatic ligation referred to as “sham group” ($n = 8$) and animals subjected to a pancreatic duct ligation referred to as “PDL group” ($n = 26$). Mice were sacrificed and analyzed 1, 3 and 6 months postoperatively (PO). Additionally, *G* ($n = 12$) and *Cre* mice ($n = 11$) were also subjected to PDL and were sacrificed at the same PO periods.

Surgical technique. At 12 weeks of age, the peritoneal cavity was accessed through a midline laparotomy, under anesthetic induction with isoflurane at 4% and at 2.5% maintenance in 100% oxygen. The stomach, pancreas and spleen were mobilized as described previously^{19,24} in all the animals subjected to surgery (sham and PDL groups). In PDL group mice, dissection and ligation of the splenic lobe of the pancreas were performed on the right side of the superior mesenteric vein, using 8/0 polyglycolic acid suture (Fig. 1). Special caution with

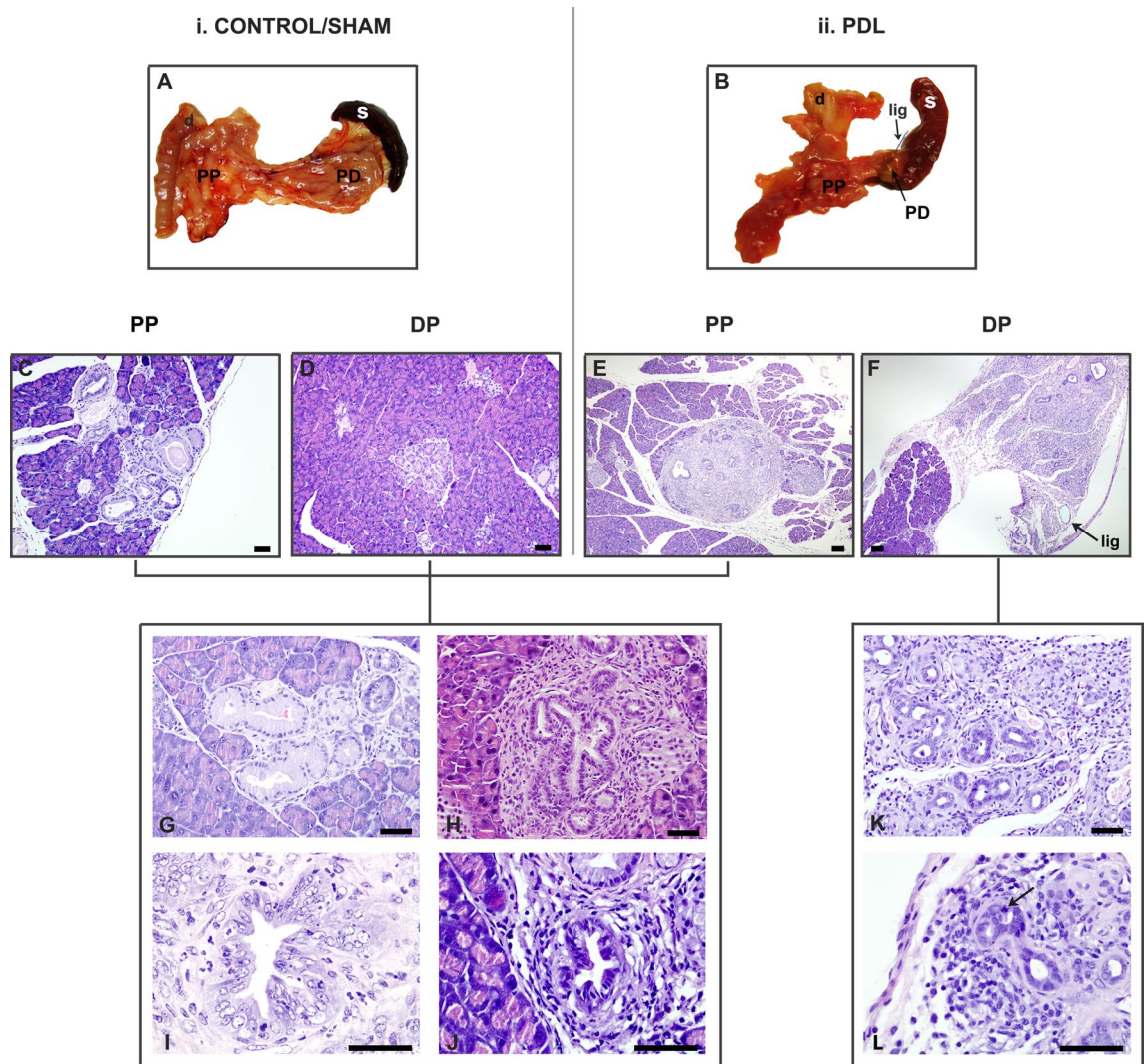


Figure 2. Histological aspects of PDL in *Ptf1a-Cre^(+/ki); K-ras LSLG12Vgeo^(+/ki)* mice. i. Macroscopic aspect of a Kras pancreas in a control or sham mice (A). Both proximal (C) and distal pancreas (D) developed PanIN1 (G), PanIN 2 (H), PanIN 3 (I) and AFL. (J). ii. Macroscopic aspect of a Kras pancreas of PDL mice (B). Note the atrophic aspect of the ligated distal pancreas which is shrunk to a small portion of the tissue close to the spleen (on the right of the ligature). Proximal pancreas (E) developed PanIN 1 (G), PanIN 2 (H), PanIN 3 (I) and AFL (J), while distal pancreas (F) was characterized by an atrophic pattern. Note preserved parenchyma before the ligature (arrow) and atrophic distal pancreas. Few PanIN 1 lesions and AFL were identified in the distal pancreas (K). But also an atrophic duct with an apoptotic cell (arrow), showing a pycnotic and irregular nucleus and surrounding the ducts moderate chronic inflammation (L). *d* duodenum, *s* spleen, *lig* ligature, *PP* proximal pancreas, *PD* distal pancreas. Scale bars (C–D and G–L): 50 μ m. Scale bars (E–F): 200 μ m.

this technique was observed with the preservation of the gastroepiploic pedicle so that any ischemic effect on the pancreas and the spleen is avoided.

The pancreas and the abdominal viscera were finally relocated to their anatomical position, and the midline incision was sutured in two layers (aponeurotic plane with 4/0 absorbable continuous suture, and skin with 4/0 silk interrupted suture) in mice from the PDL and sham groups.

Postoperative care and necropsy. Animals were monitored for signs of stress and followed up for 1, 3 or 6 months. At each of these PO periods, some mice of each group were euthanatized with CO₂ inhalation to explore the peritoneal cavity. The pancreas, the spleen and a segment of the duodenum were simultaneously removed. The ligature, if present (see Fig. 2B,F), was noted and the splenic lobe was transected and referred as distal pancreas (DP) for further analysis. The other lobes (gastric and duodenal) were referred to as proximal pancreas (PP). The animals were euthanatized by inhalation of 70–90% CO₂.

Histological study. Specimens were formalin-fixed and embedded in paraffin. Each pancreas was serially sectioned (3 μ m). A total of 11,200 slides were considered and a selection of 568 Sections (8 slides per animal, 70 mice in total) was stained with hematoxylin and eosin and reviewed blindly by an expert pathologist. Every

preneoplastic lesion (PanIN 1 to PanIN 3 and AFLs), defined according to the 2006 Consensus²⁵, was noted and counted^{6,26}.

Gene expression assays. Kras-PDL mice of different PO periods with enough quantity of atrophic distal pancreas to perform manual macroscopic dissection were selected for microarray analysis. The formalin-fixed, paraffin-embedded PP and DP of Kras-PDL mice were processed as previously described²⁷. Briefly, total RNA was then isolated using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies) from 40 serial sections with a thickness of 3 μ m for each of the portions of the pancreas (PP and DP).

RNA quantity and purity was determined on the ND-2000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and RNA integrity was assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). As RNA integrity number (RIN) obtained from Bioanalyzer is not informative for FFPE samples, the percentage of RNA > 200nt was used as an estimation of RNA integrity for each sample.

For microarrays analysis, amplification, labeling and hybridizations were performed according to protocol GeneChip Pico Reagent kit (Affymetrix). The working conditions used were 50 ng input RNA, 12 cycles of pre-PCR and 16 h of IVT. After the sample processing it was hybridized to GeneChip Mouse Clariom S Array (Affymetrix) in a GeneChip Hybridization Oven 640. Washing and scanning were performed using the Expression Wash and Stain and the GeneChip System of Affymetrix (GeneChip Fluidics Station 450 and GeneChip Scanner 3000 7G).

Microarray data processing and gene expression analysis. Quality control was performed on the raw data CEL files corresponding to 5 paired Kras-PDL mice (DP and PP) samples with arrayQualityMetrics package²⁸. Once quality checked, preprocessing of the data was executed with oligo package²⁹. Normalization was performed using Robust Multi-array Average (RMA) algorithm which creates an expression matrix from Affymetrix data. The raw intensity values were background corrected, log₂ transformed and then quantile normalized. Probes were annotated using annotateEset function and pd.clariom.s.mouse annotation data from the affycoretools package³⁰. Next, a linear model was fit to the normalized data to obtain an expression measure for each probe set on each array. Before performing the differential gene expression analysis, the expression matrix obtained after RMA normalization was filtered by the Inter-quantile range (IQR) which provides a measure of the spread of the middle 50% of the intensity scores for each gene. Differential expression analysis was performed for paired samples using Limma³¹ (Linear Models for Microarray Data) package. Normalized expression matrix was used as input for Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Genesets with an FDR < 0.25 were considered significant.

Human samples. Human pancreatic samples were obtained from patients who had undergone pancreatoduodenectomy (PD) with ductal occlusion of the remnant pancreas at the Parc de Salut Mar and had a primary diagnosis of PDAC or distal cholangiocarcinoma during the period 2012–2014. The protocol was approved by the Ethical Committee (CEIC-2012-130) of our institution (Hospital del Mar, Barcelona, Spain) and informed consent was obtained from all patients. All methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations for human subjects. In these selected cases, ductal occlusion of the main pancreatic duct of the distal remnant of the pancreas (without pancreatic anastomosis) was performed similarly the procedure described by Fromm et al.³² These patients provided a unique opportunity to study morphologic changes of the pancreas after pancreatic duct occlusion according to the evaluation of appearance on CT^{33,34} during the PO period. In addition, mutation analysis of exon 2, 3 and 4 of the KRAS gene was performed after manual or laser microdissection of precursor lesions in resected pancreas specimens.

Statistical analysis. Data are presented as mean and standard deviation (SD). Non-parametric tests (Chi-Square, U-Mann Whitney and Kruskal–Wallis) were employed for univariate analysis. For exposing purposes, premalignant lesions were evaluated independently in PanIN 1 and higher grade premalignant lesions (HGPL) including PanIN 2, PanIN 3 and AFL. Linear regression models were performed in order to determine the best-fit equation for the number of lesions during follow-up for PanIN1 and HGPL. In addition, factors found to be significant predictors in the univariate analysis were subjected to multivariate analysis (backward stepwise logistic regression analysis). Results were expressed as Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI). Differences were considered to be significant at a threshold of $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with statistical software (SPSS version 19.0; SPSS, Inc, Chicago, Ill).

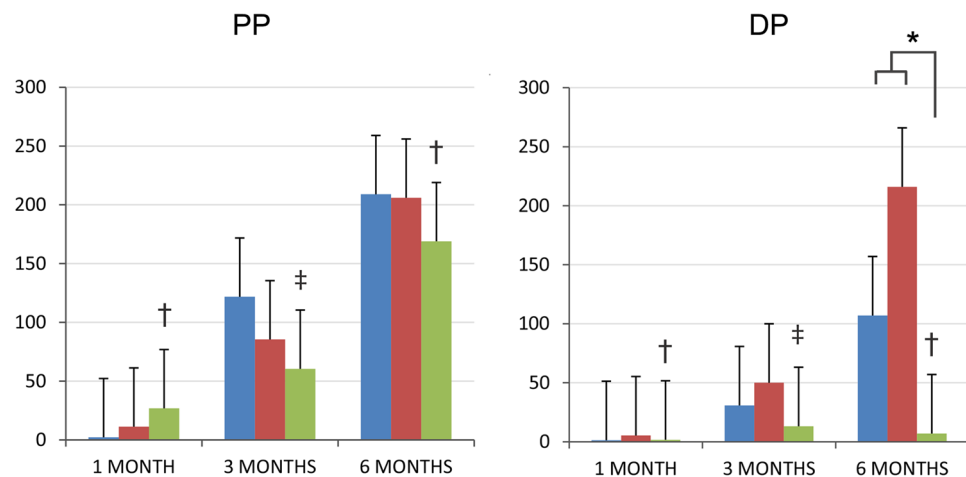
Results

Model validation. All animals tolerated the surgical procedure well and recovered and ambulated promptly. In the immediate PO period (4 days) the animals showed signs of stress and discomfort such as bristling hair or lack of grooming, as expected in a normal PO context. Later on, there were no signs of relevant disease in the PO follow-up and the Kras mice showed a normal growth curve, displaying no differences between groups.

As expected, premalignant lesions were not observed in control mice in which the conditional mutant Kras allele was not activated in the pancreas (Cre and G mice). In the Kras mice, we identified a majority of PanIN 1 lesions ($n = 6290$; 97%), followed in number by AFL ($n = 160$; 2.5%), PanIN 2 and PanIN 3 high-grade lesions ($n = 32$; 0.4% and $n = 10$; 0.1%, respectively) and frequent areas of focal lobulicentric atrophy (patchy atrophy) as already described in these models²⁶. Therefore, hereinafter the results refer only to Kras mice. The time-course development of lesions is shown in Fig. 2.

Histologically, consistent with other PDL models^{14,21,35}, the DP showed an intense pattern of atrophy with an increase of adipose and fibrosis over the PO periods. There also seemed to be an extension of adipose tissue

A) Mean number of PanIN 1 per mouse



B) Mean number of HGPL per mouse

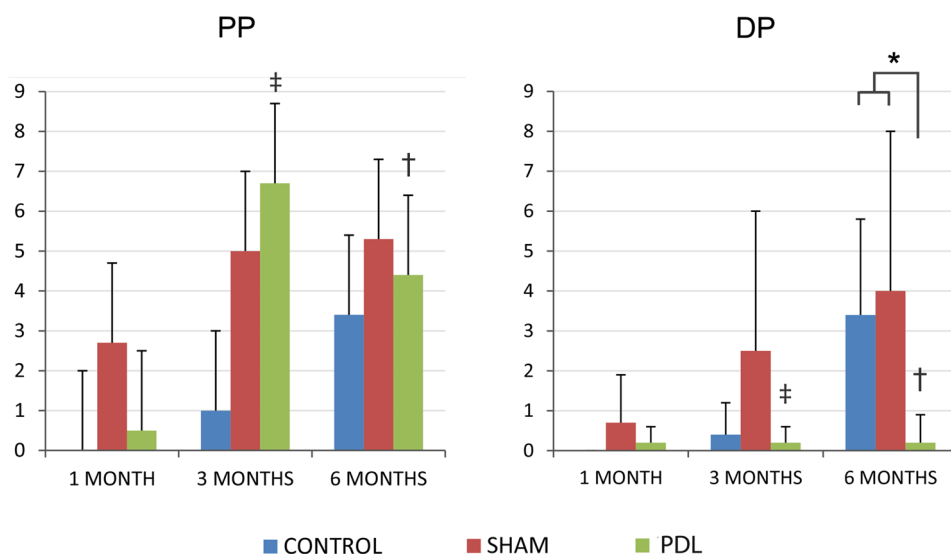


Figure 3. Evolution of preneoplastic lesions after PDL. Mean number of PanIN 1 (A) and HGPL (B) per mouse in each group over PO time. *Statistically significant ($p < 0.05$) comparing values between PDL vs. sham/control at DP after 6 month PO; †Statistically significant ($p < 0.05$) comparing PP vs. DP for each group and PO period, ‡: $p = 0.05$.

surrounding the pancreatic tissue. More specifically, there was a complete replacement of exocrine acini by pseudo-ductal complexes, based on apparently novel duct-like structures composed of low cuboidal cells (Fig. 2F,K) (severe atrophy). There were also scattered infiltrates of lymphocytes and plasma cells in the fibrous boundary.

The number of PanIN 1 lesions in the ligated pancreas is reduced. All mice presented an increase of PanIN 1 lesions in the PP over time, without differences among groups (best-fit less squared function was obtained with a linear model; $r = 0.57$, $p < 0.01$). A similar increase was observed in the DP in the sham and control groups over the PO, but not in the PDL group. In fact, the number of PanIN 1 lesions in the PDL group was significantly lower in DP compared to its corresponding value in PP at each PO time being almost 24-fold lower at 6 months PO. Furthermore, the number of PanIN 1 lesion in DP was significantly lower ($p < 0.01$) in the PDL group at 6 months PO compared to the sham and control group (Fig. 3A).

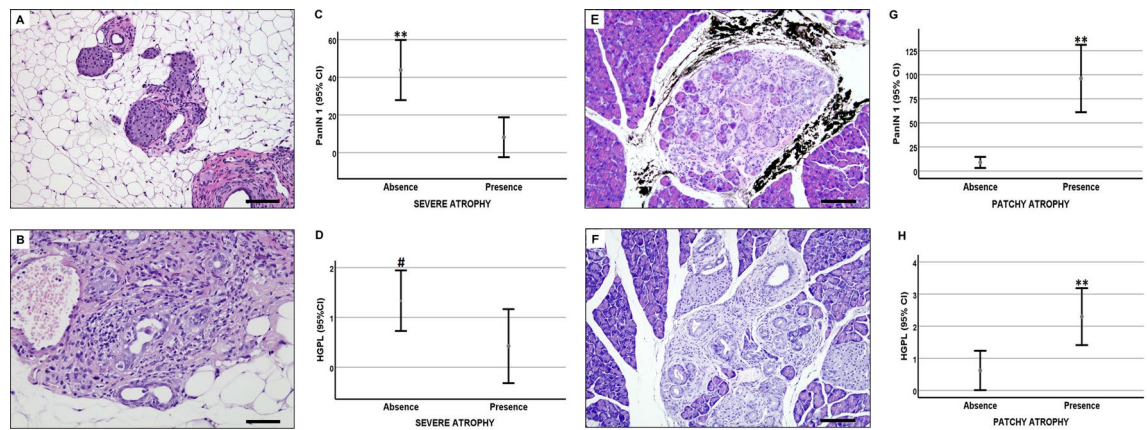


Figure 4. Types of atrophy in pancreas of Ptf1a-Cre^(+/ki); K-ras LSLG12Vgeo^(+/ki) mice. When severe pancreatic atrophy (A,B) was present in the specimen (in DP of PDL-Kras mice) then PanIN 1 (C) and HGPL (D) were less frequently present than when there was no severe atrophy. On the contrary, when patchy atrophy (E,F) was observed in the specimen (in PP of control, sham and PDL-group and in DP of control and sham group) then PanIN 1 (G) and HGPL (H) were more frequently present than when patchy atrophy was absent. Bar errors including mean value and 95% confidence interval. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; # $p = 0.059$. Scale bars: 50 μ m.

The number of HGPL in the ligated pancreas is reduced. Similarly to PanIN1 lesions, the number of HGPL in the PP usually increased over time in all groups and there were no significant differences between groups in any PO time. This increase was also observed in the DP of mice in the sham and control groups, which increased significantly over time following a linear model ($r = 0.56$, $p < 0.01$). Again, the number of HGPL in the PDL group was significantly lower in DP compared to its corresponding value in the PP at 3 and 6 months PO, being almost 22-fold lower at 6 months PO. Similarly to PanIN1 lesions, the number of HGPL in DP was significantly lower ($p < 0.01$) in the PDL group at 6 months PO compared to the sham and control group (Fig. 3B).

The risk of developing HGPL is reduced in the ligated pancreas. In the univariate and multivariate analyses two variables demonstrated a significant influence on the presence of HGPL: postoperative time and experimental group. Thus, the increase of PO time was associated with 3 times more risk of HGPL (OR: 2.9, IC 95% 1.09–8.02, $p = 0.03$).

Having undergone PDL was protective for the development of HGPL: the risk of having HGPL was 6.87-fold higher in the control group (IC 95% 1.21–39.17, $p = 0.03$) and 9.84-fold higher in the sham group (IC 95% 1.21–785.92, $p = 0.028$) than in the PDL group.

A statistically significant decrease in the number of HGPL and PanIN 1 was observed when severe atrophy was seen in the studied segment of the pancreas (Fig. 4). On the contrary, patchy atrophy was linked to a significant increase in the number of HGPL and PanIN 1 (Fig. 4).

Transcriptional analysis reveals downregulation of the acinar program in distal pancreas. Differential expression analysis using Limma revealed 38 significant differentially expressed genes after p-value adjustment for multiple testing; 36 of those were downregulated and 2 upregulated in the distal portion of the ligated pancreas. The vast majority of downregulated genes corresponded to acinar enzymes or were related to the acinar function. (Table 1, Fig. 5A). Gene Set Enrichment analysis supported this downregulation of the acinar function in the distal pancreas of Kras-PDL mice. (Fig. 5B).

Human experience in the ligated pancreas. Finally, to assess whether these effects were relevant to patients, we examined the pancreas of four patients with primary tumors in whom the distal pancreas was ligated after pancreatoduodenectomy (PD) that also contained PanIN1 and HGPL (see a representative case in Fig. 6). In all cases, the distal remnant pancreas (body and tail) was characterized by an atrophic pattern based on the CT analysis as it has been described in previous studies after PD^{33,34}. The mean rate reduction of the pancreatic parenchymal thickness measured at the cross-section of its body after 12 and 24 months was $25 \pm 15\%$ and $47 \pm 11\%$, respectively. An important ductal dilatation of the main pancreatic duct was also observed. In two of the cases exon 2 mutated to p.G12D and p.G12V. These observations are highly reminiscent of the findings in mice.

Discussion

Many conventional therapies for pancreatic cancer aim to induce cellular damage to trigger apoptosis. In fact, apoptosis is an evolutionary designed method of preventing propagations of mutations or simply to eliminate unwanted or useless cells³⁶. Mutated or useless cells are better dead and cell suicide through apoptosis may achieve this goal and this could be relevant in many diseases. For example, in acute pancreatitis, the extent of pancreatic acinar cell apoptosis has been shown to be inversely related to the severity of the disease and induction of apoptosis in animal models has been found to have a protective effect against acute pancreatitis³⁷. In

Gene symbol	Gene name	logFoldChange	adj.P.Val
Cel	Carboxyl ester lipase	-3.63	0.0002
Sycn	Syncollin	-3.42	0.0012
Klk1	Kallikrein 1	-3.01	0.0014
Pnliprp1	Pancreatic lipase related protein 1	-3.04	0.0014
Nupr1	Nuclear protein transcription regulator 1	-2.82	0.0016
Gm5409	Predicted pseudogene 5409	-2.42	0.0017
Try5	Trypsin 5	-2.92	0.0017
2210010C04Rik	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	-2.14	0.0019
Prss1	Protease, serine 1 (trypsin 1)	-2.74	0.0020
Prss2	Protease, serine 2	-2.93	0.0020
Rnase1	Ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	-4.17	0.0024
Zg16	Zymogen granule protein 16	-2.23	0.0024
Cpb1	Carboxypeptidase B1 (tissue)	-2.71	0.0025
Try10	Trypsin 10	-2.42	0.0025
Gm5771	Predicted gene 5771	-2.30	0.0026
Cpa1	Carboxypeptidase A1, pancreatic	-2.51	0.0026
Ctrl	Chymotrypsin-like	-2.55	0.0030
Cela2a	Chymotrypsin-like elastase family, member 2A	-2.39	0.0030
Cela1	Chymotrypsin-like elastase family, member 1	-2.07	0.0049
Gp2	Glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)	-2.29	0.0068
Clps	Colipase, pancreatic	-3.26	0.0070
Pnlip	Pancreatic lipase	-1.70	0.0070
Try4	Trypsin 4	-2.58	0.0070
Cpa2	Carboxypeptidase A2, pancreatic	-2.91	0.0073
Pnliprp2	Pancreatic lipase-related protein 2	-2.24	0.0077
Ctrb1	Chymotrypsinogen B1	-3.45	0.0089
Amy2a1	Amylase 2a1	-3.10	0.0095
Cela3b	Chymotrypsin-like elastase family, member 3B	-2.23	0.0095
Cela3a	Chymotrypsin-like elastase family, member 3A	-1.89	0.0152
Mt1	Metallothionein 1	-2.05	0.0162
Nhsl1	NHS-like 1	1.55	0.0181
Dmbt1	Deleted in malignant brain tumors 1	-1.55	0.0189
Ggt1	Gamma-glutamyltransferase 1	-2.10	0.0260
Reg1	Regenerating islet-derived 1	-2.39	0.0283
Gm10334	Predicted gene 10334	-1.50	0.0304
Tff2	Trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	-2.96	0.0429
Srpr	Signal recognition particle receptor (docking protein)	-1.31	0.0488
Zdhhc16	Zinc finger, DHHC domain containing 16	2.04	0.0491

Table 1. Gene name, fold change and p-value of differentially expressed genes between PP and DP following PDL in Ptf1a-Cre^(+/ki); K-ras LSLG12Vgeo^(+/ki) mice. 38 genes were selected with a p-value < 0.05.

other diseases like PDAC of the proximal pancreas, complete occlusion of the main pancreatic duct with the corresponding massive atrophy of the distal pancreas is frequent³⁸ (see Fig. 7). In that regard, it has usually been recognized that complete occlusion of the main duct of exocrine glands leads to the deletion of acinar cells by a massive and rapid apoptosis phenomenon. This has been demonstrated in the pancreas^{16–19} and also in salivary glands³⁹. We previously studied these phenomena with an efficient model of PDL in normal murine and normal pig pancreas *in vivo*^{20,21} and we confirmed a massive deletion of exocrine cells through apoptosis while preserving the endocrine tissue. In the present study we triggered the same physiological mechanism but in Kras mice at an early stage (when p53 is still active) in order to wipe out these potentially pro-oncogenic cells with a long period of follow-up (up to 6 months) in comparison to several intergroup controls (control and sham group) and intragroup controls (proximal pancreas). Very recently, two reports^{40,41} have described the influence of duct obstruction on the remaining distal pancreas in Kras mouse models at the cellular level but without quantitative analysis of preneoplastic lesions. Both of them described similar signs of strong atrophy and a complete loss of the acinar compartment with a ductal replacement but while Shi et al.⁴⁰ described less preneoplastic lesions in the acinar differentiation models in the distal pancreas, Cheng et al.⁴¹ observed a higher number of proliferative non-mucinous cells of both acinar and ductal origins at 2 weeks after PDL, without severe nuclear atypia or tumoral infiltration after 5-month of follow up.

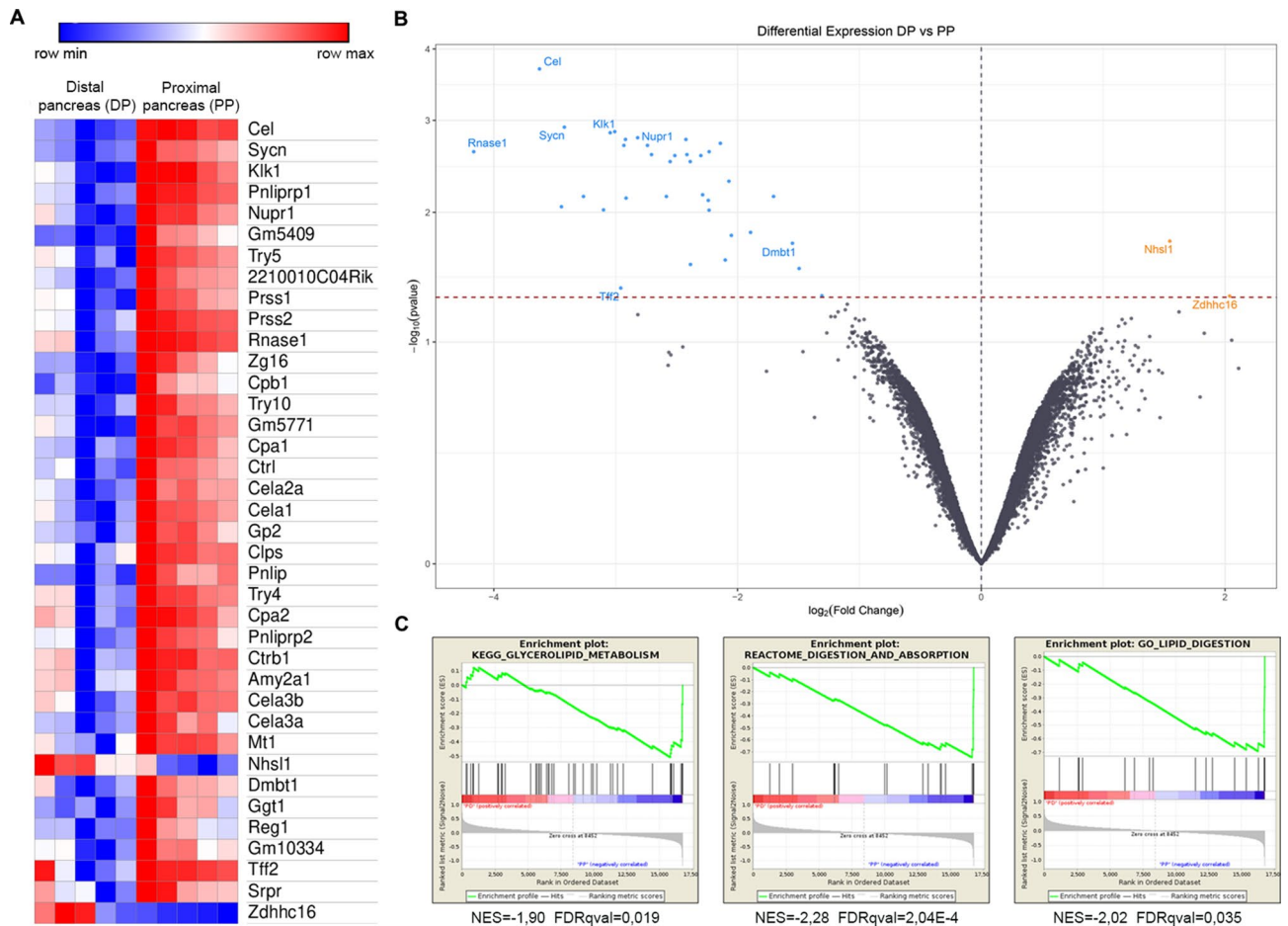


Figure 5. Differential gene expression after PDL. Hierarchical cluster heat-map of 38 differentially expressed genes between pancreatic segments (p -value < 0.05) (A). Volcano plot showing significant expressed genes, some of which are previously related to PDAC tumorigenesis (blue: upregulated in PP; yellow: upregulated in DP) (p -value < 0.05) (B). Gene Set Enrichment Analysis supports downregulation of the acinar function in the distal pancreas of *Kras*-PDL mice after ligation ($p < 0.05$) (C).

In our study, after a long follow-up (up to 6 months) and an exhaustive quantitative analysis, both the global evaluation of premalignant lesions (PanIN 1 and HGPL) and the risk of the apparition of them in a single animal were found to be dramatically lower in DP than in PP (more than 20 times lower) in PDL group and significantly lower than in sham and control groups.

Interestingly, animals with PDL experienced a marked reduction of the DP (severe atrophy) with preservation of the proximal one and this phenomenon was linked to a lower number of PanIN 1 and HPGL. In fact, the signs of severe atrophy of the distal pancreas after ligation were already evident through gross examination of the specimens at 1, 3 and 6 months PO (see the small remaining tissue of DP in Fig. 2B) and matched well with the corresponding microscopic examination of a complete acinar dropout. A similar atrophic pattern was seen spontaneously after occlusion of the main pancreatic duct by a proximal tumor in patients³⁸ (Fig. 7) or over time in a very selective group of patients in which the remaining distal pancreas was ligated after pancreaticoduodenectomy based on the CT analysis (Fig. 6).

In the gene expression analysis of the animals, an expected reduction in pancreatic secretion was evident in DP samples of the PDL group. Interestingly, some top genes previously related to the development of preneoplastic lesions or PDAC had been upregulated in PP compared to DP like *Sycn*⁴², *Dmbt1*⁴³, *Klk1*⁴⁴ and mainly *Nupr1*. This last gene cooperates with *KrasG12D* to induce PanIN formation and pancreatic ductal adenocarcinoma development in mice^{45–47} (Fig. 5).

Our results are consistent with previous literature in which patchy atrophy accompanied by areas of acino-ductal metaplasia was constantly described in *Kras* models and usually linked to premalignant lesions^{6,25,48,49}. Patchy atrophy has also been related to the presence of PanIN lesions in patients with familial predisposition to PDAC^{6,14}. Acinar to ductal metaplasia has been associated with PanIN lesions and many acini in the lobules of lobulicentric atrophy described earlier are often characterized by prominent acinar-ductal metaplasia^{14,26}. However, it has been serendipitously stated that when the atrophy is severe ($> 90\%$ loss of acini and ducts) is unusual to see PanIN lesions at least in the resected human pancreas without adenocarcinoma⁵⁰. These findings are also in agreement with the currently accepted origin of PanIN lesions: observations indicate that the ductal-like cells present in PanINs rarely arise by the transformation of normal duct cells. Instead, PanINs may originate either

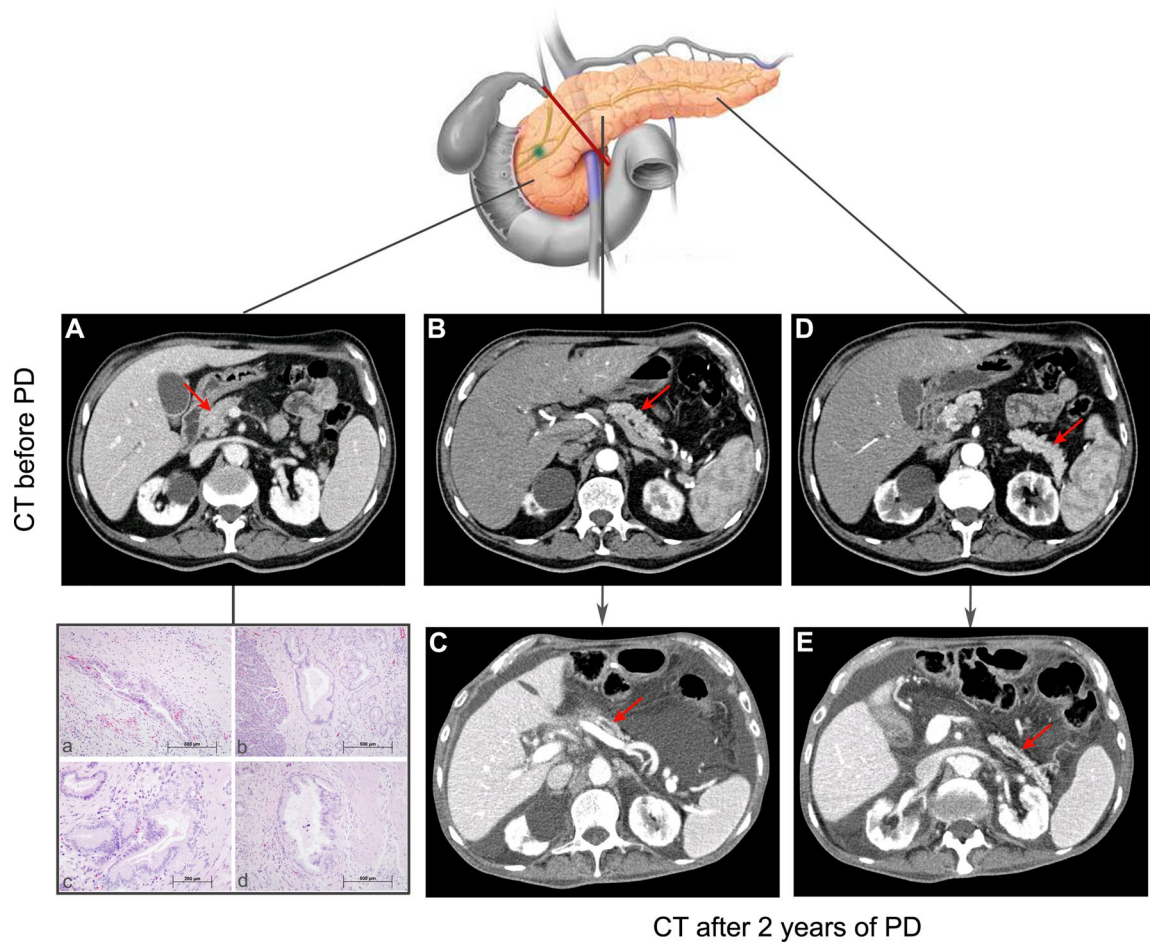


Figure 6. Human ligated pancreas. CT before pancreatoduodenectomy: head (A), body (B) and tail (D) of the pancreas (red arrows). CT after 2 years of the pancreatoduodenectomy (C,E). Note the reduction of the body (C) and tail (E) of the remaining pancreas. Hematoxylin–eosin stains of the resected head of the pancreas in which we can recognize the tumor (a), PanIN 1 (b), PanIN 2 (c) and PanIN 3 (d).

by transdifferentiation of acinar cells or by misdifferentiation of their precursors^{23,51,52}. Therefore, the transformation to PanIN lesions of these acinar cells or their precursors could be interrupted when an early obstruction of the main pancreatic duct is performed even when *Kras* pro-oncogenic stimulation is present. This could be a potential research line of interest in some cancerous risk patients taken into account that: (1) Complete occlusion of the main pancreatic duct could trigger a physiological protective effect to avoid malignancies in pancreas harboring *Kras* mutations without the aid of any other potentially dangerous treatments as it has been seen before; (2) This procedure could be feasible both surgically and endoscopically⁵³; (3) *Kras* mutations are believed to be a common initiator of mucinous lesions and other cancer precursor lesions⁵⁴ and (4) More than 90% of pancreatic adenocarcinomas harbor activating mutations in *Kras* for which targeted therapies have been notoriously ineffective across all cancer types prompting the perception that RAS is undruggable⁵⁴. However, some limitations of this research must also be addressed: All the experiences were done in mice models in which early pancreatic lesions are evaluated after duct obstruction. Therefore, the final effect of duct obstruction on established PDAC especially in humans are beyond the scope of this study and could be detrimental for its evolution.

In conclusion, Pancreatic duct ligation in *Ptf1a-Cre*^(+/ki); *K-ras* LSLG12Vgeo^(+/ki) mice induces a decrease in the presence of premalignant lesions in the ligated distal pancreas. This could be a potential line of research of interest in some cancerous risk patients.

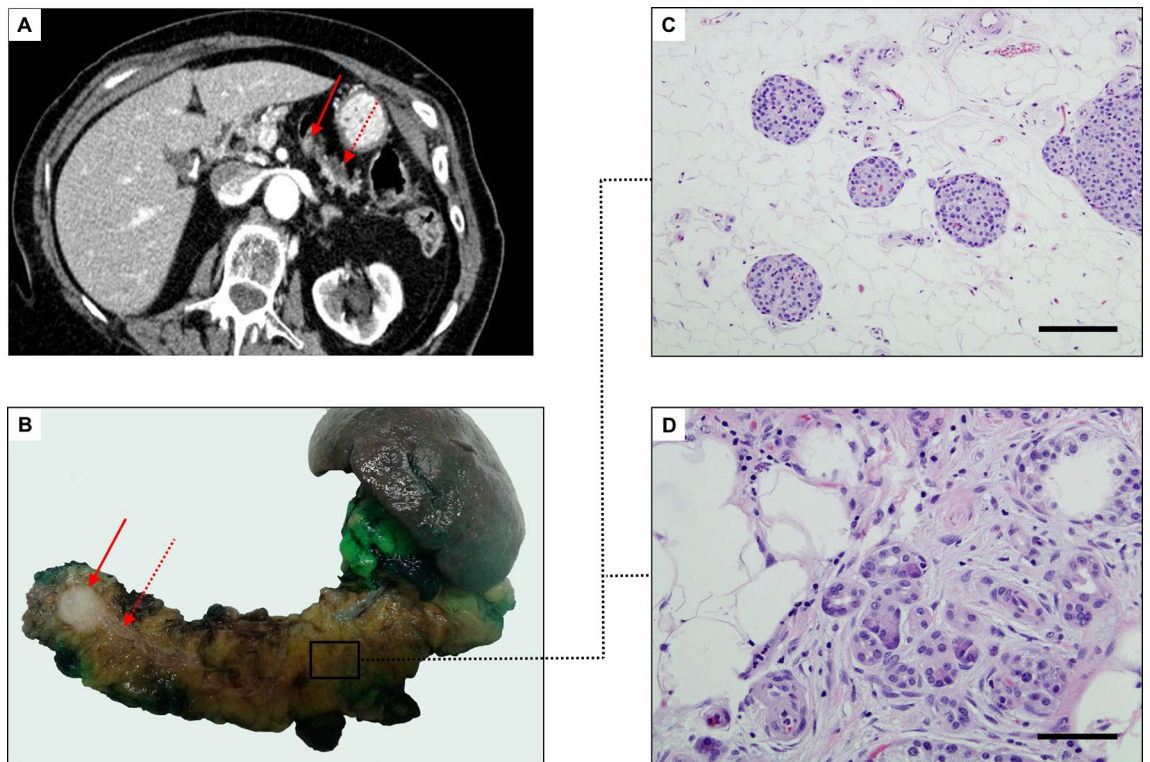


Figure 7. A resected human PDAC in the body of the pancreas that spontaneously lead to complete occlusion of the main pancreatic duct and complete atrophy of the distal pancreas. A female 84-year old patient was subjected to distal pancreatectomy with splenectomy for PDAC (pT3N0M0) in our institution. Preoperative CT imaging (A) as well as the surgical specimen (B) show the obstructive tumor, measuring 16 × 12 × 8 mm in the neck of the pancreas (arrow), and secondary dilation of the main pancreatic duct (dotted arrow). Note the severe atrophy of the distal pancreas (body and tail) at the histological level (C,D), where exocrine acini have been replaced by fibroadipose tissue, with preservation of endocrine Langerhans islets. Histological images of atrophy in the distal pancreas are similar to the ligated distal pancreas in *Kras* mice (see Fig. 4). Scale bars: 50 μm.

Received: 26 March 2020; Accepted: 22 September 2020

Published online: 27 October 2020

References

- Mattiuzzi, C. & Lippi, G. Current cancer epidemiology. *J. Epidemiol. Glob. Health* **9**, 217–222 (2019).
- Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).
- Han, H. & Von Hoff, D. D. SnapShot: Pancreatic cancer. *Cancer Cell* **23**, 424–424.e1 (2013).
- Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
- Shen, R. *et al.* The biological features of PanIN initiated from oncogenic *Kras* mutation in genetically engineered mouse models. *Cancer Lett.* **339**, 135–143 (2013).
- Aichler, M. *et al.* Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: A comparative study in transgenic mice and human tissues. *J. Pathol.* **226**, 723–734 (2012).
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M. & Klöppel, G. New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis. *Pathologie* **33**, 189–193 (2012).
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M. & Klöppel, G. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World J. Gastroenterol.* **20**, 13833–13841 (2014).
- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B. & Lüttges, J. Frequency of *K-ras* mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: A meta-analysis. *Neoplasia* **7**, 17–23 (2005).
- Almoguera, C. *et al.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549–554 (1988).
- Wilentz, R. E., Argani, P. & Hruban, R. H. Loss of heterozygosity or intragenic mutation, which comes first?. *Am. J. Pathol.* **158**, 1561–1563 (2001).
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. & Bertrand, R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **8**, 377–397 (2007).
- Schuler, M., Bossy-wetzel, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P. & Green, D. R. P53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome C release. *J. Biol. Chem.* **275**, 7337–7342 (2000).
- Brune, K. *et al.* Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **30**, 1067–1076 (2006).
- Maitra, A. *et al.* Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod. Pathol.* **16**, 902–912 (2003).
- Wada, M., Doi, R., Hosotani, R., Lee, J. U. & Imamura, M. Apoptosis of acinar cells in rat pancreatic duct ligation. *J. Gastroenterol.* **30**, 813–814 (1995).

17. Walker, N. I. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am. J. Pathol.* **126**, 439–451 (1987).
18. Scoggins, C. R. *et al.* p53-Dependent acinar cell apoptosis triggers epithelial proliferation in duct-ligated murine pancreas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **270**, 827–836 (2000).
19. Watanabe, S., Abe, K., Anbo, Y. & Katoh, H. Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation: A qualitative and quantitative histological study. *Arch. Histol. Cytol.* **58**, 365–374 (1995).
20. Quesada, R. *et al.* Radiofrequency pancreatic ablation and section of the main pancreatic duct does not lead to necrotizing pancreatitis. *Pancreas* **43**, 1–7 (2014).
21. Quesada, R. *et al.* Long-term evolution of acinar-to-ductal metaplasia and β -cell mass after radiofrequency-assisted transection of the pancreas in a controlled large animal model. *Pancreatology* **16**, 1–6 (2015).
22. Guerra, C. *et al.* Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* **4**, 111–120 (2003).
23. Guerra, C. *et al.* Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012> (2007).
24. De Groef, S. *et al.* Surgical injury to the mouse pancreas through ligation of the pancreatic duct as a model for endocrine and exocrine reprogramming and proliferation. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/52765> (2015).
25. Hruban, R. H. *et al.* Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: Consensus report and recommendations. *Cancer Res.* **66**, 95–106 (2006).
26. Hruban, R. H., Maitra, A. & Goggins, M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **1**, 306–316 (2008).
27. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Select. Works Terry Speed* **4**, 601–616 (2012).
28. Kauffmann, A., Gentleman, R. & Huber, W. arrayQualityMetrics—A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* **25**, 415–416 (2009).
29. Carvalho, B. S. & Irizarry, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**, 2363–2367 (2010).
30. James W. MacDonald. Affycoretools: Functions useful for those doing repetitive analyses with Affymetrix GeneChips. R package version 1.56.0. (2010).
31. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
32. Fromm, D. & Schwarz, K. Ligation of the pancreatic duct during difficult operative circumstances. *J. Am. Coll. Surg.* **197**, 943–948 (2003).
33. Sato, N. *et al.* Long-term morphological changes of remnant pancreas and biliary tree after pancreatoduodenectomy on CT. *Int. Surg.* **83**, 136–140 (1998).
34. Tomimaru, Y. *et al.* Comparison of postoperative morphological changes in remnant pancreas between pancreaticojejunostomy and pancreaticogastrostomy after pancreaticoduodenectomy. *Pancreas* **38**, 203–207 (2009).
35. Burdío, F. *et al.* Radiofrequency-induced heating versus mechanical stapler for pancreatic stump closure: In vivo comparative study. *Int. J. Hyperth.* **32**, 2 (2016).
36. Nusse, R. Molecular biology of cancer genes. *Trends Genet.* **7**, 103 (2003).
37. Bhatia, M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: Is it good or bad?. *J. Cell Mol. Med.* **8**, 402–409 (2004).
38. Chu, L. C., Goggins, M. G. & Fishman, E. K. Diagnosis and detection of pancreatic cancer. *Cancer J.* **23**, 333–342 (2020).
39. Takahashi, S. *et al.* Apoptosis and mitosis of parenchymal cells in the duct-ligated rat submandibular gland. *Tissue Cell* **32**, 457–463 (2000).
40. Shi, C. *et al.* Differential cell susceptibilities to Kras in the setting of obstructive chronic pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.001> (2019).
41. Cheng, T. *et al.* Ductal obstruction promotes formation of preneoplastic lesions from the pancreatic ductal compartment. *Int. J. Cancer* **144**, 2529–2538 (2019).
42. Makawita, S. *et al.* Validation of four candidate pancreatic cancer serological biomarkers that improve the performance of CA19.9. *BMC Cancer* <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-404> (2013).
43. Cheung, W. *et al.* Application of a global proteomic approach to archival precursor lesions: Deleted in malignant brain tumors 1 and tissue transglutaminase 2 are upregulated in pancreatic cancer precursors. *Pancreatology* **8**, 608–616 (2008).
44. Kontos, C. K., Mavridis, K., Talieri, M. & Scorilas, A. Kallikrein-related peptidases (KLRs) in gastrointestinal cancer: Mechanistic and clinical aspects. *Thromb. Haemost.* **110**, 450–457 (2013).
45. Hamidi, T. *et al.* Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis. *J. Clin. Invest.* **122**, 2092–3103 (2012).
46. Cano, C. E. *et al.* Genetic inactivation of Nupr1 acts as a dominant suppressor event in a two-hit model of pancreatic carcinogenesis. *Gut* **63**, 984–995 (2014).
47. Grasso, D. *et al.* Genetic inactivation of the pancreatitis-inducible gene Nupr1 impairs PanIN formation by modulating Kras^{G12D}-induced senescence. *Cell Death Differ.* <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.74> (2014).
48. Basturk, O. *et al.* A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 1730–1741 (2015).
49. Guerra, C. & Barbacid, M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol. Oncol.* **7**, 232–247 (2013).
50. Sharma, S. & Green, K. B. The pancreatic duct and its arteriovenous relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 613–620 (2004).
51. Pérez-Mancera, P. A., Guerra, C., Barbacid, M. & Tuveson, D. A. What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology* **142**, 1079–1092 (2012).
52. von Figura, G., Morris, J. P., Wright, C. V. E. & Hebrok, M. Nr5a2 maintains acinar cell differentiation and constrains oncogenic Kras-mediated pancreatic neoplastic initiation. *Gut* **63**, 656–664 (2014).
53. Andaluz, A. *et al.* Endoluminal radiofrequency ablation of the main pancreatic duct is a secure and effective method to produce pancreatic atrophy and to achieve stump closure. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42411-7> (2019).
54. Wood, L. D., Yurgelun, M. B. & Goggins, M. G. Genetics of familial and sporadic pancreatic cancer. *Gastroenterology* **156**, 2041–2055 (2019).

Acknowledgements

Carmen Guerra, Experimental Oncology Group, CNIO Madrid. Marta Cañamero, Translational Medicine Roche Pharma Research. Munich. Eulalia Puigdecenet, Microarray Analysis Service, Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona. Lara Nonell, Microarray Analysis Service, Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona. Xavier Moll, Veterinary Anesthesia Service, UAB, Barcelona. Evelyn Andrade, Cancer Research Program, PRBB Barcelona. Tania Lobató, Cancer Research Program, PRBB Barcelona. Irene Espósito (Institute of Pathology, Technische Universität München, Ismaningerstr. 22 81675 Munich, Germany).

Author contributions

M.C., R.Q., D.D., P.S. and F. B. performed the animal experiences. M.C. and M.I. evaluated the histological samples F.R., M.V., J.M. and M.P. did performed the genomic analysis All contributed to analyse the data, review the previous data and contributed to write and approve the final version of the article.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad under “Plan Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad”, Grant N° “RTI2018-094357-B-C22”.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74947-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

La **Societat Catalana de Pàncrees** atorga el:

VI Premi Lluïsa Guarner a la Investigació en Patologia Pancreàtica, 2021
Modalitat Bàsica

Al treball:

Pancreatic duct ligation reduces premalignant pancreatic lesions in a Kras model of pancreatic adenocarcinoma in mice

Marta Cáceres, Rita Quesada, Mar Iglesias, Francisco X. Real, Maria Villamonte, Jaime Martinez de Villarreal, Mónica Pérez, Ana Andaluz, Xavier Moll, Enrique Berjano, Dimitri Dorcaratto, Patricia Sánchez Velazquez, Luís Grande, Fernando Burdío.



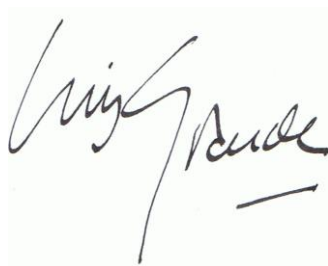
Presidenta: **Eva C. Vaquero**
Barcelona, 4 d'abril, 2021

LUÍS GRANDE POSA, Catedrático de Cirugía de la Universidad Autónoma de Barcelona, adscrito a la Unidad Docente del Parc de Salut Mar y Jefe Emérito del Servicio de Cirugía del Hospital del Mar de Barcelona

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: *“Estudio piloto de la ligadura quirúrgica del páncreas distal en modelo murino Kras de adenocarcinoma de páncreas”*, del que es autor Marta Cáceres Díez, se ha realizado bajo mi dirección y la de los doctores Fernando Burdío Pinilla y Rita Quesada Díez y es adecuado para ser presentado como TESIS DOCTORAL, para su evaluación por el Tribunal Calificador y optar al acceso de grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Barcelona a doce de mayo de 2021.



Dr. Luís Grande Posa