



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA

**MUTACIÓN DE TP53 EN CARCINOMAS DEL ÁMPULA
DE VATER Y SU ASOCIACIÓN CLÍNICA Y
PATOLÓGICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA

PRESENTA:

DR. FRANCISCO CARLOS CISNEROS JUVERA

DR. JAVIER MELCHOR RUAN

DIRECTOR DE TESIS

TLALPAN, CIUDAD DE MÉXICO.

FEBRERO 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCIÓN

Una de las características del desarrollo y progresión de las neoplasias malignas es la capacidad de evasión a uno o varios mecanismos del sistema inmune. La característica principal de la oncogénesis son los cambios genéticos que ocurren en las células tumorales, incluyendo mutaciones, alteraciones cromosómicas, modificaciones epigenéticas, cambios en la expresión de algunos genes, variantes de empalmes y otras disrupciones relacionadas con la proliferación y crecimiento celular. Por otra parte, la piedra angular en la respuesta inmunológica adaptativa es el reconocimiento de neoantígenos o péptidos anormales; de tal modo que el crecimiento de las células neoplásicas y el desarrollo de metástasis, dependen en gran medida a la capacidad de evasión de presentación de antígenos, activación de las células T, reclutamiento de las células del sistema inmune al microambiente del tumor y más aún, a la evasión de la activación de células T citolíticas (Sweis, R.F., et al. 2017).

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

Apoptosis

El término de apoptosis fue utilizado por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir morfológicamente las distintas formas de muerte celular, aunque ciertamente el concepto de los componentes de la apoptosis se describió algunos años previos. La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y envejecimiento celular, como un mecanismo para mantener la homeostasis en la población celular de los tejidos. Aunque los mecanismos y la morfología de la apoptosis y la necrosis difieren, existe interposición entre ambos procesos. La evidencia indica que la necrosis y apoptosis representan la expresión morfológica de una red bioquímica compartida descrita como “continuum apoptosis-necrosis” (Elmore, S., et al. 2007).

Mecanismos de la apoptosis. La información científica señala la existencia de dos mecanismos o vías para la apoptosis: Una vía intrínseca o mitocondrial y una vía extrínseca o por señalización de receptores (Croce, C.M. 2008; Elmore, S., et al. 2007). Existe además una vía adicional que involucra citotoxicidad mediada por Linfocitos T y perforina/granzima dependiente de la muerte celular. La vía perforina/granzima induce apoptosis por granzima B o granzima A. Todas las vías convergen en una sola vía “ejecutora” o terminal. Ésta vía terminal inicia con el enclavamiento de la caspasa 3 y resulta en la fragmentación del DNA, degradación del citoesqueleto y de las proteínas nucleares, reticulación de las proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y finalmente en el consumo por fagocitosis. La vía granzima A activa de manera paralela una vía de muerte celular independiente de

caspasas, con daño a la hélice del DNA.

Las caspasas son extensamente producidas en forma de proenzimas inactivas en la mayoría de las células; una vez activas, tienen la capacidad de activar otras procaspasas. Ésta cascada proteolítica en la que una caspasa activada puede activar otras caspasas, amplifica las vías de señalización para una rápida muerte celular. Hasta el momento se han identificado 10 caspasas principales, divididas en “iniciadoras” (caspasas 2, 8, 9 y 10), “ejecutoras” (caspasas 3, 6 y 7) e “inflamatorias” (caspasas 1, 4 y 5).

Otra característica bioquímica es la expresión de marcadores en la superficie celular, que resultan en el reconocimiento temprano de la célula apoptótica por las células adyacentes, permitiendo la fagocitosis rápida con compromiso mínimo del tejido circundante. Se reconocen varios ligandos para éste efecto, siendo los principales la *fosfatidilserina*, *anexina I* y *calreticulina*.

Vía extrínseca. Ésta inicia la apoptosis involucrando la interacción de receptores transmembrana. En ésta vía intervienen receptores de muerte celular de la superfamilia del gen de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Los miembros de ésta familia de receptores cuentan con un dominio extracelular similar y un dominio intracelular de alrededor de 80 aminoácidos denominado “dominio de muerte”. Éste dominio de muerte tiene un papel importante en la vía de señalización intracelular para la apoptosis. Los ligandos mejor caracterizados son FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5.

Vía perforina/granzima. La citotoxicidad mediada por células T es una variante de la

respuesta de hipersensibilidad tipo IV, posterior a la sensibilización de células asesinas presentadoras de antígeno CD8+. Éstos linfocitos T citotóxicas tienen la facultad de inducir apoptosis a través de la vía extrínseca, con la interacción de los ligandos FasL/FasR. Sin embargo, otra vía de acción contra células tumorales e infectadas por virus es a través de la formación de poros por acción de perforinas y la secreción transmembrana de gránulos citoplásmicos que contienen proteasas como la granzima A y granzima B, principalmente. La granzima B tiene la capacidad de activar la procaspasa-10, además de utilizar la vía mitocondrial para amplificar la señalización de muerte celular, induciendo la liberación de *citocromo c*. Por otra parte, la granzima A induce la apoptosis al activar la DNAsa NM23-H1, un producto del gen supresor de tumores, jugando un papel importante en la inducción de la apoptosis en células tumorales.

Vía intrínseca. Ésta vía inicia la apoptosis involucrando diversos estímulos mediados no por receptores, sino por señalización de productos intracelulares, desarrollando estímulos que pueden ser de carácter positivo o negativo. Las vías de señalización negativa involucran la ausencia de producción de factores de crecimiento, hormonas y citosinas que al no encontrarse activan la apoptosis. Los estímulos de carácter positivo involucran la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y la liberación de radicales libres, por mencionar algunos (Elmore, S., et al. 2007).

Oncogenes y cáncer

El cáncer es causado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de microRNA. Una sola alteración genética generalmente no es suficiente para el desarrollo de una neoplasia maligna. La primera evidencia de que el cáncer se originaba de

alteraciones genéticas se presentó en los estudios relacionados al linfoma de Burkitt. Históricamente los cambios de transformación del cáncer se definen como “eventos de iniciación” o de “progresión”. Los oncogenes se encargan del encodamiento de proteínas encargadas del control de proliferación celular, apoptosis o ambas. Éstos genes pueden ser activados por alteraciones estructurales como resultado de mutaciones o fusión de genes, por yuxtaposición de elementos potenciadores o por amplificación. Las traslocaciones y mutaciones ocurren como eventos iniciadores y la amplificación usualmente se presenta durante la progresión. Los productos de los oncogenes pueden clasificarse en 6 grupos: factores de transcripción, remodeladores de cromatina, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señal y reguladores de apoptosis (Croce, C.M. 2008).

TP53

El gen TP53 se localiza en el cromosoma 17p13.1 y codifica una proteína nuclear que actúa como factor de transcripción, retrasando la progresión de las células en el ciclo celular, en la fase Gap 1 (G1) y permitiendo la reparación del DNA o el inicio de los mecanismos de muerte celular programada (apoptosis). Además de su papel en la regulación o mediación del ciclo celular, se encuentra asociado al crecimiento celular, división celular, supervivencia y/o muerte celular programada; jugando un papel importante particularmente en la respuesta a daños directos al DNA secundarios principalmente a agentes externos, tales como la radiación ionizante y una variedad de otros carcinogénicos. La habilidad de p53 para regular el inicio de la apoptosis se encuentra mediada en parte por la actividad proapoptótica de la mitocondria y el factor pro-apoptótico BH3; ésta

característica en su expresión natural para prevenir la proliferación de células dañadas, le ha conferido su descripción como “el guardián del genoma”. Una mutación en el gen de p53 anula el “punto de revisión” en la fase G1 del ciclo celular puede cambiar la respuesta celular al daño del DNA, promoviendo la inestabilidad genética y la adquisición consecutiva de mutaciones adicionales. La mutación del gen de TP53 es el evento más común en el desarrollo de cáncer (Meek, D.W. 2015; Malkin, D. 2011).

Estructuralmente p53 contiene varios dominios que son esenciales para la realización de sus funciones. Dos dominios contiguos denominados TAD1 y TAD2 (figura 1), localizados en el N-terminal. El dominio TAD2 realiza importantes contribuciones en la apoptosis y la respuesta a la radiación gamma. La región central o dominio central es un sitio específico de unión a DNA y es esencial para la transactivación, la represión de algunos genes y la supresión tumoral. El C-terminal contiene sitios de unión a DNA inespecíficos; ésta región contiene un dominio de tetramerización, es decir, regula la formación de homotetrámeros y heterotetrámeros, siendo crucial en la transactivación y supresión tumoral en el tipo “silvestre” de p53 (Meek, D.W. 2015).

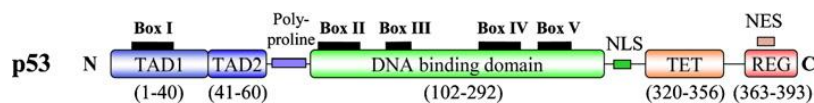


Figura 1. Estructura modular de p53. Tomado de Meek, D.W. 2015.

Anatomía del ámpula de Vater

El ámpula de Vater, descrita por primera vez en 1685 por Gottfreid Bidloo, lleva el nombre de Abraham Vater (1720); es una papila que se proyecta en la mucosa duodenal y

está compuesta por la unión de los conductos pancreatobiliares. Denominada también como papila duodenal mayor, se localiza en la pared posteromedial de la segunda porción del duodeno, de 7 a 10 cm del píloro. En raras ocasiones se localiza en la tercera porción del duodeno (Skandalakis J.E. et al. 2004). La papila duodenal mayor es una elevación de la mucosa duodenal en el sitio donde el conducto biliar común y el conducto pancreático se introducen al duodeno, formando un solo conducto de 1 a 8 mm de longitud en el 60% de los casos; hasta un 38% de las veces se introduce como “doble cañón” y en un 2% como dos orificios separados. La papila se visualiza de mejor manera a través de endoscopia, encontrándola como una prominencia de 5 a 10 mm de largo y 5 mm de ancho, localizada en la unión de pliegues duodenales transversales y longitudinales en forma de “T”. el esfínter de Oddi se compone de pequeñas fibras musculares circulares y longitudinales con una longitud en conjunto de aproximadamente 10 mm, contenidas todas en la pared duodenal. Éste esfínter tiene 3 funciones principales: 1. La regulación de los fluidos biliar y pancreático al duodeno; 2. Desviación de la bilis hepática al interior de la vesícula biliar y 3. La prevención del reflujo del contenido duodenal al tracto biliopancreático (Kim, T.U. et al. 2008)

Carcinoma del ámpula de Vater

Se definen como los carcinomas originados en el complejo del ámpula, distal a la bifurcación del conducto biliar común y el conducto pancreático; éstos últimos traspasan la pared duodenal y se abren dentro de la luz del duodeno, formando una pequeña elevación de la mucosa.

Epidemiología. La transformación neoplásica de la mucosa intestinal ocurre más

comúnmente en el ampulla que en cualquier otro sitio del intestino delgado. A pesar de esto, los tumores del ampulla son raros, con una incidencia aproximada de 4 a 6 casos por millón de personas (Albores-Saavedra J., et al. 2009). Los tumores benignos y malignos del ampulla pueden presentarse de manera esporádica o en el contexto de un síndrome genético; un ejemplo de esto es el aumento en la incidencia de tumores del ampulla hasta 300 veces más en los pacientes con síndromes polipósicos hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (PAF) o el cáncer colorrectal hereditario no-polipósico, en comparación con la población general. La edad promedio de presentación en los casos esporádicos es entre los 60 a 70 años (Talamini M.A., et al. 1997).

Características biológicas. La mayoría de la evidencia en relación al comportamiento biológico de los carcinomas del ampulla de Vater, apuntan a una analogía con las neoplasias intestinales, más que a las neoplasia pancreatobiliares. Histológicamente las neoplasias del ampulla de Vater, presentan varias similitudes con los hallazgos característicos de los adenomas y adenocarcinomas de origen intestinal, presentándose hasta en el 47% de los casos el subtipo intestinal, seguido del pancreatobiliar en 24%, adenocarcinomas pobremente diferenciados en 13%, mucinoso intestinal en 8% y papilar en 5% (Ruemmele, P. et al. 2009). Por otra parte la evidencia asociada a los adenomas del ampulla, indica que éstas últimas participan en el desarrollo de carcinoma del ampulla, como lesiones precursoras, similar al comportamiento observado en las neoplasias colorrectales originadas en un adenoma colorrectal. Además, los pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) presentan un incremento significativo en la incidencia de carcinomas del ampulla (Kadmon, M., et al. 2001).

JUSTIFICACIÓN

El carcinoma del ampulla de Vater es una entidad poco frecuente en comparación con otras neoplasias malignas del tubo digestivo y los tratamientos se encuentran reducidos prácticamente al manejo quirúrgico, sin embargo, es de importancia el conocimiento de la biología molecular implicada en el desarrollo de éstas lesiones y los estudios realizados a éste respecto son escasos.

El conocimiento de los genes asociados a ésta neoplasia es fundamental para la comprensión extensa de los mecanismos moleculares implicados y para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar las características mutacionales en el gen TP53 del carcinoma del ampulla de Vater y su asociación clínica y patológica a partir de la experiencia quirúrgica durante 11 años en el Instituto Nacional de Cancerología.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar los resultados del estado mutacional de TP53 y su asociación con el subtipo histológico en el impacto en la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.
- Determinar las diferencias que pudieran presentarse en el comportamiento biológico del cáncer de ampulla de Vater dependiendo de su tipo histológico y estado mutacional.

- Presentar evidencia científica reciente relacionada a la mutación de p53 en neoplasias malignas del ámpula de Vater.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO

Planteamiento del problema

La evidencia científica que determina la mutación de p53 en carcinomas del ámpula de Vater es limitada, la identificación de las mutaciones en éste gen contribuye a la comprensión de las alteraciones moleculares en ésta neoplasia.

Diseño del estudio

Estudio longitudinal retrospectivo de tipo descriptivo (observacional)

Lugar del estudio

Instituto Nacional de Cancerología México, ubicado en Av. San Fernando # 22 colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, Ciudad de México, México

Universo y Muestra

Se realizó una búsqueda en el archivo clínico del Instituto Nacional de Cancerología encontrando 142 pacientes que se sometieron a pancreatoduodenectomía de enero de 2005 a diciembre de 2016. De estos solo se seleccionaron a los pacientes con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma de ámpula de Vater, una vez obtenidos los expedientes, se revisó que se contará en el archivo del servicio de patología con las laminillas y bloques de tejido fijados en parafina disponibles, al final se contó con un total de 77 pacientes para el análisis estadístico. También se obtuvieron las aprobaciones de la institución antes de realizar el estudio.

La información clínica fue obtenida del expediente electrónico del instituto (INCANET)

y de la revisión de los expedientes físicos, los reportes de patología y las laminillas fueron revisadas por un único patólogo (Dr. Leonardo Saúl Lino Silva). Se estadificarón utilizando la 7^a. Edición de la AJCC. El grado de diferenciación del cáncer se evaluó utilizando los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (bien, moderadamente y poco diferenciado. El estado del margen de resección se determinó utilizando criterios estándar, siendo R0 sin presencia de tumor microscópico, R1 presencia de células tumorales en los márgenes de resección y R2 cuando durante la cirugía había presencia de tumor macroscópico posterior a la resección.

Extracción de ADN. La extracción de ADN de los tejidos se realizó utilizando el kit comercial de Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE (Cat. 80234) siguiendo las especificaciones del proveedor.

De cada muestra embebida en parafina se utilizaron 4 cortes de 5 µm para la extracción de ADN. Los tejidos se desparafinarón utilizando una solución comercial marca Qiagen (Desparaffinization Solution 1069589) como a continuación se describe.

Se añadieron 320 µl de solución de desparafinación a los cortes y se mezcló de forma vigorosa durante 10 segundos, se centrifugó brevemente para llevar la muestra al fondo del tubo. Las muestras se incubaron a 56°C durante 3 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente (15-25 °C) y se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante evitando tocar el botón (tejido desparafinado). Los tubos con la muestra se incubaron durante 10 minutos a 37 °C.

El botón se resuspendió en 150 µl de buffer PKD, se añadieron 10 µl de proteinasa K y

mezcló en vortex. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 56°C, durante 3 minutos en hielo y se centrifugaron durante 15 minutos a 13,000 rpm (revoluciones por minuto). El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 180 µl de amortiguador ATL más 40 µl de proteinasa K, se mezcló y se incubó a 56°C por 1 hora.

Posteriormente, las muestras se incubaron por 2 horas a 90°C sin agitación y se centrifugaron a máxima velocidad por 30 segundos. A cada muestra se le adicionaron 200 µl de amortiguador AL, se agitaron con vortex, se adicionaron 200 µl de etanol absoluto y se volvieron a mezclar. Los sobrenadantes se transfirieron a columnas QIAamp MinElute y se centrifugaron a 10 000 rpm durante un minuto. Las columnas se transfirieron a tubos nuevos, se les adicionaron 700 µl de amortiguador AW1 y se centrifugaron durante 15 segundos a 10 000 rpm.

Las columnas se transfirieron a tubos nuevos, se les adicionaron 700 µl de amortiguador AW2 y se volvieron a centrifugar como ya se describió. Las columnas se transfirieron a tubos nuevos, se les adicionaron 700 µL de etanol absoluto y se volvieron a centrifugar como ya se describió. Las columnas se transfirieron a tubos nuevos y con las tapas abiertas se centrifugaron por 5 minutos a máxima velocidad con la finalidad de secar la membrana de las columnas. Las columnas se transfirieron a tubos de 1.5 mL, se adicionaron 50 µl de amortiguador ATE sobre la membrana de la columna y se incubó durante un minuto. Posteriormente, se centrifugaron por un minuto a máxima velocidad para eluir el ADN (Fig. 3).

Cuantificación de las muestras de ADN. Las muestras fueron cuantificadas en un

nanodrop 2000 y se tomaron en cuenta ratios 260/280 entre 1.6 a 2.0 para pureza y de 260/30 entre 1.2 a 1.8. Se realizaron diluciones de las muestras a 18 ng/uL. Para analizar las mutaciones de KRAS por PCR en tiempo real se utilizaron 4.5 µL y para el análisis de los exones 5, 6 y 7 de p53 se utilizaron 9 µL.

PCR punto final para los exones 5, 6 y 7 de p53. Para la búsqueda de mutaciones de TP53 primero se realizó la estandarización de los primers para PCR punto final utilizando dos muestras de ADN genómico no degradado de controles positivos.

Se utilizó una master mix de Qiagen en un volumen final de 25 uL. Se utilizaron 160 ng de DNA genómico. Se utilizaron primers para el exón 5 y 6 con un producto de amplificación de 506 pb. Y primers para el exón 7 con un producto de amplificación de 293 pb.

Se utilizó una PCR touchdown con los siguientes ciclos y temperaturas: 1 hold de 94°C por 3 min; 26 ciclos de: 94°C 20 segundos, 63°C 20 segundos, 72°C 40 segundos; 20 ciclos de: 94°C 20 seg, 50°C 20 segundos, 72°C 30 segundos; y un hold de 72°C 10 minutos. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con SyberGold. Se fotodocumentó y se analizó el número de muestras amplificadas para cada par de primers (Figura 2).

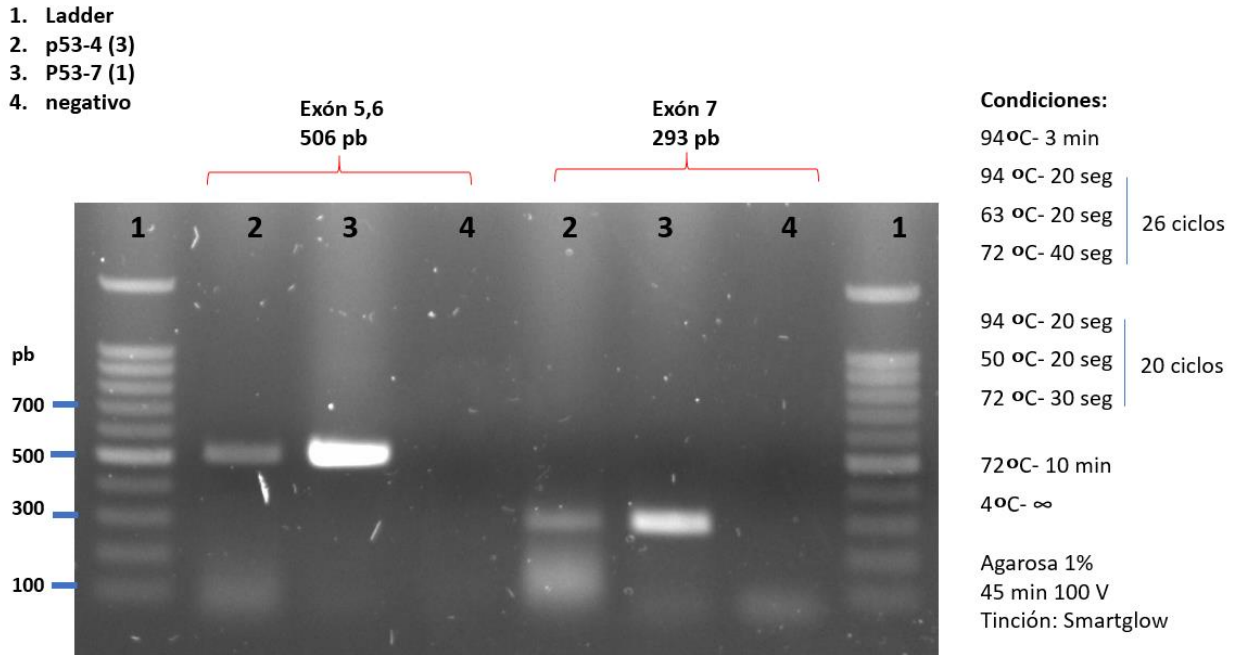


Figura 2. Gel de agarosa con la estandarización de los primers utilizando dos muestras controles positivos.

Secuenciación Sanger. Se seleccionaron las muestras que amplificaron para los exones 5,6 y 7. Los productos de PCR fueron purificados con perlas magnéticas Agentcourt (Beckman Coulter). A los productos de PCR se les adicionaron 42 uL de perlas, se mezclaron con vortex y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en una columna magnética durante 5 minutos y sin retirarlos de ella se separo el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con alcohol al 70% (200 uL) durabte 3 minutos. Después del último lavado se dejo evaporar el alcohol y se adicionaron 20 uL de agua grado biología molecular. Los tubos se retiraron de la columna magnética, se mezclaron con vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Los tubos se colocaron nuevamente en la columna magnética por 5 minutos y el sobrenadante se recuperó en tubos nuevos. Los

productos de PCR se cuantificaron en un nanodrop 2000.

La secuenciación Sanger se realizó utilizando el BigDye Direct Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat.4458687) y el Genetic Analyzer 3730xl (Thermo Fisher). Los amplicones se secuenciaron de acuerdo al protocolo establecido en el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, Cat.4337455). Los productos secuenciados se purificaron con el BigDye XTerminator (Thermo Fisher, Cat. 4376486) antes de ser cargados en el ABI 3730xL DNA Analyzer. Los archivos fueron analizados con el programa ApE (by M. Wayne Davis). Las secuencias se alinearon con la secuencia de referencia para el exón 5, 6 y 7 con el programa ApE.

Ensamble de las secuencias. Las secuencias de ambas hebras de los exones 5, 6 y 7 del gen p53 se analizaron, editaron y ensamblaron usando BioEdit versión 7.0.5 para crear una secuencia consenso. La secuencia consenso se comparó con las depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), empleando la herramienta BLASTN 2.2.19, para verificar que la secuencia pertenece a la muestra (es decir, verificar una contaminación potencial) y que la secuencia este en 5'-3'.

Búsqueda de mutaciones. Para la búsqueda de las mutaciones la secuencias consenso se compilaron en un archivo hasta junto con la secuencia de referencia proporcionada por la Dra. Silvia Vidal y se alineo con el profile mode del Clustal W 1.8.1, incluido en el programa BioEdit versión 7.0.5, el alineamiento final se afino “a ojo” (muestra por muestra) donde se encontraron Mutaciones en Jurkat para los exones 6 y 7 en los codones: 196, 256, 259 y 260 reportadas previamente por Snow K. et al.

Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años de edad
- Expediente completo al momento de la recolección de datos
- Sometidos a pancreatoduodenectomía (Whipple) con fines curativos
- Reporte histopatológico con diagnóstico confirmado de carcinoma de ampulla de Vater

Criterios de exclusión:

- Menores de 18 años
- Pacientes con tratamiento Neoadyuvante (QT ó RT)
- Tratados fuera del Instituto Nacional de Cancerología

Definición, clasificación y operacionalización de variables

Variable Independiente:

Cárcinoma de ampulla de Vater: Tumor originado en la confluencia del conducto pancreático común y conducto colédoco a nivel de la segunda porción del duodeno.

Estándar de oro: Confirmación histológica de carcinoma de ampulla de Vater de cualquier subtipo histológico de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Yachida, S., et al. 2016).

Variables Dependientes: Ver Tabla 1.

Tabla 1. Variables dependientes del estudio

Edad	Cualitativa nominal	Menor de 60 años – 60 años o mas
Sexo	Cualitativa nominal	Masculino, Femenino
Síntoma principal	Cualitativa nominal	Ninguno, dolor, anorexia, STD, ictericia
Método diagnóstico	Cualitativa nominal	Tomografía, CPRE, USGE, Resonancia
Ca preoperatorio	19.9 Cuantitativa continua	
Peso	Cuantitativa continua	
IMC	Cuantitativa continua	
Albumina basal	Cuantitativa continua	
Hemoglobina basal	Cuantitativa continua	
pT	Cualitativa ordinal	pT1, pT2, pT3, pT4
pN	Cualitativa ordinal	pN0, pN0
Tipo de resección	Cualitativa ordinal	R0, R1, R2

Estadio Clínico	Cualitativa ordinal	IA, IB, IIA, IIB, III
Permeación Linfovascular	Cualitativa nominal	Si, No
Invasión perineural	Cualitativa nominal	Si, No
Subtipo histológico	Cualitativa nominal	Intestinal, pancreatobiliar, mixto
Grado histológico	Cualitativa nominal	Bien, moderado, poco diferenciado
Adyuvancia	Cualitativa nominal	Si, No
Tipo de adyuvancia	Cualitativa nominal	QT, RT, QT/RT
Seguimiento	Cualitativa discreta	Meses
Recurrencia	Cualitativa nominal	Si, No
Sitio de recurrencia	Cualitativa ordinal	Local, regional, distancia
Tratamiento recurrencia	Cualitativa nominal	QT, RT, QT/RT, cirugía
Supervivencia global	Cualitativa discreta	Meses
Supervivencia libre de enfermedad	Cualitativa discreta	Meses
TP53 mutado	Cualitativa nominal	Si, No

Estado actual	Cualitativa ordinal	Vivo, muerto
----------------------	---------------------	--------------

STD, Sangrado de tubo digestivo; CPRE, colangiopancreatografía retrograda endoscópica; USGE, ultrasonido endoscópico; QT, quimioterapia; RT, radioterapia; IMC, Índice de Masa Corporal.

Procesamiento de la Información

Se revisaron expedientes físicos y electrónicos de los pacientes incluidos, obteniendo los datos de cada variable para formar una base de 77 pacientes. Con esta información se desarrollaron curvas de supervivencia, análisis univariado y multivariado.

Las curvas de supervivencia fueron calculadas mediante el método de Kaplan Meier. Los posibles factores pronóstico fueron evaluados por log-rank test. El análisis multivariado se realizó con el programa SPSS versión 23.

Aspectos éticos de la investigación

La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes.

Según la declaración de Helsinki, la investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica. La investigación médica debe ser

llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de desarrollar una propuesta de investigación médica. La investigación se realizó tomando en cuenta la declaración de Helsinki y todos los aspectos éticos que demanda la investigación médica, considerando siempre que la elaboración de guías de práctica clínica constituye una base para encontrar solución a problemas clínicos en los pacientes.

La realización de éste trabajo experimental se elaboró con base a lo establecido en el artículo tercero de la Ley General de Salud que habla sobre la investigación para la salud y que comprende acciones para establecer conocimientos en materia de práctica clínica, prevención, control de los problemas de salud y generación de conocimientos para los métodos que se recomienden en la prestación de los servicios de salud.

De acuerdo a la Secretaría de Salud y de su reglamento de la Ley General de Salud en su título segundo, de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos en su artículo Núm 17, esta investigación se considera como de riesgo mínimo para la cual no se requirió de la firma de consentimiento informado

CAPÍTULO II. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Resultados

De las 77 muestras en donde se realizó PCR para los exones 5 y 6 solamente 45 amplificaron, en cuanto al exón 7, 60 muestras lograron amplificar.

En cuanto a las mutaciones puntuales en los exones 5, 6 y 7 de TP53 se lograron documentar 4 sitios mutados en los codones 196, 256, 259 y 260 de ellas 3 mutaciones sin

sentido, que codificaban a un cambio de aminoácido y una mutación de delección que conducía a un codón de parada. Todas estas mutaciones no se encontraron en ninguno de los estudios previos donde se documentaba mutaciones de TP53 (Tabla 2), pero se encontró una concordancia de estas mutaciones en una línea celular inmortalizada de linfocitos T, obtenida de la sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoide aguda, la cual fue establecida a finales de los años 70 conocida como células de Jurkat (Schneider, U., et al 1977).

Tabla 2. Mutaciones de p53 en diferentes estudios

	Codon	Cambio nucleotido	de	Cambio AA	de
Scarpa, A., et al	245	GGC a GAC		Gly > Asp	
1993.					
	220	TAT a TGT		Tyr > Cys	
	179	CAT a TAT		His > Tyr	
	219	CCC a del C		Stop 246	
	173	GTG a ATG		Val > Met	
	209	AGA a del AG		Stop 214	

Imai, Y., et al 1997.	146	TGG a TAG	Try > Stop
	166	TCA a TAA	Ser > Stop
	189	GCC a GTC	Ala > Val
	213	CGA a TGA	Arg > Stop
	292	AAA a AAG	Silent
Suto, T., et al 2000.	147	GTT a GGT	Val > Gly
	157	GTC a GAC	Val > Asp
	158	CGC a CAC	Arg > Tyr
	175	CGC a CAC	Arg > His
	212	CGA a TGA	Arg > Stop
	229	TDT a TGA	Cys > Stop
	239	AAC a GAC	Asn > Asp
	242	TGC a TGG	Cys > Trp
	248	CGG a TGG	Arg > Trp
	265	CTG a ATG	Leu > Met

Discusión

El daño al DNA afecta la integridad de la información genética contenida en la célula. En respuesta a éste peligro, las células han desarrollado mecanismos sofisticados de defensa encargados de preservar la integridad del DNA (Speidel, D., et al. 2015). El cáncer es una enfermedad multifactorial con un importante componente genético que puede requerir décadas para acumular mutaciones genéticas que activen oncogenes e inactiven genes supresores de tumor. Uno de los genes supresores de tumor más importantes es p53, encargado de monitorear el daño al DNA y las alteraciones en otros procesos celulares metabólicos; induciendo una pausa en el ciclo celular con la subsecuente reparación del DNA, senescencia o apoptosis, dependiendo de la magnitud del daño al genoma. En caso de disfunción de p53, algunos daños al DNA no son corregidos, ocasionando inestabilidad genómica, una característica del cáncer. Más del 50% de los pacientes con cáncer presentan una mutación somática del gen de p53 (Hong, B., et al. 2014).

Desde 1990, el rol de p53 en el desarrollo del cáncer se ha considerado de manera consistente como “supresor de tumor”. Sin embargo, una década antes, después de su descubrimiento en 1970, éste se percibía como un oncogén. En la última década, ha quedado claro que la mutación del gen TP53 durante el desarrollo de cáncer, no simplemente resulta en la ablación de la actividad supresora de tumor del gen de tipo silvestre, sino que la mutación adquirida del gen TP53 puede dar lugar a proteínas que si

cumplan la función de oncogenes, incluso la proteína mutada de p53 puede sobreexpresarse en sus diferentes variantes en los propios tumores (Meek, D.W. 2015; Hong, B., et al. 2014). Los estudios iniciales de la función de p53 como supresor tumoral, están basados en ensayos celulares in vitro, sin embargo los estudios in vivo más recientes y complejos, han identificado varios mecanismos de control de p53. La acumulación y activación de p53 se encuentran reguladas por un intrincado patrón de modificaciones pos-traslacionales, incluidas la fosforilación, acetilación, metilación, glicosilación, ubiquitinización, SUMOilación y NEDDilación. (Chao, C.C.-K. 2015).

LITERATURA CITADA

- Chao, C.C-K. Mechanisms of p53 degradation. *Clinica Chimica Acta* 2015; 438: 139–147.
- Croce, C.M. Oncogenes and cáncer. *N Eng J Med* 2008; 358: 502-11.
- Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
- Hong, B., Van den Heuvel, A.P.J., Prabhu, V.V., Zhang, S. y W.S. El-Deiry. Targeting tumor suppressor p53 for cáncer therapy: Strategies, Challenges and Oportunities. *Current Drug Targets* 2014; 15: 80-89.
- Imai, Y., Oda, H., Tsurutani, N., Nakatsuru, Y., Inoue, T. y T. Ishikawa. Frequent somatic mutations of the APC and p53 genes in sporadic ampullary carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88(9):846-54.
- Intlekofer, A.M. y C.B. Thompson. Preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2013; 94: 1-15.
- Kadmon, M., Tandara, A. y C. Herfarth. Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis coli. A review of the literature and results from the Heidelberg Polyposis Register. *Int J Colorectal Dis.* 2001;16(2):63.
- Kim, T.U., Kim, S., Lee, J.W., Woo, S.K., Lee, T.H., Choo, K.S., Kim, C.W., Kim, G.H. y D.H. Kang. Ampulla of Vater: Comprehensive anatomy, MR imaging of pathologic conditions, and correlation with endoscopy. *European Journal of Radiology* 2008; 66: 48-64.

- Malkin, D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2011; 2(4):475.
- Meek, D.W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* 2015; 469, 325–346.
- Ruemmele, P., Dietmaier, W., Terracciano, L., Tornillo, L., Bataille, F., Kaiser, A., Wuensch, P.H., Heinmoeller, E., Homayounfar, K., Luettgies, J., Kloepfel, G., Sessa, F., Edmonston, T.B., Schneider-Stock, R., Klinkhammer-Schalke, M., Pauer, A., Schick, S., Hofstaedter, F., Baumhoer, D. y A. Hartmann. Histopathologic features and microsatellite instability of cancers of the papilla of Vater and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(5):691.
- Saraggi, D., Galuppini, F., Remo, A., Urso, E.D.L., Bachin, D., Salmaso, R., Lanza, C., Bao, R.Q., Fanelli, G.N, Guzzardo, V., Luchini, C., Scarpa, M., Farinati, F., Fassan, M. y M. Rugge. PD-1 overexpression in ampulla of Vater carcinoma and its pre-invasive lesions. *Histopathology* 2017; 71: 470-474.
- Scarpa, A., Capelli, P., Zamboni, G., Oda, T., Mukai, K. y F. Bonetti. Neoplasia of the ampulla of Vater, K-ras and p53 mutations. *Am J Pathol* 1993 142(4):1163–1172.
- Schneider, U., Schwenk, H., y G. Bornkamm. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 1977; 19(5): 621-6.
- Snow, K. y W. Judd. Heterogeneity of a human T-lymphoblastoid cell line. *Exp Cell Res.* 1987;171(2):389-403.

Speidel, D. The role of DNA damage responses in p53 biology. Arch Toxicol 2015; 89:501 – 517.

Suto, T., Habano, W., Sugai, T., Uesugi, N., Funato, O., Kanno, S., Saito, K. y S. Nakamura. Aberrations of the K-ras, p53, and APC genes in extrahepatic bile duct cancer. J Surg Oncol. 2000; 73(3):158-63.

Sweis, R.F. y J.J. Luke. Mechanistic and pharmacologic insights on immune checkpoint inhibitors. Pharmacological research 2017; 120: 1-9.

Talamini, M.A., Moesinger, R.C., Pitt, H.A., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Lillemoe, K.D., Yeo, C.J. y J.L. Cameron. Adenocarcinoma of the ampulla of Vater. A 28-year experience. Ann Surg. 1997; 225(5):590.

Yachida, S., Wood, L.D., Suzuki M, et al. Genomic sequencing identifies ELF3 as a driver of ampullary carcinoma. Cancer cell. 2016;29(2):229-240.