



Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Patologia

**IDENTIFICACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN
EN EL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS.
IMPLICACIONES CLÍNICAS.**

Memoria que, para aspirar al grado de Doctor
en Medicina y Cirugía presenta:

María del Carmen Gómez Mateo

Dirigida por:

Antonio Ferrández Izquierdo
Luis Sabater Ortí
Felipe Javier Chaves Martínez

AGRADECIMIENTOS

Mención especial requieren mis tres directores de tesis, los doctores Antonio Ferrández, Luis Sabater y Javier Chávez, por otorgarme la posibilidad de participar con ellos en este proyecto, compartir sus conocimientos y por supuesto, por su apoyo en la realización de esta tesis.

A Rebeca, por su gran ayuda en este trabajo y su grata compañía en las largas sesiones de microdissección.

A Ana Bárbara por su excelente trabajo de biología molecular y bioestadística.

A Cristina y Alejo por su apoyo técnico y al profesor Miguel Cerdá por su inestimable colaboración y disponibilidad en el uso del microdisector láser.

A todos mis adjuntos (Amparo, Sam, Carlos, Pilar, M^a Ángeles y Octavio) por el tiempo dedicado y la ayuda que me han ofrecido y que me siguen ofreciendo.

A Luis por ser un cirujano excelente, defensor de los patólogos y un gran amigo.

A Antonio en especial, no sólo como director de esta tesis, sino como jefe, adjunto, compañero y amigo, por enseñarme todo lo que se de Anatomía Patológica.

A mis compañeros de trabajo por su apoyo diario y paciencia, a mi familia y mis amigos por su ayuda y ánimo.

*“No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles,
pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas”*

Cartas de Séneca a Lucilio, Carta XXII

ABREVIATURAS

- 5-FU: 5-fluoracilo
- ACD: adenocarcinoma ductal
- ACDP: adenocarcinoma ductal de páncreas
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
- ADOAC: catarata y atrofia óptica autosómica dominante
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- CCR: cáncer colorrectal
- CDK: cinasas dependientes de ciclinas
- CPNM: carcinoma pulmón no microcítico
- CSCs: *cancer stem cells* o células madre tumorales
- DPC: duodenopancreatectomía cefálica
- ECM: matriz extracelular
- EUS: ultrasonografía endoscópica
- EUS-PAAF: punción aspiración con aguja fina guiada por EUS
- FA: anemia de Fanconi
- FAMMM: síndrome familiar del melanoma y nevus atípicos múltiples
- FDA: U.S. Food and Drug Administration
- HNF: factor nuclear hepatocitario
- HNPCC: cáncer de colon hereditario no-polipósico.
- HSAN IIB: neuropatía autonómica y sensorial hereditaria de tipo IIB
- IHQ: inmunohistoquímica
- IPMN: neoplasia mucinosa papilar intraductal
- LMA: leucemia mieloide aguda
- LMD: microdissección láser

- LNR: “*lymph node ratio*” o relación ganglionar linfática
- MCN: neoplasia quística mucinosa
- MMPs: metaloproteinasas de la matriz
- MODY1: *maturity-onset diabetes of the young*, tipo 1
- MSI: inestabilidad de microsatélites
- NGS: *next-generation sequencing*
- PAAF: punción aspiración con aguja fina
- PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática
- PC: pancreatitis crónica
- PET: tomografía por emisión de positrones
- PSC: células pancreáticas estrelladas
- RNM: resonancia nuclear magnética
- SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica
- SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
- TCM: tomografía computarizada multicorte
- TNM: sistema de estadiaje de los tumores malignos (T: tamaño del tumor ; N: afectación o no de los ganglios linfáticos regionales ; M: presencia o no de metástasis a distancia)
- UV: ultravioleta

GENES Y PROTEÍNAS

- ABCB9: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9 (TAPL; EST122234)
- ABL2: c-abl oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase (ARG; ABLL)
- ACSL5: acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (ACS2; ACS5; FAAL5)
- ACTG2: actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACT; ACTE; ACTA3; ACTL3; ACTSG)
- AKT1: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT; PKB; RAC; CWS6; PRKBA; PKB-ALPHA; RAC-ALPHA)
- AKT2: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 (PKBB; PRKBB; HIHGHH; PKBBETA; RAC-BETA)
- ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (CD246; NBLST3)
- ALK5: ver también TGFBR1
- AMER1: APC membrane recruitment protein 1 (WTX; OSCS; FAM123B; RP11-403E24.2)
- AML1: ver RUNX1
- ANKS4B: ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B (HARP)
- ANXA1: annexin A1 (ANX1; LPC1)
- ANXA2: annexin A2 (P36; ANX2; LIP2; LPC2; CAL1H; LPC2D; ANX2L4; PAP-IV; HEL-S-270)
- ANXA2P2: annexin A2 pseudogene 2 (LPC2B; ANX2L2; ANX2P2)
- AP2 α : ver TFAP2A
- APC: adenomatous polyposis coli (GS; DP2; DP3; BTPS2; DP2.5; PPP1R46)
- ARID1A: AT rich interactive domain 1A (SWI-like) (ELD; B120; OSA1; P270; hELD; BM029; MRD14; hOSA1; BAF250; C1orf4; BAF250a; SMARCF1)
- ARNTL2: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (CLIF; MOP9; BMAL2; PASD9; bHLHe6)

- ATDC: ver ATM
- ATM: ataxia telangiectasia mutated (AT1; ATA; ATC; ATD; ATE; ATDC; TEL1; TELO1)
- ATP11B: ATPase, class VI, type 11B (ATPIF; ATPIR)
- ATP4A: ATPase, H⁺/K⁺ exchanging, alpha polypeptide
- ATP8A2: ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2 (IB; ATP; ML-1; ATPIB; CAMRQ4)
- AURKA: aurora kinase A (AIK; ARK1; AURA; BTAK; STK6; STK7; STK15; AURORA2; PPP1R47)
- BAD: BCL2-associated agonist of cell death (BBC2; BCL2L8)
- BCL6: B-cell CLL/lymphoma 6 (BCL5; LAZ3; BCL6A; ZNF51; ZBTB27)
- BIRC5: baculoviral IAP repeat containing 5 (API4; EPR-1)
- BMAL2: ver ARNTL2
- BNIP3L: BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (NIX; BNIP3a)
- BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (NS7; BRAF1; RAFB1; B-RAF1)
- BRCA1: breast cancer 1, early onset (IRIS; PSCP; BRCAI; BRCC1; PNCA4; RNF53; BROVCA1; PPP1R53)
- BRCA2: breast cancer 2, early onset (FAD; FACD; FAD1; GLM3; BRCC2; FANCB; FANCD; PNCA2; FANCD1; BROVCA2)
- C12ORF36: ver ACSL5
- C1QB: complement component 1, q subcomponent, B chain
- C22ORF40: ver CDPF1
- C4BPB: complement component 4 binding protein, beta (C4BP)
- CA9: carbonic anhydrase IX (MN; CAIX)
- CASP8: caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase (CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; Casp-8)
- CASP9: caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase (MCH6; APAF3; APAF-3; PPP1R56; ICE-LAP6)

- CCDC93: coiled-coil domain containing 93
- CCK: cholecystokinin
- CCKBR: cholecystokinin B receptor (GASR; CCK-B; CCK2R)
- CCL24: chemokine (C-C motif) ligand 24 (Ckb-6; MPIF2; MPIF-2; SCYA24)
- CCNC: cyclin C (CycC)
- CCND1: cyclin D1 (BCL1; PRAD1; U21B31; D11S287E)
- CD24: CD24 molecule (CD24A)
- CD44: CD44 molecule (Indian blood group) (IN; LHR; MC56; MDU2; MDU3; MIC4; Pgp1; CDW44; CSPG8; HCELL; HUTCH-I; ECMR-III)
- CD59: CD59 molecule, complement regulatory protein (1F5; EJ16; EJ30; EL32; G344; MIN1; MIN2; MIN3; MIRL; HRF20; MACIF; MEM43; MIC11; MSK21; 16.3A5; HRF-20; MAC-IP; p18-20)
- CD9: CD9 molecule (MIC3; MRP-1; BTCC-1; DRAP-27; TSPAN29; TSPAN-29)
- CDC34 cell division cycle 34 (UBC3; UBCH3; UBE2R1; E2-CDC34)
- CDH17: cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine) (HPT1; CDH16; HPT-1)
- CDK6: cyclin-dependent kinase 6 (PLSTIRE)
- CDKN1A: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21; CIP1; SDI1; WAF1; CAP20; CDKN1; MDA-6; p21CIP1)
- CDKN1B cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27; KIP1; MEN4; CDKN4; MEN1B; P27KIP1)
- CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (ARF; MLM; P14; P16; P19; CMM2; INK4; MTS1; TP16; CDK4I; CDKN2; INK4A; MTS-1; P14ARF; P19ARF; P16INK4; P16INK4A; P16-INK4A)
- CDPF1: cysteine-rich, DPF motif domain containing 1 (C22orf40)
- CEACAM1: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein) (BGP; BGP1; BGPI)
- CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7) (CF; MRP7; ABC35; ABCC7; CFTR;MRP; TNR-CFTR; dJ760C5.1)
- CIP1: ver también CDKN1A

- CISH: cytokine inducible SH2-containing protein (CIS; G18; SOCS; CIS-1; BACTS2)
- CK7: ver KRT7
- CKS2: CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (CKSHS2)
- CLDN1: claudin 1 (CLD1; SEMP1; ILVASC)
- CLEC4F: C-type lectin domain family 4, member F (KCLR; CLECSF13)
- c-Myc: ver MYC
- CNN1: calponin 1, basic, smooth muscle (SMCC; Sm-Calp; HEL-S-14)
- COL11A1: collagen, type XI, alpha 1 (STL2; COLL6; CO11A1)
- COL1A1: collagen, type I, alpha 1 (OI4)
- COL1A2: collagen, type I, alpha 2 (OI4)
- COL6A2: collagen, type VI, alpha 2 (PP3610)
- Connexin 26: ver GJB2
- COX1: ver PTGS1
- COX2: ver PTGS2
- CSF2RA: colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage) (GMR; CD116; CSF2R; SMDP4; CDw116; CSF2RX; CSF2RY; GMCSFR; CSF2RAX; CSF2RAY; GM-CSF-R-alpha)
- CTBS: chitobiase, di-N-acetyl- (CTB)
- CTNNB1: catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB; MRD19; armadillo)
- CXCL12: chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (IRH; PBSF; SDF1; TLSF; TPAR1; SCYB12)
- CXCR4: chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (FB22; HM89; LAP3; LCR1; NPYR; WHIM; CD184; LESTR; NPY3R; NPYRL; HSY3RR; NPYY3R; D2S201E)
- Cyclin C: ver CCNC
- Cyclin D1: ver CCND1
- CYP2B7P1: cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7, pseudogene (CYP2B; CYP2B7; CYP2B7P1)

- DCUN1D3: DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 3 (44M2.4)
- DDX47: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47 (RRP3; E4-DBP; HQ0256; MSTP162)
- DEGS1: delta(4)-desaturase, sphingolipid 1 (MLD; DEGS; DES1; Des-1; FADS7; MIG15; DEGS-1)
- DHPS: deoxyhypusine synthase (DS; DHS; MIG13)
- DHRS12: dehydrogenase/reductase (SDR family) member 12 (SDR40C1)
- DKFZP686I15217: ver LINC01011
- DLL1: delta-like 1 (Drosophila) (DL1; Delta; DELTA1)
- DLL3: delta-like 3 (Drosophila) (SCDO1)
- DLL4: delta-like 4 (Drosophila) (hdelta2)
- DNMBP-AS1: DNMBP antisense RNA 1 (bA287G8.2; NCRNA00093)
- DOK7: docking protein 7 (CMS1B; C4orf25)
- DPC4: ver SMAD4
- E2-CDC34: ver CDC34
- E2F1: E2F transcription factor 1 (RBP3; E2F-1; RBAP1; RBBP3)
- EDEM3: ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3 (C1orf22)
- EGF: epidermal growth factor (URG; HOMG4)
- EGFR: epidermal growth factor receptor (ERBB; HER1; mENA; ERBB1; PIG61)
- EIF2AK1: eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1 (HCR; HRI)
- EIF3A: eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A (EIF3; P167; p180; p185; TIF32; EIF3S10; eIF3-p170; eIF3-theta)
- EIF4E2: eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2 (4EHP; IF4e; 4E-LP; EIF4EL3)
- EIF4EL3: ver EIF4E2
- ENO2: enolase 2 (gamma, neuronal) (NSE; HEL-S-279)

- EPHB2: EPH receptor B2 (DRT; EK5; ERK; CAPB; Hek5; PCBC; EPHT3; Tyro5)
- ERBB1: ver EGFR
- ERBB2: v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (NEU; NGL; HER2; TKR1; CD340; HER-2; MLN 19; HER-2;neu)
- ERBB3: v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (HER3; LCCS2; ErbB-3; c-erbB3; erbB3-S; MDA-BF-1; c-erbB-3; p180-ErbB3; p45-sErbB3; p85-sErbB3)
- ERBB4: v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (HER4; ALS19; p180erbB4)
- ERK: ver EPHB2
- ERN1: endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (IRE1; IRE1P; IRE1a; hIRE1p)
- ETS1: v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1(ETS-1; EWSR2)
- ETS2: v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (ETS2IT1)
- F2R: coagulation factor II (thrombin) receptor (TR; HTR; CF2R; PAR1; PAR-1)
- FAK: ver PTK2
- FAM123B: ver AMER1
- FAM134B: family with sequence similarity 134, member B (JK1; JK-1)
- FANCA: Fanconi anemia, complementation group A (BRCA2)
- FANCB : Fanconi anemia, complementation group B (BRCA2)
- FANCC : Fanconi anemia, complementation group C (BRCA2)
- FANCD1: Fanconi anemia, complementation group D1 (BRCA2)
- FANCD2 : Fanconi anemia, complementation group D2 (BRCA2)
- FANCE : Fanconi anemia, complementation group E (BRCA2)
- FANCF : Fanconi anemia, complementation group F (BRCA2)
- FANCG: Fanconi anemia, complementation group G (BRCA2)
- FLJ10996: ver CCDC93

- FLOT2: flotillin 2 (ESA; ECS1; ESA1; ECS-1; M17S1)
- FOS B: ver FOS
- FOS: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (p55; AP-1; C-FOS)
- FOXA1: forkhead box A1 (HNF3A; TCF3A)
- FOXD2-AS1: FOXD2 antisense RNA 1 (head to head)
- FOXD4: forkhead box D4 (FKHL9; FOXD4A; FREAC5; FREAC-5)
- FOXL1: forkhead box L1 (FKH6; FKHL11; FREAC7)
- FOXM1: forkhead box M1 (MPP2; TGT3; HFH11; HNF-3; INS-1; MPP-2; PIG29; FKHL16; FOXM1B; HFH-11; TRIDENT; MPHOSPH2)
- FOXP3: forkhead box P3 (JM2; AIID; IPEX; PIDX; XPID; DIETER)
- FSCN1: fascin actin-bundling protein 1 (HSN; SNL; p55; FAN1)
- GABRA2: gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2
- GABRE: gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, épsilon
- GADD45A: growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (DDIT1; GADD45)
- GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD; GAPD; HEL-S-162eP)
- GAST: gastrin (GAS)
- GATA3: GATA binding protein 3 (HDR; HDRS)
- GATA6: GATA binding protein-6
- GJB2: gap junction protein, beta 2, 26kDa (HID; KID; PPK; CX26; DFNA3; DFNB1; NSRD1; DFNA3A; DFNB1A)
- GLG1: golgi glycoprotein 1 (CFR-1; ESL-1; MG160; MG-160; RP11-252A24.7)
- GPR177: ver WLS
- GSG1: germ cell associated 1
- GSTA1: glutathione S-transferase alpha 1 (GST2; GTH1; GSTA1-1)
- GUCA2A: guanylate cyclase activator 2A (guanylin) (GUCA2; STARA; GCAP-I)

- GZMA: granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3) (HFSP; CTLA3)
- HER1: ver EGFR
- HER2: ver ERBB2
- HER3: ver ERBB3
- HER4: ver ERBB4
- HGF: hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor) (SF; HGFB; HPTA; F-TCF; DFNB39)
- HIF1: ver HIF1A
- HIF1A: hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1; MOP1; PASD8; HIF-1A; bHLHe78; HIF-1alpha; HIF1-ALPHA)
- HIP/PAP: ver REG3A
- HLA-DPB1: major histocompatibility complex, class II, DP beta 1 (DPB1; HLA-DP; HLA-DPB; HLA-DP1B)
- hLKB1: ver STK11
- HMGA1: high mobility group AT-hook 1 (HMG-R; HMGIY; HMGA1A)
- HMGA2: high mobility group AT-hook 2 (BABL; LIPO; HMGIC; HMGI-C; STQTL9)
- HMGI-C: ver HMGA2
- HNF4A: hepatocyte nuclear factor 4, alpha (TCF; HNF4; MODY; MODY1; NR2A1; TCF14; HNF4a7; HNF4a8; HNF4a9; NR2A21; HNF4alpha)
- HNRNPAB: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (ABBP1; HNRPAB)
- HSP27: ver HSPB1
- HSPB1: heat shock 27kDa protein 1 (CMT2F; HMN2B; HSP27; HSP28; Hsp25; SRP27; HS.76067; HEL-S-102)
- IFI27 interferon, alpha-inducible protein 27 (P27; ISG12; FAM14D; ISG12A)
- IFNG: interferon, gamma (IFG; IFI)
- IGF1: insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGFI; IGF-I; IGF1A)
- IGF1R: insulin-like growth factor 1 receptor (IGFR; CD221; IGFIR; JTK13)

- IHPK3: ver IP6K3
- IKBKG: inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma (IP; IP1; IP2; FIP3; IPD2; NEMO; FIP-3; Fip3p; AMCBX1; ZC2HC9; IKK-gamma)
- IL13: interleukin 13 (P600; IL-13)
- IL-6: interleukin 6 (interferon, beta 2) (HGF; HSF; BSF2; IL-6; IFNB2)
- IL-8: interleukin 8 (NAF; GCP1; LECT; LUCT; NAP1; CXCL8; GCP-1; LYNAP; MDNCF; MONAP; NAP-1)
- INK4: ver CDKN2A
- IP6K3: inositol hexakisphosphate kinase 3 (IHPK3; INSP6K3)
- ITGBL1: integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) (OSCP; TIED)
- JAG1: jagged 1 (AGS; AHD; AWS; HJ1; CD339; JAGL1)
- JAG2: jagged 2 (HJ2; SER2)
- JAK1: Janus kinase 1 (JTK3; JAK1A; JAK1B)
- JMJD4: jumonji domain containing 4
- JUP: junction plakoglobin (DP3; PDGB; PKGB; CTNNG; DPIII; ARVD12)
- KDM1A: lysine (K)-specific demethylase 1A (AOF2; KDM1; LSD1; BHC110)
- Keratin 7: ver KRT7
- KIAA0513: KIAA0513
- KIF20A: kinesin family member 20A (MKLP2; RAB6KIFL)
- KIP1: ver CDKN1A
- KLF6: Kruppel-like factor 6 (GBF; ZF9; BCD1; CBA1; CPBP; PAC1; ST12; COPEB)
- KPRP: keratinocyte proline-rich protein (C1orf45)
- KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (NS; NS3; CFC2; KRAS1; KRAS2; RASK2; KI-RAS; C-K-RAS; K-RAS2A; K-RAS2B; K-RAS4A; K-RAS4B)
- KRT7: keratin 7 (K7; CK7; SCL; K2C7)
- KYNU: kynureninase

- LAMC2 : laminin, gamma 2 (B2T; CSF; EBR2; BM600; EBR2A; LAMB2T; LAMNB2)
- LI-cadherin: ver CDH17
- LINC01011: long intergenic non-protein coding RNA 1011
- LKB1: ver STK11
- LMNB1: lamin B 1 (LMN; ADLD; LMN2; LMNB)
- LOC650293: seven transmembrane helix receptor
- LRRC14: leucine rich repeat containing 14 (LRRC14A)
- LRRC23: leucine rich repeat containing 23 (LRPB7)
- LSD1: ver KDM1A
- MAP2K1: mitogen-activated protein kinase kinase 1 (CFC3; MEK1; MKK1; MAPKK1; PRKMK1)
- MAP4K4: mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 (HGK; NIK; MEKKK4; FLH21957; HEL-S-31)
- MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1 (ERK; p38; p40; p41; ERK2; ERT1; ERK-2; MAPK2; PRKM1; PRKM2; P42MAPK; p41mapk; p42-MAPK)
- Maspin: ver SERPINB5
- MBOAT2: membrane bound O-acyltransferase domain containing 2 (OACT2; LPCAT4)
- MCAM: melanoma cell adhesion molecule (CD146; MUC18)
- MEK1: ver MAP2K1
- Mesothelin: MSLN
- MEST: mesoderm specific transcript (PEG1)
- MET: met proto-oncogene (HGFR; AUTS9; RCCP2; c-Met)
- MFI2: antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5 (MTF1; CD228; MAP97)
- MGC12982: ver FOXD2-AS1
- MLH1: mutL homolog 1 (FCC2; COCA2; HNPCC; hMLH1; HNPCC2)
- MMP11: matrix metallopeptidase 11 (stromelysin 3) (ST3; SL-3; STMY3)

- MMP14: matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP-14; MMP-X1; MT-MMP; MT1MMP; MTMMP1; WNCHRS; MT1-MMP; MT-MMP 1)
- MMP2: matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) (CLG4; MONA; CLG4A; TBE-1; MMP-II)
- MMP7: matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP-7; MPSL1; PUMP-1)
- MMP9: matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) (GELB; CLG4B; MMP-9; MANDP2)
- MPZL3: myelin protein zero-like 3
- MSH2: mutS homolog 2 (FCC1; COCA1; HNPCC; LCFS2; HNPCC1)
- MSH6: mutS homolog 6 (GTBP; HSAP; p160; GTMBP; HNPCC5)
- MSLN: mesothelin (MPF; SMRP)
- MT3: metallothionein 3 (GIF; GIFB; GRIF; ZnMT3)
- MTHFD2: methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (NMDMC)
- MTOR: mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) (FRAP; FRAP1; FRAP2; RAFT1; RAPT1)
- MUC17: mucin 17, cell surface associated (MUC3)
- MUC18: ver MCAM
- MUC4: mucin 4, cell surface associated (ASGP; MUC-4; HSA276359)
- MUC5B: mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming (MG1; MUC5; MUC9; MUC-5B)
- MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MRTL; MYCC; c-Myc; bHLHe39)
- MYH11: myosin, heavy chain 11, smooth muscle (AAT4; FAA4; SMHC; SMMHC)
- MYLK: myosin light chain kinase (KRP; AAT7; MLCK; MLCK1; MYLK1; smMLCK; MLCK108; MLCK210; MSTP083)
- NCRNA00093: ver DNMBP-AS1
- NDKA: ver NME1

- NEDD5: ver SEPT2
- NEMO: ver IKBKG
- NFkB1: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p50; KBF1; p105; EBP-1; NF-kB1; NFkB-p50; NFkappaB; NF-kappaB; NFkB-p105; NF-kappa-B)
- NFkBIZ: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta (IKBZ; INAP; MAIL)
- NME1: NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1 (NB; AWD; NBS; GAAD; NDKA; NM23; NDPKA; NDPK-A; NM23-H1)
- NOTCH1: notch 1 (hN1; TAN1)
- NOTCH2: notch 2 (hN2; AGS2; HJCYS)
- NOTCH3: notch 3 (IMF2; CASIL; CADASIL)
- NOTCH4: notch 4 (INT3; NOTCH3)
- NR4A1: nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (HMR; N10; TR3; NP10; GFRP1; NAK-1; NGFIB; NUR77)
- NSE: ver ENO2
- NUP35: nucleoporin 35kDa (MP44; NP44; MP-44; NUP53)
- OACT2: ver MBOAT2
- OSBPL7: oxysterol binding protein-like 7 (ORP7)
- OSGEP: O-sialoglycoprotein endopeptidase (KAE1; GCPL1; OSGEP1; PRSMG1)
- OXSR1: oxidative stress responsive 1 (OSR1)
- P14: ver SF3B14
- P16: ver CDKN2A
- P16-INK4A: ver CDKN2A
- p185: ver EIF3A
- P21: ver CDKN1A
- P27: ver CDKN1B
- P53: ver TP53

- PAI1: ver SERPINE1
- PAI-1: ver SERPINE1
- PALB2: partner and localizer of BCRA2 (FANCN; PNCA3)
- PALLD: palladin, cytoskeletal associated protein (MYN; PNCA1; CGI151; SIH002; CGI-151)
- PAOX: polyamine oxidase (exo-N4-amino) (PAO)
- PAP1: ver REG3A
- PAR1: ver F2R
- PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
- PDK2: pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2 (PDHK2; PDKII)
- PEPD: peptidase D (PROLIDASE)
- PGS1: phosphatidylglycerophosphate synthase 1
- PHKB: phosphorylase kinase, beta
- PI3K: ver PIK3CA
- PIAS3: protein inhibitor of activated STAT, 3 (ZMIZ5)
- PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (MCM; CWS5; MCAP; PI3K; CLOVE; MCMTC; p110-alpha)
- PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PJS: ver STK11
- PLAT: plasminogen activator, tissue (TPA; T-PA)
- PLAU: plasminogen activator, urokinase (ATF; QPD; UPA; URK; u-PA; BDPLT5)
- PLAUR: plasminogen activator, urokinase receptor (CD87; UPAR; URKR; U-PAR)
- PLEK: pleckstrin (P47)
- PMP22: peripheral myelin protein 22 (DSS; HNPP; CMT1A; CMT1E; GAS-3; Sp110; HMSNIA)
- PMS1: PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (*S. cerevisiae*) (PMSL1; hPMS1; HNPCC3)

- PMS2: PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (*S. cerevisiae*) (PMSL2; HNPCC4; PMS2CL)
- POV1: Prostate cancer overexpressed gene 1
- PPARG: peroxisome proliferator-activated receptor gamma (GLM1; CIMT1; NR1C3; PPARG1; PPARG2; PPARgamma)
- PPFIA2: protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 2
- PPT1: palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT; CLN1; INCL)
- PROM1: prominin 1 (RP41; AC133; CD133; MCDR2; STGD4; CORD12; PROML1; MSTP061)
- PRR16: proline rich 16 (DSC54)
- PRSS1: protease, serine, 1 (trypsin 1) (TRP1; TRY1; TRY4; TRYP1)
- PRSS2: protease, serine, 2 (trypsin 2) (TRY2; TRY8; TRYP2)
- PTEN: phosphatase and tensin homolog (BZS; DEC; CWS1; GLM2; MHAM; TEP1; MMAC1; PTEN1; 10q23del)
- PTGES: prostaglandin E synthase (PGES; MPGES; PIG12; PP102; PP1294; MGST-IV; MGST1L1; TP53I12; mPGES-1; MGST1-L1)
- PTGS1: prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (COX1; COX3; PHS1; PCOX1; PES-1; PGHS1; PTGHS; PGG/HS; PGHS-1)
- PTGS2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (COX2; COX-2; PHS-2; PGG/HS; PGHS-2; hCox-2; GRIPGHS)
- PTK2: protein tyrosine kinase 2 (FAK; FADK; FAK1; FRNK; PPP1R71; p125FAK; pp125FAK)
- PTPN14: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14 (PEZ; PTP36)
- PTTG1: pituitary tumor-transforming 1 (EAP1; PTTG; HPTTG; TUTR1)
- RAB6KIFL: ver KIF20A
- Rabkinesin 6: ver KIF20A
- RAC1: ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) (MIG5; Rac-1; TC-25; p21-Rac1)

- Rad51: RAD51 recombinase (RECA; BRCC5; MRMV2; HRAD51; RAD51A; HsRad51; HsT16930)
- RAF1: v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 (NS5; CRAF; Raf-1; c-Raf)
- RASA1: RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1 (GAP; PKWS; RASA; CMAVM; CM-AVM; RASGAP; p120GAP; p120RASGAP)
- RB1: retinoblastoma 1 (RB; pRb; OSRC; pp110; p105-Rb)
- RBM5: RNA binding motif protein 5 (G15; H37; RMB5; LUCA15)
- REG3A: regenerating islet-derived 3 alpha (HIP; PAP; PAP1; REG3; INGAP; PAP-H; PBCGF; HIP/PAP; REG-III)
- REG3A: regenerating islet-derived 3 alpha (HIP; PAP; PAP1; REG3; INGAP; PAP-H; PBCGF; HIP/PAP; REG-III)
- RGS4: regulator of G-protein signaling 4 (RGP4; SCZD9)
- RHOC: ras homolog family member C (H9; ARH9; ARHC; RHOH9)
- RPL13A: ribosomal protein L13a (L13A; TSTA1)
- RPRD1B: regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1B (CREPT; NET60; C20orf77; dJ1057B20.2)
- RPS9: ribosomal protein S9 (S9)
- RUNX1: runt-related transcription factor 1 (AML1; CBFA2; EVI-1; AMLCR1; PEBP2aB; AML1-EVI-1)
- RUNX1: runt-related transcription factor 1 (AML1; CBFA2; EVI-1; AMLCR1; PEBP2aB; AML1-EVI-1)
- S100A6: S100 calcium binding protein A6 (2A9; PRA; 5B10; CABP; CACY)
- S100P: S100 calcium binding protein P (MIG9)
- SCN5A: sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit (HB1; HB2; HH1; IVF; VF1; HBBD; ICCD; LQT3; SSS1; CDCD2; CMD1E; CMPD2; PFHB1; Nav1.5)
- SDF1: ver CXCL12
- SEPSECS: Sep (O-phosphoserine) tRNA:Sec (selenocysteine) tRNA synthase (LP; SLA; PCH2D; SLA/LP)

- SEPT2: septin 2 (DIFF6; NEDD5; NEDD-5; Pnut13; hNedd5)
- SERPINB5: serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5 (PI5; maspin)
- SERPINE1: serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (PAI; PAI1; PAI-1; PLANH1)
- SERPINH1: serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) (CBP1; CBP2; OI10; gp46; AsTP3; HSP47; FIG14; PPR0M; RA-A47; SERPINH2)
- SF3B14: splicing factor 3B, 14 kDa subunit (P14; Ht006; SAP14; CGI-110; HSPC175; SF3B14a)
- SHH: sonic hedgehog (TPT; HHG1; HLP3; HPE3; SMMCI; TPTPS; MCOPCB5)
- SHROOM2: shroom family member 2 (APXL; HSAPXL)
- SIGLEC11: sialic acid binding Ig-like lectin 11
- SLC16A3: solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 3 (MCT3; MCT4; MCT 3; MCT 4; MCT-3; MCT-4)
- SMAD4: SMAD family member 4 (JIP; DPC4; MADH4; MYHRS)
- SMG7: SMG7 nonsense mediated mRNA decay factor (EST1C; SGA56M; C1orf16)
- SNRPF: small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F (SMF; Sm-F; snRNP-F)
- SOD1: superoxide dismutase 1, soluble (ALS; SOD; ALS1; IPOA; hSod1; HEL-S-44; homodimer)
- SOX9: SRY (sex determining region Y)-box 9 (CMD1; SRA1; CMPD1)
- SPINK1: serine peptidase inhibitor, Kazal type 1 (TCP; PCTT; PSTI; TATI; Spink3)
- SRC: v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (ASV; SRC1; c-SRC; p60-Src)
- SSH1: slingshot protein phosphatase 1 (SSH1L)
- STAT3: signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (APRF; HIES)
- STK11: serine/threonine kinase 11 (PJS;LKB1;hLKB1)

- STK15: ver AURKA
- Survivin: ver BIRC5
- SYTL2: synaptotagmin-like 2 (EXO4; SLP2; SLP2A; SGA72M; CHR11SYT)
- TACSTD2: tumor-associated calcium signal transducer 2 (EGP1; GP50; M1S1; EGP-1; TROP2; GA7331; GA733-1)
- Tapasin: ver TAPBP
- TAPBP: TAP binding protein (tapasin) (TPN; TAPA; TPSN; NGS17)
- TFAP2A: transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha) (AP-2; BOFS; AP2TF; TFAP2; AP-2alpha)
- TGFA: transforming growth factor, alpha (TFGA)
- TGFBI: transforming growth factor, beta 1 (CED; LAP; DPD1; TGFB; TGFbeta)
- TGFBR1: transforming growth factor, beta receptor 1 (AAT5; ALK5; ESS1; MSSE; SKR4; ALK-5; LDS1A; LDS2A; TGFR-1; ACVRLK4)
- TGFBR2: transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) (AAT3; FAA3; MFS2; RIIC; LDS1B; LDS2B; TAAD2; TGFR-2; TGFbeta-RII)
- TIMP1 TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (EPA; EPO; HCI; CLGI; TIMP)
- TM4SF1 transmembrane 4 L six family member 1 (L6; H-L6; M3S1; TAAL6)
- TMC6: transmembrane channel-like 6 (EV1; EVER1; EVIN1; LAK-4P)
- TMEM154: transmembrane protein 154
- TNC: tenascin C (GP; JI; TN; HXB; GMEM; TN-C; DFNA56; 150-225)
- TNF: tumor necrosis factor (DIF; TNFA; TNFSF2; TNF-alpha)
- TOP2A: topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa (TOP2; TP2A)
- TP16: ver CDKN2A
- TP53: tumor protein p53 (P53; BCC7; LFS1; TRP53)
- TPSG1: tryptase gamma 1 (TMT; trpA; PRSS31)
- TRIM14: tripartite motif containing 14
- TRXR1: ver TXNRD1

- TUBB3: tubulin, beta 3 class III (CDCBM; FEOM3; TUBB4; CDCBM1; CFEOM3; beta-4; CFEOM3A)
- TXNRD1: thioredoxin reductase 1 (TR; TR1; TXNR; TRXR1; GRIM-12)
- UGT1A7: UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7 (UDPGT; UGT1G; UGT-1G; UGT1.7; UGT1-07; UDPGT 1-7)
- UPA: ver PLAU
- UPAR: ver PLAU
- USP47: ubiquitin specific peptidase 47 (TRFP)
- VEGF: ver VEGFA
- VEGFA: vascular endothelial growth factor A (VPF; VEGF; MVCD1)
- VHL: von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase (RCA1; VHL1; pVHL; HRCA1)
- VWA2: von Willebrand factor A domain containing 2 (AMACO; NET42; CCSP-2)
- WAF1: ver CDKN1A
- WLS: wntless Wnt ligand secretion mediator (EVI; MRP; GPR177; mig-14; C1orf139)
- WNT: gene family
- WNT1: wingless-type MMTV integration site family, member 1 (INT1; OI15; BMND16)
- WNT5A wingless-type MMTV integration site family, member 5A (hWNT5A)
- WWP2: WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (AIP2; WWp2-like)
- XK: X-linked Kx blood group (McLeod syndrome) (KX; NA; NAC; X1k; XKR1; MCLDS)
- XRCC1: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (RCC)
- ZNF599: zinc finger protein 599
- ZSCAN29: zinc finger and SCAN domain containing 29 (ZNF690; Zfp690)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	37
II. ANTECEDENTES.....	41
1. Epidemiología.....	43
2. Etiología y factores de riesgo.....	44
3. Clínica y diagnóstico.....	50
4. Anatomía patológica.....	52
5. Lesiones precursoras.....	53
6. Tratamiento.....	57
7. Biología molecular y perfiles de expresión.....	59
7.1. Definición y tipos de perfiles de expresión.....	61
7.2. Los primeros perfiles de expresión.....	63
7.2.1. <i>Cáncer de mama</i>	63
7.2.2. <i>Cáncer colorrectal</i>	65
7.2.3. <i>Cáncer de pulmón</i>	67
8. Biología molecular del páncreas: estado actual.....	68
8.1. Técnicas de análisis global de genes de expresión.....	72
8.1.1. <i>SAGE</i>	72
8.1.2. <i>ADNc microarrays</i>	73
8.1.3. <i>Arrays de oligonucleótidos</i>	74
8.1.4. <i>Next Generation Sequencing</i>	74
9. Mecanismos moleculares en la patogénesis del cáncer de páncreas.....	75
9.1. Activación de oncogenes.....	77
9.1.1. <i>RAS</i>	77
9.1.2. <i>EGFR</i>	78
9.1.3. <i>NOTCH</i>	80
9.1.4. <i>MET</i>	82

9.1.5. <i>WNT</i>	83
9.1.6. <i>Otros oncogenes</i>	85
9.2. Inactivación de genes supresores de tumor.....	86
9.2.1. <i>P16</i>	86
9.2.2. <i>TP53</i>	88
9.2.3. <i>TGFβ/SMAD4</i>	90
9.2.4. <i>Otros genes supresores de tumores</i>	93
9.3. Otras vías de señalización implicadas en el cáncer de páncreas.....	94
9.3.1. <i>Vía de COX</i>	94
9.3.2. <i>Vía de IGF-IR</i>	95
9.3.3. <i>Vía de SCR</i>	95
9.3.4. <i>Vía de PI3K/AKT</i>	95
9.3.5. <i>Vía de NF-κB</i>	96
9.3.6. <i>Vía de Hedgehog</i>	97
9.3.7. <i>Vía de CXCR4 y su ligando CXCL12</i>	98
9.3.8. <i>Vía de FAK</i>	98
9.3.9. <i>Vía de los receptores de gastrina y colestocinina</i>	99
9.4. Otros mecanismos implicados en la patogénesis del cáncer de páncreas.....	99
9.4.1. <i>Inflamación</i>	99
9.4.2. <i>Telomerasas</i>	100
9.4.3. <i>Angiogénesis</i>	101
9.4.4. <i>Receptores de integrina</i>	101
9.4.5. <i>Metaloproteinasas de la matriz</i>	101
9.4.6. <i>Células madre tumorales</i>	102
III. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	103
IV. OBJETIVOS.....	107

V. MATERIAL Y METODOS.....	111
1. Diseño del estudio.....	113
2. Identificación y selección de pacientes y muestras histológicas.....	113
3. Base de datos de casos.....	114
4. Microdissección láser.....	115
5. Obtención de ARN.....	119
5.1. Comprobación de la degradación del ARN.....	120
5.2. Amplificación del ARN.....	120
6. Análisis mediante microchips.....	122
7. Estudio estadístico.....	123
VI. RESULTADOS.....	125
1. Datos clínicos.....	127
2. Normalización de los resultados.....	129
3. Clustering.....	130
VII. DISCUSION.....	137
1. Aspectos clínicos.....	139
2. Dificultades para la obtención de las muestras de cáncer de páncreas.....	140
2.1. Peculiaridades de las muestras de cáncer de páncreas.....	140
2.2. Muestras de tejido en parafina.....	141
3. Revisión de los perfiles de expresión en el cáncer de páncreas.....	141
3.1. Historia de los perfiles de expresión.....	145
3.2. Microdissección y otros métodos de enriquecimiento celular tumoral.....	147
3.3. Meta-análisis.....	149
3.4. Perfiles de expresión de la pancreatitis crónica.....	151
3.5. Perfiles de expresión en el tejido adyacente.....	152
3.6. Perfiles de expresión en el jugo pancreático.....	152
3.7. Perfiles de expresión en las lesiones precursoras.....	153
3.8. Perfiles de expresión y heterogeneidad del tumor.....	154

3.9. <i>Genes de expresión pronósticas y firmas pronósticas</i>	155
3.10. <i>Predicción de respuesta a la quimioterapia</i>	158
4. Identificación de genes.....	159
4.1. <i>Tenascin C</i>	160
4.2. <i>TFAP2A</i>	162
4.3. <i>Maspin</i>	165
4.4. <i>Genes identificados en otros tumores</i>	166
4.5. <i>Genes relacionados con la angiogénesis</i>	169
4.6. <i>Otros genes de interés</i>	169
5. Diferencias con otros estudios.....	173
VIII. CONCLUSIONES	175
1. Objetivos concretos.....	177
1.1. <i>Caracterización del perfil o perfiles de expresión genética del adenocarcinoma ductal pancreático</i>	177
1.2. <i>Clasificación de los diferentes patrones de expresión obtenidos</i>	178
1.3. <i>Correlación de los patrones con la supervivencia</i>	178
2. Objetivo último.....	179
2.1. <i>Conocimiento de las alteraciones en el adenocarcinoma ductal para la contribución al progreso de la investigación básica y clínica del cáncer de páncreas y la ayuda a mejorar su tratamiento y pronóstico</i>	179
IX. BIBLIOGRAFIA	181

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1: Imagen citológica de un ACDP obtenido mediante EUS-PAAF.....	51
Figura 2: Imagen histológica de los distintos factores pronósticos del ACDP.....	53
Figura 3: Esquema de progresión tumoral del ACDP.....	54
Figura 4: Modelo de progresión del ACDP.....	55
Figura 5: Imagen histológica de distintos grados de PanIN.....	57
Figura 6: Tipos de estudios de perfiles de expresión.....	62
Figura 7: Imagen histológica de un ACDP.....	70
Figura 8: Representación esquemática de las vías implicadas en la patogénesis del ACDP.....	76
Figura 9: Representación esquemática de la vía de señalización RAF-MEK-ERK.....	78
Figura 10: Representación esquemática de la vía de señalización EGFR.....	79
Figura 11: Representación esquemática de la vía de señalización NOTCH.....	81
Figura 12: Representación esquemática de la vía de señalización HGF/MET.....	83
Figura 13: Representación esquemática de las vías de señalización de WNT.....	84
Figura 14: Representación esquemática de la vía de señalización P16.....	87
Figura 15: Representación esquemática de la vía de señalización TP53.....	89
Figura 16: Representación esquemática de la vía de señalización TGF β	90
Figura 17: Representación esquemática de la interacción epitelio-mesénquima.....	92
Figura 18: Representación esquemática de la actividad de p27.....	93
Figura 19: Representación esquemática de la vía de señalización COX.....	94
Figura 20: Representación esquemática de la vía de señalización NF- κ B.....	97
Figura 21: Representación esquemática de la vía de señalización IL-6/JAK/STAT.....	100
Figura 22: Material histológico clasificado.....	114
Figura 23: Diferentes ejemplos de los cortes de parafina teñidos con H-E.....	115
Figura 24: Microscopio disector láser AS-LMD.....	116
Figura 25: Esquema del funcionamiento del microdisector láser.....	116
Figura 26: Corte con un tiempo de secado insuficientemente.....	117
Figura 27: Programa informático del microdisector láser.....	118
Figura 28: Tres ejemplos de casos utilizados para la microdisección.....	118

Figura 29: Material tumoral microdisecado recogido en la tapa del tubo Eppendorf.....	119
Figura 30: Imagen de bioanalizador para control de calidad del ARN.....	121
Figura 31: Imagen del sistema de análisis de Illumina.....	122
Figura 32: Plataforma 15018363_A_WGDASL_HT.....	122
Figura 33: Diagrama del número de casos utilizados.....	127
Figura 34: Intensidades de señal y desviación obtenidas en los chips analizados.....	129
Figura 35: Resultados obtenidos del análisis de microarrays.....	130
Figura 36: Dendograma realizado con 36 muestras en relación a la supervivencia.....	133
Figura 37: Dendograma realizado con los casos en estadio 2B.....	134
Figura 38: Dendograma realizado en relación al status del margen retroperitoneal.....	135
Figura 49: Dendograma realizado en función de la máxima diferencia en la supervivencia....	136

Tablas

Tabla 1: Factores de riesgo para el cáncer de páncreas.....	44
Tabla 2: Síndromes de cáncer hereditario que afectan al páncreas.....	46
Tabla 3: Factores pronósticos del ACDP.....	53
Tabla 4: Criterios para las lesiones precursoras de cáncer o precancerosas.....	56
Tabla 5: Datos clínicos e histológicos de los casos que fueron analizados en el estudio.....	128
Tabla 6: Resultados obtenidos al analizar las muestras en base a la supervivencia.....	131
Tabla 7: Resultados obtenidos al analizar las muestras en estadio 2B según la supervivencia.	131
Tabla 8: Resultados obtenidos al analizar las muestras en base al margen retroperitoneal.....	132
Tabla 9: Resultados obtenidos al analizar las 10 muestras con mayor vs la 10 con menos....	132
Tabla 10: Artículos publicados en Pubmed.....	142
Tabla 11: Estudios publicados en la literatura internacional sobre perfiles de expresión en el ACDP.....	143-144

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma ductal de páncreas (ACDP) es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo occidental¹. El cáncer de páncreas representa el 3% de todas las neoplasias malignas diagnosticadas en EEUU y el 6,2% de todas las muertes por cáncer en 2012 en Europa (78.000 pacientes)².

A pesar de los esfuerzos científicos y el progreso significativo en la comprensión de las bases moleculares del ACDP, la supervivencia no ha cambiado mucho en los últimos 20 años. El pronóstico de estos pacientes continúa siendo insatisfactorio debido al diagnóstico tardío, las bajas tasas de resecabilidad y la resistencia a la quimioterapia. Para mejorar el pronóstico de los pacientes con ACDP son necesarias nuevas estrategias terapéuticas. La profundización en el conocimiento sobre la biología molecular de esta entidad puede tener implicaciones clínicas importantes en la estratificación del riesgo de un paciente, el diagnóstico temprano e incluso el manejo terapéutico.

En el ACDP se han observado distintas alteraciones genéticas que incluyen la afectación de oncogenes y genes supresores como *KRAS*, *HER2*, *P16*, *TP53* y *SMAD4*. La prevalencia de estas alteraciones aumenta según el grado de displasia de las lesiones ductales. Tratamientos cuya diana sean estas anomalías moleculares suponen una gran promesa para el tratamiento del ACDP en un futuro no muy lejano.

II. Antecedentes

II. ANTECEDENTES

1. Epidemiología

El ACDP es el tumor que afecta con mayor frecuencia al páncreas exocrino y es la cuarta causa de muerte por cáncer en ambos sexos en el mundo occidental¹. Supone el 3% de todas las neoplasias malignas diagnosticadas en EEUU y se estima que en el año 2013 habrán sido diagnosticados 45.220 nuevos casos en este país, lo que supondrá la causa de muerte para 38.460 pacientes¹. La tasa de muerte por ACDP en EEUU entre el año 2005 y 2009 fue de 12,5 y 9,5 por 100.000 habitantes (hombres y mujeres respectivamente)¹. En Europa, el cáncer de páncreas supuso el 6,2% de todas las muertes por cáncer de 2012 (78.000 pacientes)² con una tasa de mortalidad prevista de 5,5 mujeres y 8 hombres por 100.000 habitantes³, alcanzando por tanto y al igual que en EEUU la cuarta posición de muertes por cáncer en ambos sexos, tras sobrepasar al cáncer de estómago y de útero en mujeres⁴. La práctica paridad entre incidencia y mortalidad es el fiel reflejo del ominoso pronóstico de este tipo de cáncer. En España se preveen 6.732 nuevos casos de cáncer de páncreas para el año 2015 que supondrán 6.049 muertes⁵.

La media de supervivencia es de aproximadamente 6 meses, con una tasa de supervivencia a los 5 años de aproximadamente el 5%^{4,6}, datos que no han variado sustancialmente en los últimos 25 años (2% en 1975-77 y 4% en 1987-89)⁷. Sólo el 10-15% de los pacientes con ACDP son subsidiarios de una resección quirúrgica

potencialmente curativa, pero incluso en este subgrupo los resultados son pobres, con más de un 80% de recidivas locales o a distancia y una tasa de supervivencia menor del 20% a los 5 años⁸.

A pesar de que el pronóstico general de este tipo de tumor es muy pobre, sí que existen determinados pacientes que presentan una larga supervivencia y una mejor respuesta al tratamiento adyuvante. Estos datos clínicos justifican el esfuerzo de investigación que representa intentar identificar potenciales marcadores biológicos que puedan discriminar el diferente comportamiento y pronóstico de los pacientes, así como plantear un tratamiento más específico dependiendo de sus características.

2. Etiología y factores de riesgo

Los factores de riesgo del cáncer de páncreas son múltiples e incluyen desde el aumento de la edad, el hábito tabáquico, la diabetes mellitus de aparición tardía, la pancreatitis crónica y hereditaria y algunos síndromes de cáncer familiar^{6,9,10}. Estos factores se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores de riesgo para el cáncer de páncreas
▪ Edad
▪ Hábito tabáquico
▪ Pancreatitis crónica
▪ Aumento del índice de masa corporal
▪ Diabetes mellitus de aparición tardía sin otros factores de riesgo de diabetes
▪ Pancreatitis hereditaria
▪ Síndromes de cáncer familiar
▪ Predisposición hereditaria: al menos 2 familiares afectados

Se estima que el **tabaco** aumenta el riesgo de padecer cáncer pancreático hasta en 4 veces más en grandes fumadores comparado con no fumadores¹¹.

La **pancreatitis crónica** (PC) también es reconocida como un factor predisponente del ACDP^{6,9,10}. Este aumento del riesgo se debe en parte a la asociación entre la PC y el consumo de alcohol y tabaco¹², pero también es debido a la inflamación crónica que conlleva la producción de radicales libres relacionados con la ruptura cromosómica, ineficacia de la reparación del ADN e inestabilidad cromosómica¹³. Se requiere un tiempo de entre 10 y 20 años para que se produzca el efecto iniciador del cáncer¹⁴. Sin embargo, tras un seguimiento de 20 años, sólo el 5% de los pacientes con PC desarrollan ACDP¹⁵.

Además se han asociado numerosos factores de la **dieta** como son el consumo elevado de carne roja y bebidas carbonatadas azucaradas, así como la disminución de la ingesta de frutas, vegetales, metionina y folato, aunque los resultados son contradictorios¹⁰. No se ha demostrado asociación entre la ingesta de café o té y el ACDP^{16,17}.

Por otro lado, se ha observado que existe hasta un 10% de cánceres de páncreas que muestran una fuerte predisposición familiar^{18,19}. Esto puede ocurrir en 3 situaciones clínicas diferentes: la pancreatitis hereditaria, los síndromes de cáncer familiar como el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome familiar del melanoma y nevus atípicos múltiples (FAMMM), el síndrome de cáncer familiar de mama y ovario o el carcinoma

ANTECEDENTES

colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) y, por último, el síndrome de cáncer pancreático familiar¹⁰.

La **pancreatitis hereditaria** es una rara enfermedad autosómica dominante que cursa con episodios de pancreatitis que comienzan durante la infancia. El gen responsable es *PRSSI* y su mutación resulta en una ganancia de función de la enzima digestiva tripsina²⁰. Mutaciones en el gen *SPINK1* y *PRSS2* también se ha asociado a pancreatitis familiar¹⁰. En estos pacientes el riesgo de ACDP aumenta en 50 veces respecto a la población general²¹⁻²³.

Algunos de los **síndromes de cáncer hereditario** que se asocian a un mayor riesgo de ACDP se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Síndromes de cáncer hereditario que afectan al páncreas ¹⁰	
Síndrome	Gen mutado
Síndrome Peutz–Jeghers ^{24, 25}	<i>STK11</i>
FAMMM ²⁶⁻²⁸	<i>P16 (CDKN2A)</i>
Síndrome de cáncer familiar de mama y ovario ^{29,30}	<i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>
Anemia de Fanconi ³¹⁻³⁴	<i>FANCA, B, C, D1 (BRCA2), D2, E, F, G</i>
Síndrome Li–Fraumeni ³⁵⁻³⁶	<i>TP53</i>
Fibrosis quística ^{37,38}	<i>CFTR</i>
Enfermedad de Von Hippel-Lindau ^{39,40}	<i>VHL</i>
HNPCC ^{41,42}	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2</i>

De todos ellos, el de mayor riesgo es el *síndrome de Peutz-Jeghers* (hasta 132 veces con un riesgo acumulativo del 36%)²⁴. Se trata de una enfermedad autosómica dominante caracterizada por la existencia de pólipos hamartomatosos en el tracto

gastrointestinal y máculas pigmentadas en los labios, mucosa oral y dedos. Predispone al cáncer gastrointestinal y pancreático. El responsable de este síndrome es una mutación en la línea germinal de *STK11*, la cual se ha encontrado no sólo en estos cánceres familiares sino también hasta en un 4-6% de los casos esporádicos^{24,25}.

El segundo síndrome con mayor riesgo es el ***síndrome familiar del melanoma y nevus atípicos múltiples*** (FAMMM). Se trata de una enfermedad autosómica dominante caracterizada por la aparición de melanomas cutáneos y múltiples lesiones atípicas precursoras. Presentan mutaciones en la línea germinal de *P16*²⁶⁻²⁸. Muchos ACDP también muestran esta mutación de *P16*. En algunos pacientes con FAMMM se observó una delección de 19 pares de bases en el exón 2 del gen *P16* y se vió que existía un riesgo del 17% a los 75 años²⁶⁻²⁸.

El riesgo de cáncer de páncreas también está aumentado en las familias con ***cáncer de mama y ovario*** con mutaciones de *BCRA1* y *BCRA2*²⁹. Se ha observado que el cáncer de páncreas es más frecuente en aquellas familias con cáncer de mama que muestran la mutación de *BCRA2* que en aquellas familias sin la mutación^{29,30}.

Los pacientes con ***anemia de Fanconi*** (FA) presentan una amplia variedad de defectos incluyendo anomalías congénitas, fallo de médula ósea y alto riesgo de desarrollar cánceres como la leucemia mieloide aguda (LMA) y tumores de cabeza y cuello³¹. Existen múltiples genes *Fanconi* cuyas proteínas forman un complejo junto a *BCRA1* que participa en la traslocación de *FANCD2* al foco nuclear³². Se piensa que este complejo, junto con *BCRA2* y *RAD51*, tiene un papel importante en la reparación

de la rotura del ADN de doble cadena. Las bases genéticas de otra forma de FA (FA-FANCD1) han sido recientemente identificadas como el resultado de una mutación inactiva bialélica de *BCRA2*³³. Dado que los pacientes con mutación en la línea germinal de *BCRA2* tienen un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de páncreas, la vía FA ha sido investigada como una vía de desarrollo del cáncer de páncreas. Recientemente van der Heijden *et al.*³⁴ identificaron mutaciones de *FANCC* y *FANCG* en pacientes con cáncer de páncreas en edad temprana. Los datos sugieren que aunque la alteración de estos 2 genes puede contribuir en el desarrollo del cáncer de páncreas, la relación es tan esporádica que tendría una baja penetrancia para este tipo tumoral.

El *síndrome Li-Fraumeni* fue descrito en 1988 por Li *et al.*³⁵ como un síndrome caracterizado por una alta incidencia de tumores que aparecen a edad joven. Los más fuertemente asociados y por tanto característicos del síndrome son los sarcomas, cáncer de mama, tumores cerebrales y carcinomas adrenocorticales. También presentan carcinomas de páncreas, aunque con un riesgo moderado, y está relacionado con la mutación en línea germinal de *TP53*³⁶.

Por otra parte se ha visto que los pacientes con mutación del gen *CFTR* de la *fibrosis quística* presentan un aumento del riesgo 5-6 veces mayor que la población general. Este riesgo es edad-dependiente, ya que no se presenta en pacientes jóvenes^{37,38}.

La *enfermedad de Von Hippel–Lindau* está ampliamente relacionada con la presencia de lesiones pancreáticas incluyendo tumores neuroendocrinos³⁹. Causada por la mutación del gen *VHL*, la enfermedad se caracteriza por presentar tumores renales y cerebrales, aunque no se ha demostrado relación de este gen con la patogenia del ACDP⁴⁰.

El cáncer de páncreas se ha descrito también en el *síndrome de cáncer de colon hereditario no-polipósico* (HNPCC)⁴¹ y parece estar en relación con la mutación de *MSH2*⁴².

Además de estos síndromes hereditarios existe otra entidad denominada *cáncer pancreático familiar*, de transmisión autosómica dominante, que se demuestra con la anticipación de la edad de comienzo de la enfermedad en sucesivas generaciones. El gen principal no ha sido identificado aún, aunque hasta un 15% de las familias tienen mutación de *BRCA2* incluso en ausencia de cáncer de mama⁴³⁻⁴⁶. Además, el gen *PALB2* codifica una proteína homónima que interactúa con *BRCA2* y se ha identificado como gen de susceptibilidad para el ACDP⁴⁷, encontrándose mutaciones en línea germinal hasta en un 5% de los casos de ACDP⁴⁸⁻⁵⁰. Pero el gen de mayor susceptibilidad es *PALLD* (*Palladina*) que codifica un componente del citoesqueleto que controla la forma y la motilidad celular⁵¹. Los criterios diagnósticos establecidos requieren 2 o más familiares de primer grado con ACDP o 2 o más de segundo grado con cáncer de páncreas antes de los 50 años. El riesgo aumenta entre 4 veces con un familiar afecto y hasta 32 veces si existen 3 familiares⁵².

Varios estudios han examinado la asociación entre *polimorfismos genéticos* y el ACDP⁵². Así el polimorfismo de 2 enzimas carcinógeno-metabolizantes, el citocromo P450 1A1 (CYP1A1) y la glutatión S-transferasa (GST), en asociación con el hábito tabáquico, aumentaría el riesgo en la población caucásica⁵³. Polimorfismos de las enzimas glutatión S-transferasa M1 (GSTM1) y acetiltransferasas (NAT1 y NAT2) podrían estar asociados con un moderado incremento en la susceptibilidad al cáncer de páncreas y la PC⁵⁴. El gen *UGT1A7* se expresa predominantemente en páncreas humano. La baja actividad detoxificante del alelo *UGT1A7*3* se ha identificado como un nuevo factor de riesgo para enfermedades pancreáticas, definido por la interacción de la predisposición genética y el daño oxidativo inducido por el medio ambiente⁵⁵.

3. Clínica y diagnóstico

La mayoría de los ACDP se presentan en estadios avanzados siendo irreseccables al diagnóstico y en numerosas ocasiones con metástasis hepáticas. Los tumores que se desarrollan en la cabeza suelen dar manifestaciones clínicas más precozmente en forma de ictericia obstructiva o pancreatitis aguda. En cambio, aquellos situados en el cuerpo o la cola tienden a ser asintomáticos, detectándose de forma más tardía⁵⁶.

El marcador tumoral más utilizado en la actualidad es el CA19.9, con una sensibilidad del 70%-90% y una especificidad del 90%. Además es especialmente útil para el seguimiento del paciente, la respuesta a la terapia y la detección precoz de recaídas. Existen nuevos marcadores que aún están en fase de estudio y que veremos posteriormente⁵⁶.

Nuevas técnicas diagnósticas para las lesiones pancreáticas han sido desarrolladas en las últimas décadas. Una de las más útiles es la tomografía computarizada multicorte (TCM) con contraste que permite realizar cortes de 1mm de espesor, identificando hasta el 97% de los cánceres de páncreas e incluso determinar su resecabilidad con precisión⁵⁷. La resonancia nuclear magnética (RNM) es de gran utilidad cuando no puede usarse contraste, ya que tiene similares resultados⁵⁶. La tomografía por emisión de positrones (PET) aunque no discrimina procesos inflamatorios de tumores es útil para detectar lesiones metastásicas a distancia no sospechadas.

En cuanto a técnicas invasivas, la ultrasonografía endoscópica (EUS) puede detectar lesiones de tamaños reducidos (2-3mm) y además permite añadir la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) (Figura 1).

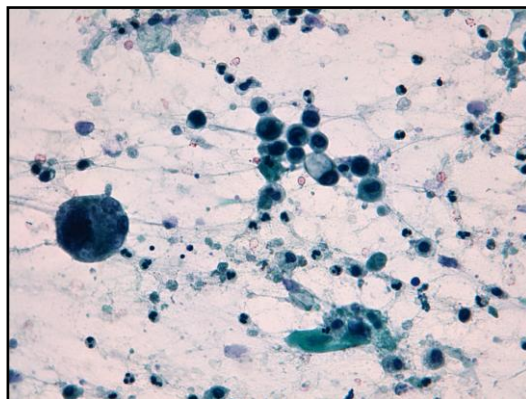


Figura 1: Imagen citológica de un ACDP obtenido mediante EUS-PAAF. Se observa un grupo de células epiteliales atípicas tridimensionales, con aumento de la relación núcleo/citoplasma, núcleo polarizado e irregular y citoplasma vacuolado. Papanicolau 400x.

La precisión diagnóstica de la PAAF guiada por EUS (EUS-PAAF) tiene una sensibilidad del 90% con una especificidad del 100%, pero requiere un equipo experto

con un citopatólogo en sala que valore el material obtenido para realizar repeticiones hasta llegar a un diagnóstico concluyente⁵⁸. También puede usarse la biopsia con aguja asociada al EUS⁵⁹. La PAAF percutánea tiene una sensibilidad y especificidad del 69% y 100% respectivamente⁵⁶, pero puede producir siembra intraabdominal o en el trayecto de la punción hasta en un 16% de los casos, incidencia mucho mayor que con la EUS-PAAF⁶⁰.

4. Anatomía patológica

El adenocarcinoma ductal de páncreas es el tipo histológico tumoral maligno más frecuente del páncreas exocrino⁶¹ y al que se refiere la literatura en general cuando se habla de cáncer de páncreas⁶². Se piensa que tiene origen en el epitelio de revestimiento ductal del páncreas, si bien en algunos casos se ha propuesto un origen en epitelio acinar con diferenciación ductal posterior⁶³⁻⁶⁶.

Macroscópicamente son lesiones sólidas localizadas en la cabeza (65%), el cuerpo (15%) o la cola (10%) o bien pueden ser multifocales (10%)⁵⁶.

A nivel histológico, la característica más importante que presenta este tumor y que lo diferencia del resto, es una intensa reacción desmoplásica del estroma subyacente constituida por una proliferación de fibroblastos y de pequeños vasos, un aumento de la producción de matriz extracelular (ECM) y la presencia de células estrelladas pancreáticas (PSC), células inflamatorias y células del sistema inmune⁶⁶⁻⁶⁸.

Los factores pronósticos histopatológicos, resumidos en la Tabla 3, son el tamaño y grado tumoral, la afectación ganglionar, la invasión perineural y vascular y los márgenes de resección quirúrgica (Figura 2)^{69,70}. La presencia de ganglios positivos empeora sustancialmente el pronóstico, sobre todo cuando se expresa en porcentaje el denominado “*lymph node ratio*” (LNR), cociente que se obtiene al dividir los ganglios positivos entre los ganglios aislados⁷¹⁻⁷³ siendo una cifra mayor del 20% un claro factor de mal pronóstico^{70,74}.

Tabla 3: Factores pronósticos del ACDP

▪ Tamaño
▪ Grado tumoral
▪ Ganglios afectados (LNR)
▪ Invasión perineural
▪ Invasión vascular
▪ Márgenes de resección

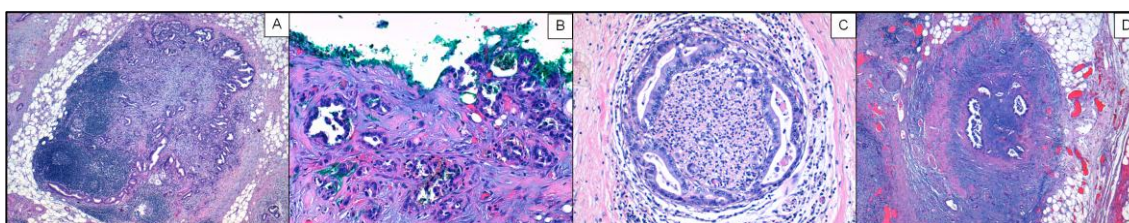


Figura 2: Imagen histológica de los distintos factores pronósticos del ACDP. A: Invasión ganglionar. B: Márgen de resección afecto. C: Invasión perineural. D: Invasión vascular.

5. Lesiones precursoras

Al igual que otros tumores epiteliales, el ACDP se origina sobre unas lesiones precursoras que progresan hasta el cáncer invasor (Figura 3)⁹. Las lesiones precursoras

del páncreas se conocen desde hace muchos años aunque sólo desde hace unas décadas se han definido y clarificado los distintos tipos histológicos⁶².

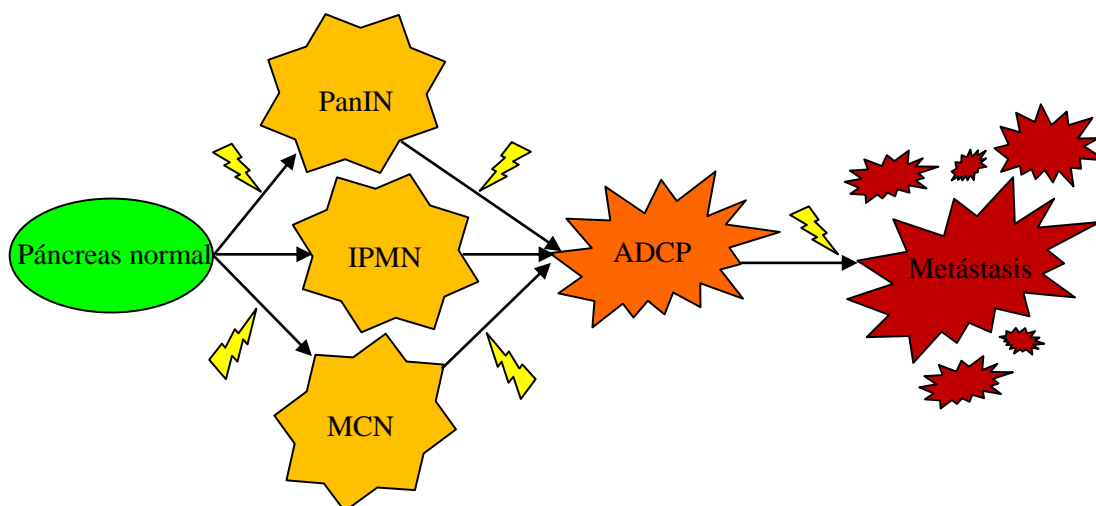


Figura 3: Esquema de progresión tumoral del ACDP, desde las distintas lesiones precursoras hasta el desarrollo del cáncer invasivo y la posterior diseminación metastásica mediante la acumulación de alteraciones moleculares.

Eran muchas las evidencias que argumentaban la relación entre estas lesiones y el ACDP, como el aumento de incidencia con la edad según hallazgos post mórtem y el aumento paralelo al de la aparición de carcinomas pancreáticos invasivos. Además, era frecuente encontrar estas lesiones no invasoras en el tejido adyacente de piezas resecadas por cáncer de páncreas⁹. Sin embargo no ha sido hasta los últimos 10 años cuando análisis moleculares cuidadosos han demostrado la relación firme entre estas lesiones precursoras y el ACDP, al demostrar la presencia de alteraciones genéticas comunes entre las lesiones infiltrantes y las precursoras y que al igual que en el cáncer

de colon, existe una progresión genética tumoral en el que se acumulan las alteraciones moleculares (Figura 4)^{75,76}.

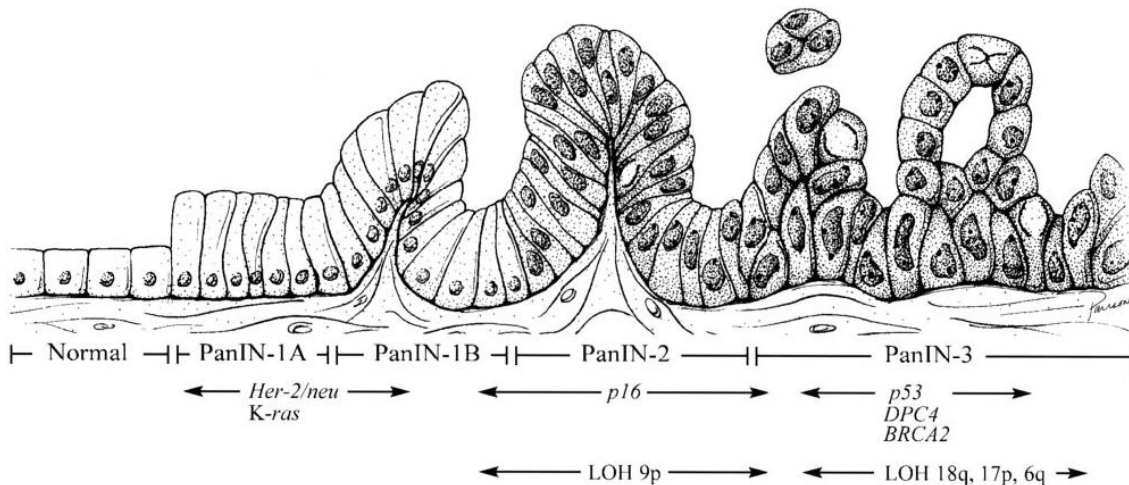


Figura 4: Modelo de progresión del ACDP. La progresión desde el epitelio histológicamente normal a PanIN de bajo grado y de alto grado, en función de la acumulación de alteraciones genéticas específicas como *KRAS*, *HER2*, *P16*, *TP53*, *BRCA2*, y *SMAD4* indicados en el modelo (Dibujo de Jennifer L. Parsons. Adaptado de Wilentz *et al.*⁷⁵).

En el cáncer de páncreas existen tipos distintos de lesiones precursoras: las Neoplasias Mucinosas Intraductales Papilares (IPMNs), las Neoplasias Quísticas Mucinosas (MCNs) y las denominadas Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN)^{62,77}. Estas 3 lesiones cumplen los 5 criterios necesarios definidos por el Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda, EEUU⁷⁸, para considerarse como lesión precursora de cáncer o precancerosas y que se resumen en la Tabla 4.

Las MCNs son neoplasias epiteliales del páncreas, formadoras de quistes y productoras de moco, que presentan un estroma distintivo de tipo ovario. Presentan mutaciones de *KRAS* en estadios tempranos y de *TP53* y *SMAD4* de forma tardía⁷⁹⁻⁸¹.

También presentan metilación aberrante de *P16* en un porcentaje similar a las lesiones invasoras⁸².

Tabla 4: Criterios para las lesiones precursoras de cáncer o precancerosas del Grupo de Trabajo del Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda, EEUU⁷⁸

- | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Evidencia de que la lesión precursora se asocia a un aumento del riesgo de cáncer |
| 2. Cuando la lesión precursora progresa a cáncer, éste se origina en las células de dicha lesión |
| 3. La lesión precursora se diferencia del tejido normal del que procede |
| 4. La lesión precursora se diferencia del cáncer en que, si bien posee algunas de las propiedades fenotípicas y moleculares de éste, no las posee todas |
| 5. Existe un método de diagnóstico de la lesión precursora |

Las IPMNs son neoplasias epiteliales no invasivas, productoras de moco y visibles macroscópicamente, que forman papilas digitiformes y suelen afectar al ducto principal pancreático. Presentan frecuentemente mutaciones de *TP53*, *P16* y *KRAS*, esta última de forma proporcional al grado de atipia^{79,80}. Sin embargo, la alteración de *SMAD4* no es muy común en las IPMNs^{79,83}. El gen *STK11*, asociado al síndrome de Peutz-Jeghers, se encuentra inactivo bialélicamente en un 25% de los casos^{24,25} y *PIK3CA* aparece mutado en un 10%⁸⁴.

Las PanINs fueron descritas por Hulst un siglo atrás⁸⁵, pero ha sido en esta década cuando se ha acuñado su nomenclatura y han sido encuadradas como lesiones pretumorales⁸⁶. Estas se clasifican en 3 grados basados en niveles crecientes de atipia

citológica y arquitectural (Figura 5). Estas lesiones presentan alteraciones de los genes *KRAS*, *P16*, *TP53*, *SMAD4* y *BCRA2*^{75,76,86}.

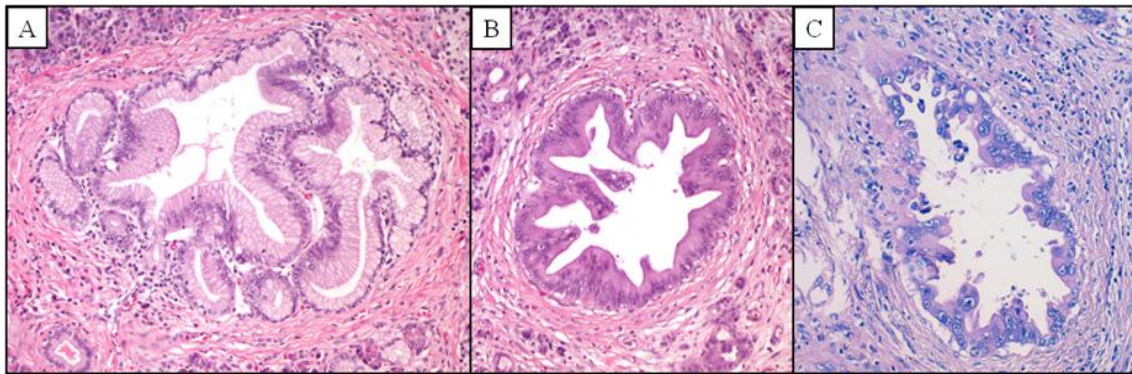


Figura 5: Imagen histológica de distintos grados de PanIN. A: PanIN grado 1B; B: PanIN grado 2; C: PanIN grado 3 (H&E, 100x).

6. Tratamiento

Actualmente el mejor tratamiento para los pacientes con cáncer de páncreas sigue siendo la extirpación quirúrgica. La primera resección con éxito de un tumor periampular fue realizada por Halsted en 1898⁸⁷. Consistió en una ampulectomía, técnica que se consideraba en aquel momento como la indicada. El primer cirujano que realizó una duodenopancreatectomía cefálica (DPC) como tratamiento de un ampuloma fue Kausch en 1912⁸⁸, pero no fue hasta 1935 cuando Whipple⁸⁹ presentó ante la Asociación Americana de Cirujanos su experiencia en tres casos en los que practicó la DPC y popularizó esta intervención que hoy en día mantiene su nombre. Realizó hasta 37 intervenciones y fue variando la técnica hasta realizarla en un solo tiempo quirúrgico⁹⁰⁻⁹¹. Posteriormente otros autores como Trimble⁹² y Hunt⁹³ modificaron la técnica de Whipple introduciendo variantes, siendo Watson en 1944⁹⁴ quien, para

intentar mejorar el estado nutricional de los pacientes, describió la técnica preservando todo el estómago y la primera porción duodenal (duodenopancreatectomía cefálica con preservación pilórica). Sin embargo, esta técnica no tuvo una aceptación generalizada entre los grupos de cirujanos de páncreas siendo poco empleada hasta el año 1978 cuando Traverso y Longmire⁹⁵ reintroducen el concepto de preservación antral y pilórica con la intención de minimizar los síntomas digestivos postgastrectomía y para mejorar el estado nutricional de los pacientes pero sin comprometer la radicalidad de la resección del tumor, ni añadir morbilidad ni mortalidad a estos pacientes.

En centros especializados en cirugía pancreática la tasa de mortalidad postoperatoria del ACDP se ha conseguido disminuir del 25% al 5%^{96,97}. La incidencia de complicaciones postoperatorias documentada varía entre el 30% y 50%⁹⁷⁻¹⁰⁰. El retraso del vaciamiento gástrico suele ser la complicación más frecuente, con cifras de alrededor del 20%, siguiendo en orden de frecuencia la fístula pancreática con un 14%, la infección de la herida el 10%, la hemorragia postoperatoria, entre el 5% y el 16%, abscesos intraabdominales 5 %, colangitis 5%, neumonía 3% o pancreatitis aguda 2%¹⁰¹.

La quimioterapia con o sin radioterapia constituye el tratamiento adyuvante de elección tras la resección quirúrgica. En un primer momento el tratamiento se realizó con 5-fluorouracil (5-FU) combinado con radioterapia^{102,103} y desde el año 1997 el tratamiento con gemcitabina es el quimioterápico estándar¹⁰⁴. El beneficio de la quimioterapia adyuvante con gemcitabina ha sido valorado en diferentes estudios

aleatorizados¹⁰⁵. Recientemente el régimen poliquimioterapéutico que combina 5-FU, irinotecan, oxiplatino y leucovorin (FOLFIRINOX) parece duplicar la supervivencia frente al uso aislado de gemcitabina, a expensas de un aumento, aunque tolerable, de la toxicidad farmacológica¹⁰⁶.

Respecto al tratamiento neoadyuvante, la heterogeneidad de los ensayos en fase II y la ausencia de ensayos en fase III no permite establecer con claridad una recomendación de neoadyuvancia para este tipo de tumor, fuera del escenario de ensayos clínicos, aunque en tumores no resecables la quimioterapia-radioterapia neoadyuvante podría disminuir la extensión tumoral y hacer operables un pequeño porcentaje de pacientes^{107,108}.

En cualquiera caso, con cirugía, quimioterapia adyuvante y/o radioterapia la supervivencia continúa siendo inferior a 3 años en la mayoría de los pacientes (mediana de supervivencia de 22 meses)¹⁰⁶. Por todo esto es evidente que se necesita encontrar nuevas dianas terapéuticas y evitar la resistencia quimioterápica de estos tumores y para esto es imprescindible la mejora en el conocimiento de los aspectos moleculares del cáncer de páncreas, que permitan seleccionar nuevas moléculas dianas⁹.

7. Biología molecular y perfiles de expresión del cáncer

La identificación y caracterización de los genes que intervienen en la patogenia del cáncer constituye el pilar fundamental para el conocimiento de esta grave patología y abre un abanico de nuevas posibilidades para obtener una terapia más eficaz.

El desarrollo de las nuevas tecnologías durante las últimas décadas ha supuesto un profundo impacto en la comunidad científica. Las técnicas basadas en microarrays han hecho posible analizar la expresión de todos los genes conocidos a la vez en un solo experimento, lo que permite obtener una visión más precisa y global del proceso biológico continuo de la tumorigénesis que determinará el pronóstico clínico de un paciente con cáncer¹⁰⁹. La idea de poder predecir con cierta exactitud la evolución de un paciente con cáncer en base a los perfiles de expresión y en relación a la supervivencia, el riesgo de recurrencia o metástasis o la respuesta a un tratamiento determinado, permitiría seleccionar mejor las terapias disponibles, de manera que un paciente con bajo riesgo debería recibir una terapia menos radical ya que no se beneficiaría de tratamientos innecesarios y con múltiples efectos secundarios¹¹⁰. Varios estudios publicados recientemente han utilizado los datos obtenidos mediante el análisis de los niveles de ARN mensajero (ARNm) para intentar predecir el pronóstico de estos pacientes o incluso la respuesta a una terapia determinada.

Otro de los retos del tratamiento contra el cáncer radica en el descubrimiento de tratamientos específicos que actúen directamente sobre la neoplasia, evitando por tanto muchos de los efectos secundarios. Para ello es necesario encontrar dianas terapéuticas en cada tipo de tumor en base a sus características genéticas, lo que permitiría desarrollar fármacos que actúen directa y exclusivamente sobre ella, impidiendo la progresión del tumor. Los microarrays de expresión génica suponen un arma prometedora en este campo e indiscutiblemente han contribuido al entendimiento del

proceso tumoral global y han permitido el diseño de nuevos estudios así como la detección de futuras dianas terapéuticas¹⁰⁹.

7.1. Definición y tipos de perfiles de expresión

La secuenciación del genoma humano y el avance en las técnicas de miniaturización han permitido el desarrollo de los microarrays o biochips de ARN. Estas técnicas nos permiten explorar prácticamente todas las rutas metabólicas, reguladoras, señalizadoras, etc. y por tanto definir el patrón de expresión génica de las células tumorales en cada paciente con cáncer.

Los perfiles de expresión basados en técnicas de microarrays consisten en el análisis de miles de genes en un sólo experimento, donde las moléculas dianas (ADN o ARN) son interrogadas con sondas que se inmovilizan en una matriz (por ejemplo una membrana de malla fibrosa o lámina de vidrio)¹⁰⁹. De esta manera, la cantidad de sonda que se une a la molécula diana es directamente proporcional a la cantidad de ésta. Así, si un gen se encuentra sobreexpresado, habría gran cantidad de su ADN o ARN por lo que se uniría una mayor cantidad de sonda obteniendo una señal más intensa. Mediante métodos de bioestadística y bioinformática se obtienen los niveles de expresión relativos para cada gen a partir de la fluorescencia emitida en cada región del chip. Tras obtener esos valores, existen distintas formas de abordaje y algoritmos para analizar los datos, y por tanto, distintos tipos de estudios según su diseño (Figura 6)¹⁰⁹:

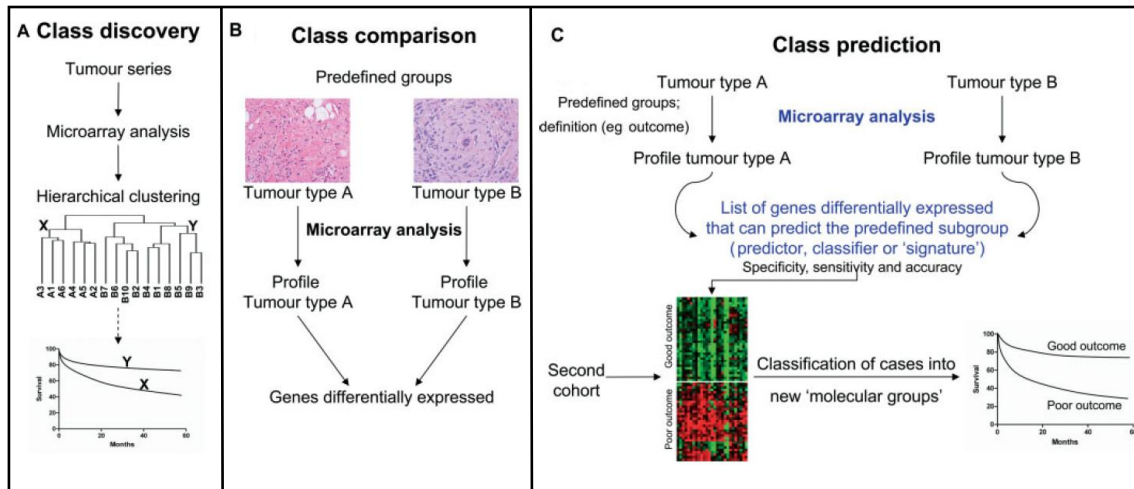


Figura 6: Tipos de estudios de perfiles de expresión. A: Descubrimiento de clases (*class discovery*); B: Comparación de clases (*class comparison*); C: Predicción de clases (*class prediction*) (Adaptado de Weigelt *et al.*¹⁰⁹).

- Descubrimiento de clases: es un abordaje imparcial, sin hipótesis a priori, donde los microarrays se utilizan para investigar la existencia de distintos subgrupos en una serie de muestras aparentemente homogénea. Estos subgrupos se analizan posteriormente en función de la supervivencia.
- Comparación de clases: utiliza una metodología supervisada en la que los perfiles generados de dos o más grupos predefinidos son comparados para determinar las diferencias moleculares entre esos grupos.
- Predicción de clases: se deriva del análisis de comparación de clases, donde, después de identificar las diferencias entre los 2 grupos predefinidos, se define una “*gene signature*” o firma pronóstica para predecir la supervivencia de una nueva muestra.

7.2. Los primeros perfiles de expresión

La clasificación de los tumores basada exclusivamente en su apariencia morfológica parece tener ciertas limitaciones ya que tumores con similar aspecto histológico pueden evolucionar de manera muy diferente e incluso mostrar diferentes respuestas a la terapia. De esta manera, bajo una categoría histológica parece que existan subclases moleculares que no han sido definidas aún¹¹¹. El estudio de Golub *et al.*¹¹¹ fue uno de los primeros en utilizar los estudios de ADN mediante microarrays para identificar subtipos de leucemias (*class discovery*) y para asignar leucemias a subtipos conocidos (*class prediction*). De esta manera, se podía separar fácilmente mediante técnicas moleculares una leucemia aguda mieloide de una linfoblástica, cuya implicación pronóstica y terapéutica es de suma importancia.

7.2.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el mejor ejemplo de cómo los perfiles de expresión pueden ser incorporados a las herramientas pronósticas del cáncer disponibles en la práctica clínica habitual¹⁰⁹. La heterogeneidad morfológica y clínica de estos tumores fue redescubierta a nivel molecular en el estudio publicado en el 2002 por el grupo de Perou¹¹², donde se describió la existencia de 4 subtipos moleculares de cáncer de mama (luminal, normal, *breast-like* y HER2)¹¹². Con posterioridad otros estudios han continuado ampliando el número de subgrupos identificados, un modelo de trabajo que continúa en desarrollo¹⁰⁹.

Actualmente se acepta que lo que una vez se llamó cáncer de mama, constituye ahora múltiples enfermedades afectando al mismo sitio anatómico. Sin embargo, basado en la evidencia disponible hasta hoy, la afirmación “*el gold estándar para la identificación del subtipo de cáncer de mama se basa en el análisis de arrays de expresión*”¹¹³ no está justificada¹⁰⁹.

El segundo reto contra el cáncer de mama era la transición de la terapia generalizada a una individualizada. Aproximadamente el 70% de los pacientes con cáncer de mama en estadio precoz recibirán quimioterapia; sin embargo, sólo una minoría obtendría un beneficio real de ésta y el resto sólo toxicidad. Los estudios de predicción de clase pretenden obtener una “*gene signature*” o firma génica que sea pronóstica y predictora de respuesta a terapias específicas.

La primera firma pronóstica descrita en la literatura internacional fue la firma de 70 genes para el cáncer de mama publicada en 2002¹¹⁴. En 2008 esta firma consiguió la aprobación de la FDA (MammaPrint®) para ser ofrecida como test pronóstico para pacientes con cáncer de mama menores de 61 años, con tumores <5cm y sin ganglios afectados (estadio I/II). Otras firmas han sido desarrolladas con posterioridad: Theros®, MapQuant Dx® y Oncotype Dx®. Esta última estudia 21 genes y proporciona una información complementaria a la estadificación clínico-patológica (tamaño tumoral y afectación ganglionar)¹¹⁵⁻¹¹⁷.

7.2.2. Cáncer colorrectal

Otro de los tumores sobre los que se han desarrollado diferentes firmas génicas es el cáncer colorrectal (CCR), dada su alta incidencia y el grave impacto socio-sanitario que supone.

Varios estudios han evaluado el valor pronóstico de estos perfiles de expresión, obteniendo resultados prometedores¹¹⁸⁻¹²⁰. Sin embargo, estos estudios tienen limitaciones importantes, ya que utilizan un número limitado de muestras para generar las firmas de expresión génica, carecen de una cohorte externa e independiente de muestras que validen los hallazgos obtenidos, y no disponen de comparaciones entre estos parámetros moleculares y los factores clínico-patológicos utilizados habitualmente en la práctica clínica¹²¹.

Por otro lado ya existen dos plataformas comerciales que parecen haber superado estas limitaciones. Una de ellas, Oncotype Dx® de CCR, se comercializa actualmente en EEUU¹²². Esta prueba se desarrolló inicialmente con el análisis de 761 genes candidatos sobre muestras de pacientes con CCR estadio II y III mediante técnicas de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)¹²³. Así surgió una firma pronóstica de 7 genes y otra predictiva de 6 genes. Para validarla, se aplicaron a 1.200 muestras de pacientes incluidos en el ensayo QUASAR y los resultados se correlacionaron con la evolución de los pacientes¹²⁴.

La otra plataforma comercial, ColoPrint®, se ha desarrollado como prueba con valor pronóstico mediante micromatrices multigénicas de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) en Agilent de 44 K, utilizando muestras de tumor en fresco. La firma generada de 18 genes, clasifica a los pacientes como de alto o bajo riesgo de recaída, independientemente de factores clínico-patológicos¹²⁵. Esta plataforma ha sido recientemente validada en una serie independiente, en la cual se demuestra mediante un análisis multivariante que ColoPrint® tiene valor pronóstico para la supervivencia libre de recaída, especialmente en pacientes en estadio II¹²⁶. Otra serie independiente ha generado resultados similares¹²⁷, mientras que está en marcha un estudio prospectivo de confirmación, el PARSC (Prospective Study for the Assessment of Recurrence Risk in Stage II Colon Cancer Patients Using ColoPrint™ NCT00903565; <http://165.112.8.96/ct2/show/results/NCT00903565>).

Por último, la firma génica desarrollada por Almac Diagnostics en muestras de tumor fijadas con formalina e incluidas en parafina ha sido recientemente validada en una serie retrospectiva e independiente de pacientes. Sin embargo, en el estudio no se describe el estado de inestabilidad de microsatélites (MSI). Esto supone un gran problema, ya que es imposible estimar la contribución relativa de este marcador al rendimiento de esta nueva firma génica¹²⁸.

Por otra parte el proyecto Cancer Genome Atlas está realizando un análisis integrativo y completo en 224 CCR y sus contrapartidas de tejidos normales. En

este estudio se han identificado un total de 24 genes tumorales y además de los bien conocidos *APC*, *TP53*, *SMAD4*, *PIK3CA* y *KRAS* también se han encontrado mutaciones en los genes *ARID1A*, *SOX9* y *FAM123B*. De forma similar al subtipo de cáncer de mama HER2-positivo, el estudio ha identificado alteraciones somáticas en el número de copias génicas y amplificación de *HER2*, planteando la cuestión de si se debe usar también un test para seleccionarlos y proporcionarles tratamiento con Trastuzumab, según los resultados que se obtengan en diversos ensayos clínicos que confirmen este hallazgo. El estudio también confirma un papel crucial de la vía Wnt y del gen *MYC*¹²⁹.

Actualmente, las firmas de expresión génica ColoPrint® y Oncotype Dx® han demostrado tener valor pronóstico, aunque no se ha llegado a un consenso sobre su uso en la práctica clínica por las Sociedades Españolas de Oncología Médica y de Anatomía patológica (SEOM y SEAP), siendo el estudio de la MSI la única técnica suficientemente validada para ser utilizada para la decisión de tratamiento adyuvante¹²¹.

7.2.3. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es otro de los tumores que ha sido ampliamente estudiado en busca de una firma pronóstica. Actualmente los pacientes con CPNM avanzado portadores de mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y probablemente en un futuro cercano los pacientes con reordenamientos del gen de la quinasa del linfoma anaplásico

(*ALK*), podrán recibir un tratamiento específico basado en el resultado obtenido del análisis de biomarcadores¹³⁰.

Numerosos estudios basados en tecnologías de microarray se han realizado para determinar perfiles genéticos de supervivencia en CPNM y poder estratificar el riesgo¹³¹⁻¹³⁴. Sin embargo, los genes identificados que están relacionados con la supervivencia no son consistentes entre los distintos estudios, probablemente debido al número limitado de muestras, heterogeneidad de la enfermedad y/o factores técnicos como la diferencia de plataformas de microarrays y el procesamiento de las muestras. Lu *et al.*¹³⁵ realizaron un meta-análisis de 7 estudios publicados para buscar los genes diferencialmente expresados en relación al tiempo de supervivencia. Encontraron una firma de 64 genes que podían estratificar a pacientes en estadios precoces en bajo y alto riesgo.

Beer *et al.*¹³¹ publicó en 2002 una firma génica para adenocarcinomas de pulmón en estadios precoces, basada en 50 genes, que permitía diferenciar un subgrupo de alto riesgo que se beneficiarían de tratamiento adyuvante.

8. Biología molecular del cáncer de páncreas: estado actual.

A pesar de los avances obtenidos en la caracterización de los perfiles de expresión en otros tipos de cáncer, el cáncer de páncreas continúa siendo uno de los mayores retos oncológicos actuales. Si bien es uno de los tumores mejor caracterizados a nivel genético, la complejidad de su genoma plantea todavía muchas incógnitas. Las

alteraciones identificadas en las lesiones precursoras y su progresión como vía de carcinogénesis, la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores, los cambios en la actividad de las vías de señalización o alteraciones de dianas mutacionales de baja frecuencia son entre otros los hallazgos obtenidos del estudio mediante microarrays.

El páncreas es un órgano particular y como tal, presenta una serie de dificultades sobreañadidas que lo diferencia de otros tipos tumorales.

La primera de todas es la dificultad en la obtención de tejido para estudio. La complicada accesibilidad de este órgano ha dificultado durante mucho tiempo tanto el estudio de lesiones precursoras como el de las propias neoplasias. Las nuevas técnicas diagnósticas que incluyen toma de muestra mediante PAAF o biopsia trucut han permitido disponer de material tumoral para estudio en estadios más precoces. Derivado de esta inaccesibilidad surge otro importante problema: la dificultad de reunir un número adecuado de pacientes en un tiempo razonable para sacar conclusiones útiles y válidas. No obstante, el desarrollo reciente de técnicas que permitan extraer ARN de muestras obtenidas a partir de tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina abre una puerta a la investigación de las piezas de resección conservadas de anteriores intervenciones en cuantía suficiente y de pacientes de los que se dispone de un seguimiento completo.

Otra de las dificultades aparentes es el contenido de ARNasas del tejido pancreático, lo que potencialmente interferiría en la extracción de ARNm para estudios

de genes de expresión. Sin embargo, las ARNasas son un producto de secreción mayoritario de las células acinares, las cuales se suelen perder por atrofia o destrucción en los ACDP.

Pero sin lugar a duda, lo que caracteriza al ACDP, y ha sido la mayor de las dificultades iniciales de su estudio molecular es la exuberante reacción desmoplásica¹³⁶. Habitualmente los ACDP resecados están compuestos de una minoría de células epiteliales tumorales rodeadas de un estroma no neoplásico fibroso denso predominante, que contiene fibroblastos activos, vasos pequeños, células inflamatorias y componentes atróficos residuales atrapados de los órganos invadidos^{137,138}, de manera que el volumen tumoral de una pieza quirúrgica puede ser limitado en comparación con el volumen total (<40%)¹³⁶ (Figura 7). Por ello se han utilizado para el estudio de perfiles de expresión 2 tipos de muestras: las líneas celulares y las piezas quirúrgicas.

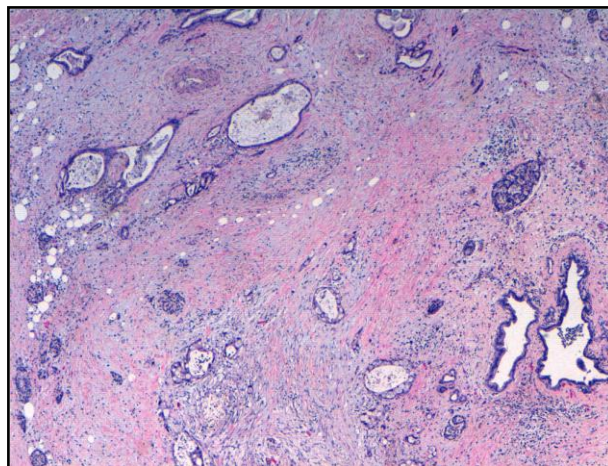


Figura 7: Imagen histológica de un ACDP. En ésta se puede observar que el volumen tumoral representa un 30-40% del volumen total. El resto corresponde a fibroblastos, ECM y células inflamatorias. (H&E 200x).

Por un lado, las líneas celulares de cánceres de páncreas son muy útiles porque se componen de poblaciones de células epiteliales ductales exclusivamente. Además también están disponibles líneas celulares de células ductales pancreáticas no neoplásicas lo que permite fácilmente identificar grupos de genes diferencialmente expresados por estas células tumorales y no por las no neoplásicas. Aunque estas líneas celulares son muy útiles tienen sus desventajas, ya que al crecer en medios artificiales, pueden producir un cambio de expresión de genes, particularmente disminuir la expresión de genes relacionados con las interacciones normales entre el epitelio y la ECM^{138,139}.

Las muestras correspondientes a piezas de resección quirúrgica, las cuales representan a la neoplasia en su estado “nativo”, son algo esencial en los estudios de expresión, pero como hemos visto presentan un predominio de células estromales no neoplásicas. La microdissección manual y láser^{136,140,141} y otros métodos de purificación del componente epitelial pueden utilizarse para solventar este obstáculo, aunque al usar muestras ricas en estroma también se puede obtener información de la expresión de genes relacionados con la interacción tumor-estroma^{137,138,142}. Incluso esto permite la detección de patrones de genes de expresión del epitelio tumoral lo suficientemente robustos para que puedan ser detectados a pesar de la predominancia del componente estromal.

El análisis y comparación de los resultados permiten obtener una visión más completa de los patrones de genes de expresión en el ACDP. Así mismo, los genes que

están expresados sólo en las piezas de resección son probablemente aquellos relacionados con la interacción tumor-estroma¹³⁸.

Todas estas peculiaridades hacen del cáncer de páncreas un tumor difícil de estudiar en comparación con otros tumores sólidos como la mama o el pulmón. Las nuevas tecnologías de toma de muestra, microdissección e ingeniería genética están permitiendo que se avance en el conocimiento molecular de este tumor.

8.1. Técnicas de análisis global de expresión de genes (niveles de ARN)

Existen diferentes técnicas que han revolucionado la capacidad de estudiar los genes de expresión en el cáncer de páncreas: el análisis seriado de genes de expresión o SAGE, ADNc microarrays, arrays de oligonucleótidos y los métodos de secuenciación de próxima generación (NGS).

8.1.1. SAGE

El análisis seriado de genes de expresión (SAGE) fue desarrollado por Velculescu *et al.*¹⁴³. Se trata de una técnica que permite obtener un perfil de expresión génica celular cuantitativo y completo^{143,144}. De forma breve, en este procedimiento, los transcritos de ARNm celular se convierten en ADNc, que se unen de forma específica a las enzimas de restricción y se dividen en pequeños fragmentos de 10–14 bp, denominados tags. Estos tags son amplificados mediante PCR, concatenados y secuenciados. Cada tag identifica el transcrito de un gen específico¹⁴³. La cantidad de tags provee una medida cuantitativa del nivel de

tránsito presente en la muestra de ARNm analizada, lo que permite comparar los niveles de expresión entre distintas muestras¹⁴⁴. Esta capacidad de cuantificar la expresión génica representa la mayor ventaja de SAGE en relación a otros métodos de screening de genes diferencialmente expresados¹⁴⁵.

Un gran número de colección de SAGEs están disponibles *on line* para todo el público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>), lo que permite obtener un perfil completo en una variedad de tejidos y enfermedades¹⁴⁶. El páncreas normal y el ACDP fueron de los primeros tejidos en ser estudiado mediante esta técnica SAGE¹⁴⁷. Ryu *et al.*¹³⁷ identificaron mediante este sistema 74 genes que se expresaban de forma diferencial en las muestras procedentes de piezas de resección respecto a las líneas celulares. Estos genes fueron denominados genes de invasión. Un año después, Ryu *et al.*¹⁴² estudiaron 6 líneas de cáncer de páncreas, 2 cultivos de corto plazo de células ductales pancreáticas y 2 muestras quirúrgicas, identificando 86 genes.

8.1.2. ADNc microarrays

Esta técnica consiste en la hibridación competitiva de ADNc de muestras y controles a chips de microarrays de ADNc, permitiendo la identificación de perfiles génicos de las diferentes muestras. Crnogorac-Jurcevic *et al.*¹⁴⁸ compararon mediante esta técnica la expresión diferencial de genes en páncreas normales, tejido tumoral pancreático y muestras tumorales enriquecidas mediante aspiración. Identificaron 187 genes sobreexpresados en las muestras tumorales

enriquecidas de los cuales 149 también lo estaban en las muestras tumorales no enriquecidas. Iacobuzio-Donahue *et al.*¹⁴⁹ analizaron muestras de tejido congelado de páncreas normal y tumoral, así como de líneas celulares, identificando 149 genes diferencialmente expresados en las muestras tumorales.

8.1.3. Arrays de oligonucleótidos

Con este método el ADNc se hibrida con arrays de oligonucleótidos (se sintetizan en el mismo chip y son complementarios a los ADNc). La intensidad de la señal refleja de forma lineal la cantidad de ARNm presente en la muestra original. Iacobuzio-Donahue *et al.*¹⁵⁰ identificaron en su estudio con esta técnica 97 genes, la mayoría de los cuales no habían sido descritos en el ACDP hasta el momento.

8.1.4. Next Generation Sequencing

Los nuevos métodos de secuenciación masiva han sido denominados secuenciación de próxima generación o *next-generation sequencing* (NGS)¹⁵¹ en contrapartida a los métodos automatizados de Sanger denominados hoy como tecnología de primera generación. La llegada de las tecnologías NGS al mercado ha supuesto una gran revolución en la investigación básica, clínica y aplicada. En algunos aspectos el potencial de NGS es comparable a los inicios de la PCR¹⁵²⁻¹⁵⁶. El mayor avance que ofrece las NGS es la capacidad de producir un volumen enorme de datos producidos a bajo coste. Por ejemplo, los estudios de microarrays

de expresión génica están ahora siendo reemplazados por métodos denominados “*seq-based methods*”, en donde se pueden identificar y cuantificar transcritos raros sin conocimiento previo del gen en particular y pueden dar información acerca de *splicing* alternativo y variación de secuencias en genes identificados^{157,158}. Si bien su precio sigue limitando su aplicación, principalmente en los estudios de ARNm, si se quieren analizar las variantes de los diferentes ARNs.

9. Mecanismos moleculares en la patogénesis del cáncer de páncreas

El estudio de la patogénesis molecular es imprescindible para la identificación de moléculas útiles tanto para el diagnóstico como tratamiento y pronóstico del cáncer de páncreas. Los estudios sobre el genoma humano y sus bases de datos han permitido generar mapas de las distintas vías de señalización implicadas en el desarrollo de los tumores humanos. Así pues vemos en la Figura 8 el mapa de las vías alteradas en el ACDP¹⁵⁹.

Entre los diferentes mecanismos moleculares implicados en la iniciación y progresión del ACDP se han identificado la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores, así como la desregulación de numerosas vías de señalización y otros mecanismos involucrados como la inflamación o la angiogénesis⁹.

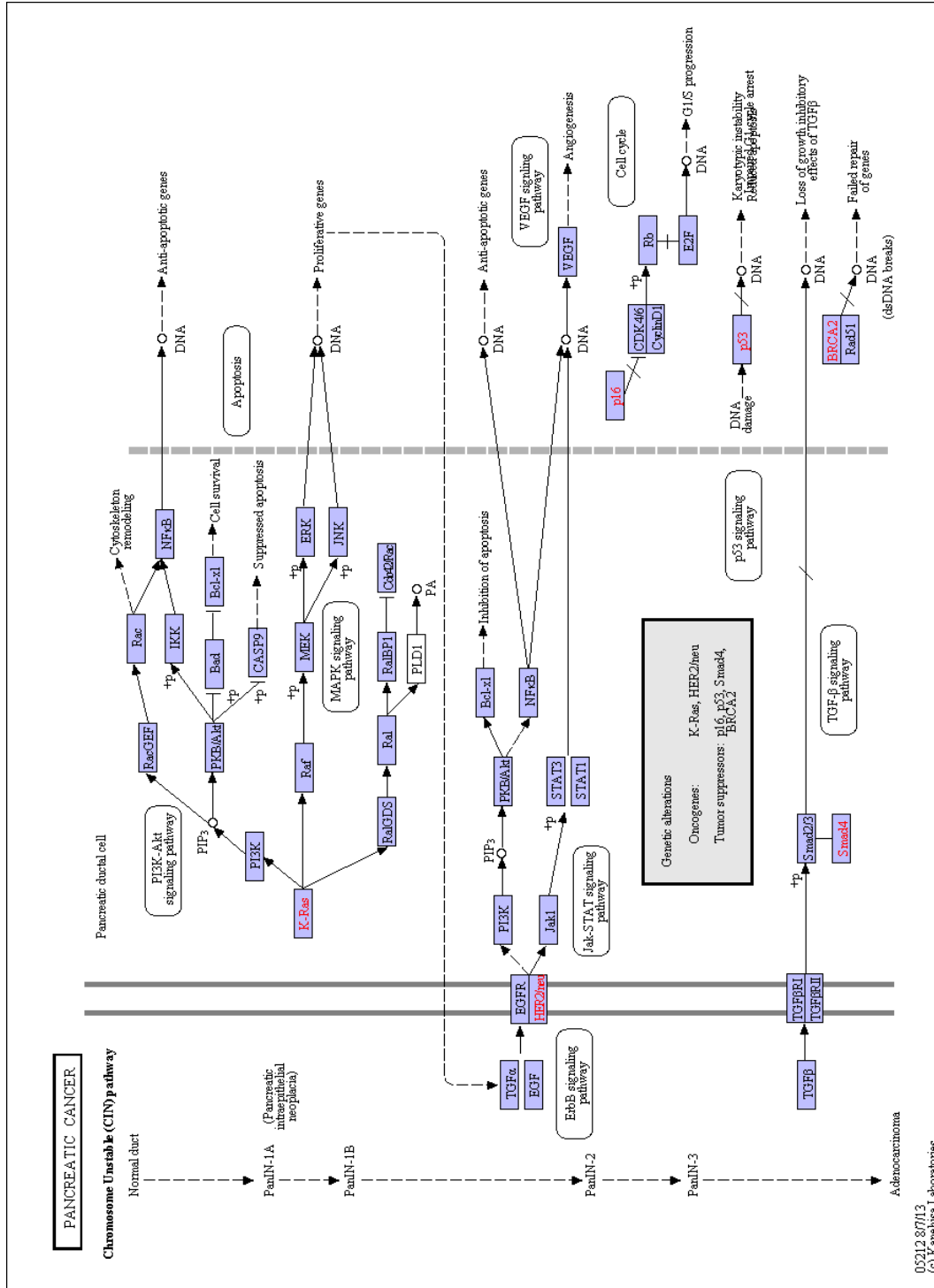


Figura 8: Representación esquemática de las vías implicadas en la patogénesis del ACDP. (Adaptada de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes¹⁵⁹)

9.1. Activación de oncogenes

9.1.1. RAS

La familia del gen *RAS* codifica 3 proteínas de 21-kDa ligadas a la membrana que intervienen en la señal de transducción y la mediación de distintos efectos como la proliferación celular y la migración¹⁶⁰. Uno de los miembros mejores conocidos en humanos es la proteína *KRAS*⁶. La activación del oncogén *KRAS* se ha observado hasta en el 90% de los ACDP¹⁶¹, uno de los mayores porcentajes de alteración encontrado en ningún otro tipo de tumor humano.

La mayoría de las mutaciones del ACDP se encuentran en el codón 12 del cromosoma 12 y son transversiones de G-T, a diferencia del cáncer de colon que se tratan de transversiones de G-A¹⁶². La activación constitutiva de Ras produce una estimulación incontrolada de la cascada de señales que promueve el crecimiento celular incontrolado (Figura 9).

Las mutaciones activadoras de *KRAS* se encuentran en estadios muy precoces, por lo que parece un potencial biomarcador de esta enfermedad. Sin embargo, las mutaciones no se encuentran exclusivamente en las neoplasias, sino que se asocia a la PC y lesiones no malignas⁶.

La alteración de la vía *RAS* no se limita a mutaciones de *KRAS*⁶. En el importante trabajo de señalización molecular del ACDP de Jones *et al.*¹⁶⁴ encontraron 1500 mutaciones somáticas de 1007 genes que identificaron sobre 24

ACDP. La señalización de *KRAS* estaba alterada en el 100% de los casos, pero no todos ellos correspondían a una mutación propiamente de *KRAS*; algunos casos incluían mutaciones de sus efectores negativos como las cinasas MAP. A pesar del papel evidentemente crucial de *KRAS* en el desarrollo y mantenimiento tumoral, la activación de *KRAS* por sí sola no es suficiente para la transformación maligna^{9,65}.

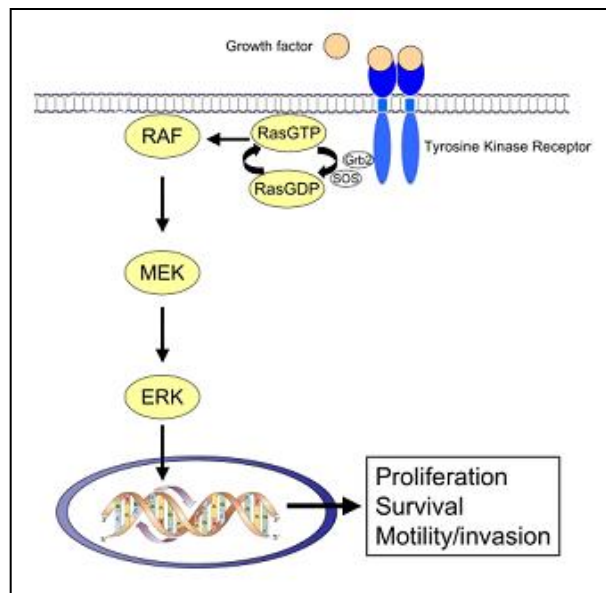


Figura 9: Representación esquemática de la vía de señalización *RAF-MEK-ERK*. La activación aberrante de esta vía en el cáncer puede ser mediante mutaciones activadoras de *BRAF* o de *RAS*, siendo esta última el caso del ACDP (Adaptada de Montagut y Settleman¹⁶³).

9.1.2. *EGFR*

Los factores de crecimiento son proteínas que controlan la proliferación y la diferenciación celular. La familia del factor de crecimiento epitelial (EGF) incluye

distintos polipéptidos con secuencias homólogas como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), con afinidades por los mismos receptores. Los 4 receptores de la familia EGF están compuestos por un dominio extracelular, una región transmembrana y una región intracitoplasmática tirosín-cinasa. Estos se denominan ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2) ERBB3 y ERBB4. Cuando el ligando se une, produce la dimerización del receptor, lo que provoca la fosforilación de EGFR, activando moléculas en diferentes vías de señalización como *PI3K*, *SRC*, *MAPK1* y *STAT3*, induciendo la progresión del ciclo celular, la división y supervivencia celular, motilidad, invasión y metástasis (Figura 10).

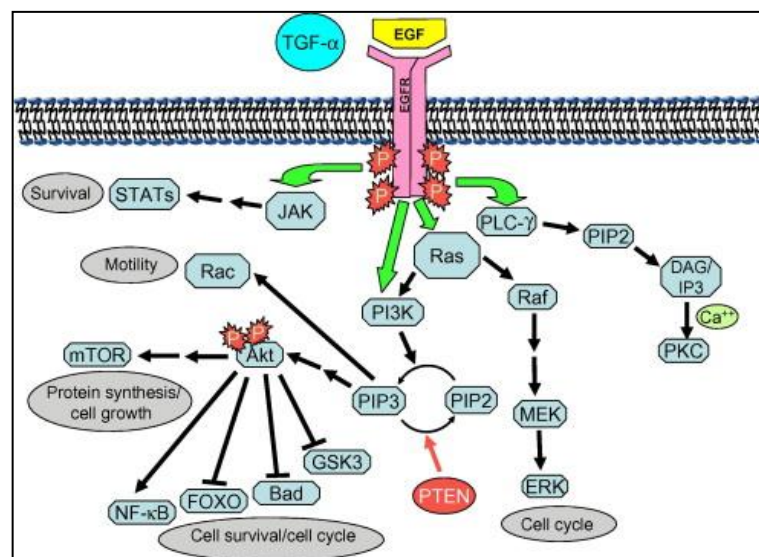


Figura 10: Representación esquemática de la vía de señalización *EGFR*. La unión de los ligandos EGF, TGF- β , etc. al receptor EGF permite la dimerización de éste con otro miembro de la familia ERBB que fosforila los residuos de tirosina localizados en el dominio intracelular. Esto permite la activación de las vías *RAS/RAF/ERK*, *PI3K/AKT*, *PLC- γ* , y *JAK/STAT* (Adaptado de Dutta *et al.*¹⁶⁶).

Las alteraciones que pueden ocurrir sobre EGFR en el cáncer incluyen la sobreexpresión, mutación, delección y reordenamientos, las cuales inducen la

activación de los receptores tirosina cinasa y promueven el desarrollo y progresión del ACDP¹⁶⁰.

La sobreexpresión de EGF y EGFR es común en el ACDP¹⁶⁰. Por otro lado, la amplificación de *HER2* y la sobreexpresión de la proteína p185 se observa en la mitad de los cánceres de páncreas¹⁶⁰. Sin embargo la sobreexpresión de EGFR se encuentra mayormente en estadios avanzados y se asocian a una peor supervivencia¹⁶⁰.

9.1.3. *NOTCH*

Las proteínas Notch son un magnífico ejemplo de cómo una molécula de señalización puede comportarse bien como oncogén, bien como gen supresor, dependiendo del contexto celular en el que se encuentre.

NOTCH1 es un oncogén bien establecido en el caso de la leucemia linfoblástica aguda T pero que actúa como gen supresor en la piel¹⁶⁷. La complejidad efectora de Notch1 en diferentes tejidos también se extiende a las diferentes isoformas dentro del mismo tejido ya que, si bien Notch2 es necesaria para la progresión de una lesión preneoplásica tipo PanIN en un modelo de ratón *RAS* mutado, Notch1 se comporta como gen supresor en este mismo modelo murino^{168,169}.

NOTCH participa en el desarrollo embrionario del páncreas mediante la autorenovación de las células progenitoras del páncreas y desarrollo del linaje

exocrino¹⁷⁰. La vía de señalización se activa durante la embriogénesis temprana del páncreas y alcanza su máximo al nacimiento. Una vez completado el desarrollo, se inactiva.

En el ACDP, *NOTCH* es un importante oncogén mediador en las lesiones precursoras⁶⁴. Se han identificado 4 genes *NOTCH* (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* Y *NOTCH4*) y 5 moléculas que actúan como ligandos en mamíferos (*DLL1*, *DLL3*, *DLL4*, *JAG1* y *JAG2*)¹⁷¹ (Figura 11).

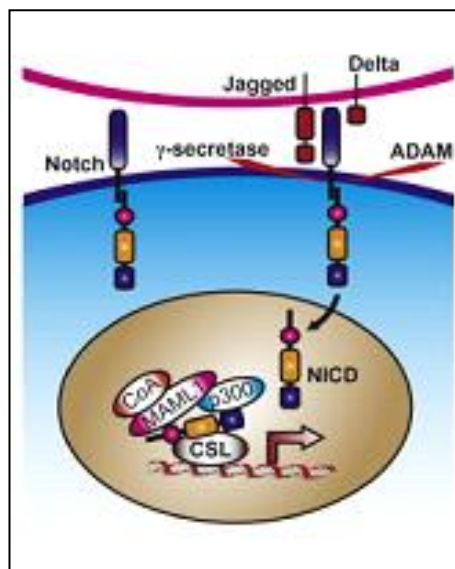


Figura 11: Representación esquemática de la vía de señalización *NOTCH*. La activación de *NOTCH* mediante la unión de un ligando *JAG* produce su activación y la traslocación al núcleo para producir la expresión de genes. *ADAM*: A-Desintegrina y Metaloproteasa; *p300*: histona acetiltransferasa; *NICD*: dominio intracelular de *NOTCH*. (Adaptado de Alison *et al.*¹⁷²)

En el ACDP los componentes de la vía *NOTCH*, incluyendo ligandos, receptores y genes dianas del final de la cascada, se encuentran sobreexpresados, comparados con el páncreas normal^{170,171}.

La activación de Notch1 es sólo aparente en estadios tardíos de la carcinogénesis¹⁷⁰ ya que se encuentra expresado en el 50% de los ACDP pero no en las lesiones intraepiteliales.

Se ha sugerido que el aumento de señalización de la vía *NOTCH* en el ACDP es debido a la acumulación de células precursoras indiferenciadas. El mecanismo por el cual esta vía aparece sobreactivada en el ACDP podría asociarse a la activación de la vía *RAS* (bien por mutación directa o a través de TGF- α inducido por la activación de *EGFR/RAS/MAPK1*)^{171,173,174}.

9.1.4. *MET*

El oncogén *MET*, codifica el receptor tirosina cinasa transmembrana c-met, cuyo único ligando es el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), una citoquina multifuncional que tiene múltiples funciones biológicas^{175,176}. Estudios previos^{177,178} han demostrado que ambas moléculas tienen un papel importante en la angiogénesis y crecimiento tumoral. Tras la unión de HGF con c-met, el receptor se activa y autofosforila, induciendo a su vez la fosforilación de otras proteínas que producen cambios funcionales y biológicos. El sistema HGF/C-MET interviene en la interacción del epitelio-mesénquima así como en la regulación de la multiplicación, diferenciación y movimiento celular¹⁷⁶. Se ha visto que en condiciones de hipoxia, los fibroblastos asociados al tumor producen HGF estimulando la angiogénesis y el crecimiento tumoral así como aumentando

la motilidad celular y la ruptura de la matriz extracelular, potenciando la invasión y las metástasis (Figura 12).

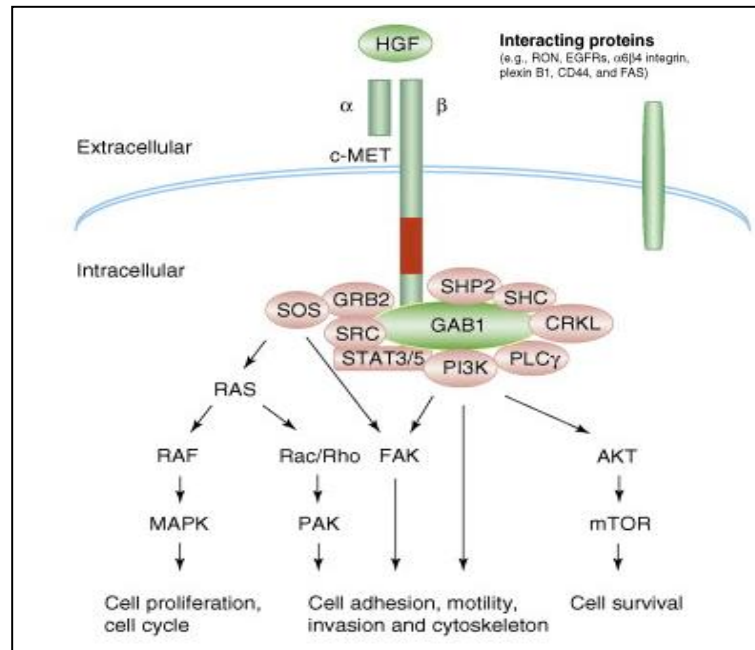


Figura 12: Representación esquemática de la vía HGF/MET. (Adaptado de Liu *et al.*¹⁸²).

C-MET y HGF se encuentran sobreexpresados en más de un 70% y 35% de los ACDP respectivamente¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

9.1.5. WNT

Las proteínas Wnt constituyen una gran familia de glicoproteínas implicadas en múltiples funciones celulares como la proliferación, apoptosis, diferenciación y migración¹⁸³. Se han descrito distintas vías de señalización: la vía β-Catenina-dependiente o vía *canonical* y las vías β-Catenina-independientes (*planar-cell polarity* y *Wnt-Ca²⁺*)^{183,184}(Figura 13).

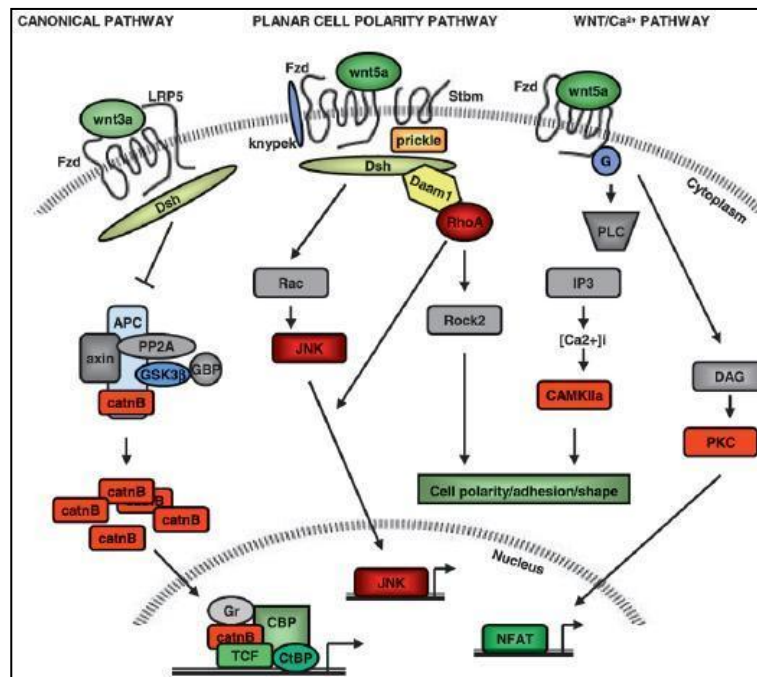


Figura 13: Representación esquemática de las vías de señalización de WNT (Adaptada de Davis *et al.*¹⁸⁴).

La proteína β -Catenina se encuentra fosforilada de forma basal y es así que puede ser degradada; sin embargo, la unión de las proteínas Wtn produce la activación de vías intracelulares que causan que β -Catenina entre en el núcleo provocando la expresión de genes como *MYC* y *CCND1*. Se han encontrado niveles aumentados de β -Catenina en la mayoría de ACDP pero no en tejido no tumoral pancreático^{183,185}. El grupo de trabajo de Zeng *et al.*¹⁸⁶ demostró que existe una sobreexpresión de β -Catenina en más de la mitad (65%) de los ACDP pero sólo de forma aislada se observaba mutación en el gen de la β -Catenina (*CTNNB1*).

La vía Wtn-Ca²⁺ ha sido implicada en una variedad de cánceres incluyendo hígado, colorrectal, mama, próstata, renal y neoplasias hematológicas. Wnt5a es una de las proteínas de la familia que ha sido identificada como una activadora de la vía *no-canonical*. Muchos estudios han documentado el papel crucial de Wnt5a en la progresión tumoral y la metástasis, contribuyendo a la migración e invasión^{187,188}. La expresión de Wnt5a se encuentra elevada en el ACDP comparado con el tejido pancreático no tumoral^{183,189}. Además la intensidad de su expresión aumenta inversamente proporcional al grado de diferenciación del tumor¹⁸³. Wnt5a actúa como un potente activador de la migración celular e invasión en el ACDP aunque este efecto estimulante no ha sido observado consistentemente en algunas líneas celulares, lo que refleja la dependencia de la función según el contexto. Wnt5a también puede actuar sobre la vía β -Catenina-dependiente confiriendo agresividad al tumor¹⁸³.

Cualquier ganancia de función en los activadores o pérdida en los inhibidores de la señalización Wnt, produce la activación aberrante de estas 3 vías. La inhibición de la señalización Wnt reduce la proliferación e incrementa la apoptosis de las células del cáncer de páncreas. La vía *Wnt/ β -Catenina* presenta además puntos de interacción con la vía de *SMAD4*¹⁹⁰.

9.1.6. Otros oncogenes

La amplificación de otros genes también es importante en la patogénesis del ACDP. El oncogen *MYC* es otro de los genes que se han encontrado amplificados

en los ACDP (hasta en un 30% de los casos)^{191,66}. También existen evidencias de la sobreexpresión de oncogenes como *BCL6*, *S100P* y *CCND1*⁹. Se ha observado que la sobreexpresión de ciclina D1 se asocia a peor pronóstico ya que promueve el crecimiento tumoral y confiere resistencia a la quimioterapia inhibiendo la apoptosis inducida por ésta¹⁹².

9.2. Inactivación de genes supresores de tumores

La inactivación de estos genes supone otro hecho importante en la iniciación del cáncer de páncreas. Existen diferentes mecanismos por los cuales estos genes supresores pueden inactivarse como mutaciones, deleciones o hipermetilación. Los principales genes supresores que intervienen en el cáncer de páncreas son *P16*, *TP53* y *SMAD4*.

9.2.1. *P16*

Se ha visto que el gen *P16* (también denominado *CDKN2A*, *INK4A* o *MTS1*) inhibe la actividad de la ciclina D1 y del complejo CDK4/6 que actúan como reguladores del ciclo celular¹⁶⁰. CDK4 y CDK6 interactúan normalmente con la ciclina D1 para fosforilar la proteína del retinoblastoma (Rb). Esto permite que Rb se disocie del complejo que forma con el factor de transcripción E2F y este último active genes requeridos para la síntesis de ADN. De esta manera *P16* controla la progresión del ciclo celular inhibiendo la división celular (Figura 14). Además, la vía *RAS/RAF/MEK* mencionada anteriormente incluye la activación de los

factores Ets1 y Ets2, los cuales tienen puntos de unión al promotor de *P16* y provocan su transcripción⁶.

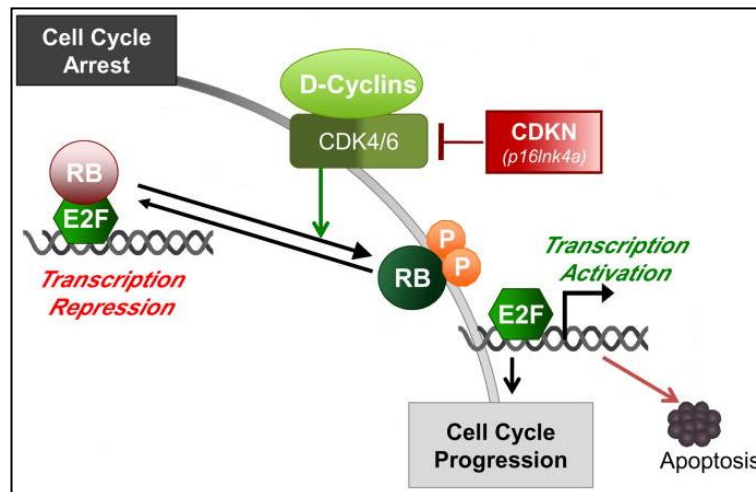


Figura 14: Representación esquemática de la vía de señalización *P16*. La inactivación de *p16* hace que mediante *CDK4/6* se fosforile *Rb* y active la transcripción de *E2F* y por tanto el paso de fase *G1* a *S*. (Adaptada de Knudsen *et al.*¹⁹²).

Aproximadamente la práctica totalidad de los ACDP (95%) tienen inactivada la vía supresora de tumores *Rb/p16*. Aunque en otros tumores la vía puede alterarse en diferentes puntos, en el cáncer de páncreas aparece inactivada casi exclusivamente por la alteración de *P16* y sólo de manera aislada por inactivación de *RB*. La inactivación de *P16* puede ocurrir por mutación intragénica (40%), por delección homóloga (40%) o por hipermetilación de su promotor (15%); esta última sólo en aquellos tumores en los que *P16* no haya sido alterado genéticamente¹⁹³.

Los pacientes con mutación de *P16* presentan mayor tamaño tumoral y

menor tiempo de supervivencia, lo que sugiere que actúa también confiriendo agresividad al tumor mediante la interacción en otras vías de señalización⁹.

9.2.2. TP53

La proteína p53 es una barrera que previene de la transformación maligna celular. Su función protectora se basa en la capacidad para detener el ciclo celular o bien favorecer la apoptosis. P53 puede ser activada mediante distintos estímulos, siendo el más importante el daño del ADN. En condiciones normales, los niveles de proteína p53 son bajos ya que ésta se degrada rápidamente. Cuando se detecta un estrés o daño celular se inhibe su degradación, acumulándose en su forma activa⁶.

La activación de p53 induce la expresión de varios genes dianas como el gen *CDKN1A*. Al unirse al promotor de este gen se estimula la producción de p21 (CIP/WAF1), la cual regula el complejo ciclina D1 y CDK2 (Figura 15). La inhibición de estas ciclinas dependientes de cinasas (CDK) induce la detención de la célula en fase G1 e inhibe la división celular hasta que el daño del ADN ha sido reparado y los niveles de p53 se han restaurado. Cuando el daño es tan grave que no puede ser reparado de forma eficiente, se induce la apoptosis celular.

Las mutaciones del gen *TP53* se encuentran en más de la mitad de los tumores humanos, siendo por tanto el gen que con más frecuencia se haya mutado¹⁹⁴. La incidencia de mutaciones de *TP53* en el ACDP varía entre el

24%¹⁹⁵ y el 70%¹⁹⁶. Las mutaciones de *TP53* inactivan la proteína producida, si bien se ha visto que algunas mutaciones de *TP53* pueden producir una proteína de igual longitud pero con una alteración de la estructura tridimensional que la hace no funcional¹⁹⁷. Además se ha observado que las alteraciones del gen *TP53* se asocian con frecuencia a las mutaciones de *KRAS*, lo que sugiere que existe un punto de interferencia común que produce una actividad cooperativa entre ambas vías. La pérdida de función de p53 se asocia con una supervivencia menor y una disminución de la sensibilidad a ciertos agentes quimioterápicos⁹.

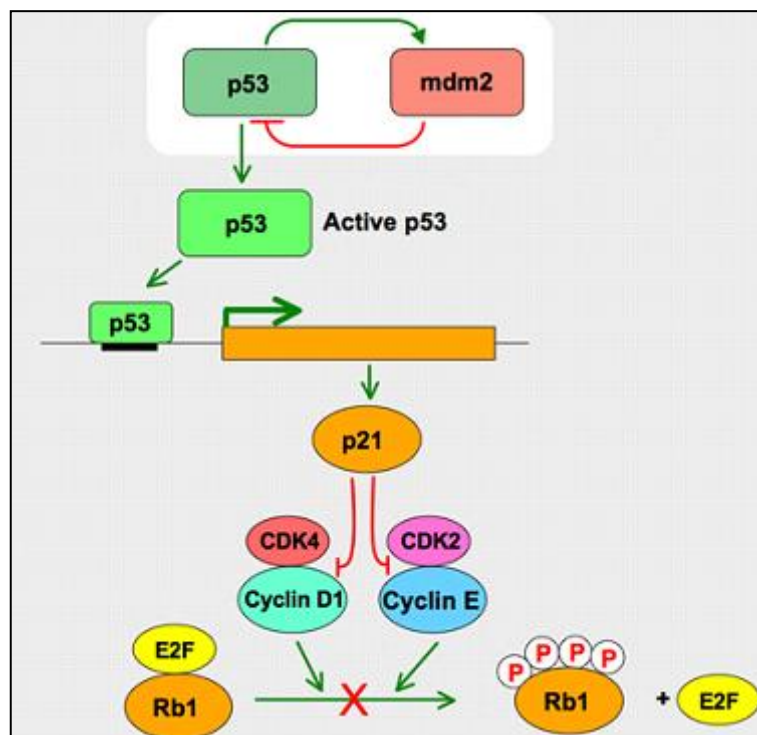


Figura 15: Representación esquemática de la vía de señalización de *TP53*. La activación de *TP53* produce la transcripción de p21 que mediante la inhibición de CDK4 y CDK2 y previene que Rb se fosforile, libere a E2F y éste active la proliferación celular¹⁹⁸.

9.2.3. *TGFβ/SMAD4*

El factor $TGF\beta$ es una citocina segregada por el epitelio, endotelio y células hematopoyéticas y mesenquimales. Su unión a los receptores $TGF\beta$ tipo I o II forma un complejo heteromérico que desencadena la fosforilación de Smad2 y Smad3, 2 proteínas citoplasmática que forman un complejo con Smad4, la cual se transloca al núcleo donde acumula y activa la transcripción de diferentes genes, incluidos algunos responsables de la parada del ciclo celular^{6,199} (Figura 16).

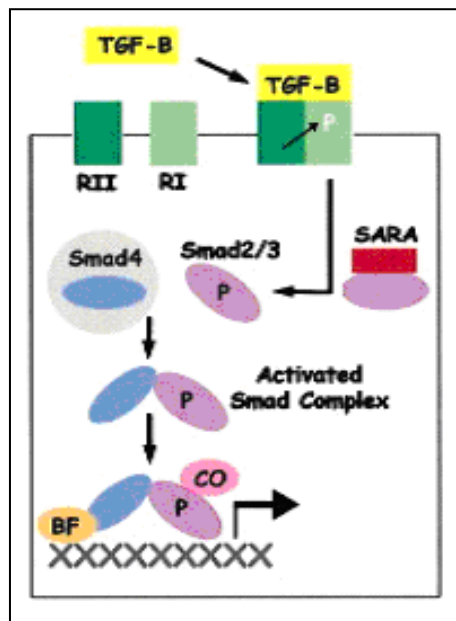


Figura 16: Representación esquemática de la vía de señalización $TGF\beta$. La unión de $TGF\beta$ a los receptores tipo I (RI) y tipo II (RII) desencadena la fosforilación de RII y su actividad serina-treonina proteína cinasa. Los receptores Smad2 y Smad3 son regulados negativamente por SARA. Al unirse a Smad4 forman un complejo que se transloca al núcleo y media la expresión de genes (Adaptado de Sherr *et al.*¹⁹⁹).

$TGF\beta$ media en un amplio grupo de procesos fisiológicos, como el desarrollo embriológico, la reparación tisular, la angiogénesis o la

inmunosupresión. También tiene una función compleja en la tumorigénesis como supresor tumoral de células epiteliales, además de promover la invasión y metástasis durante estadios tardíos.

Muchos cánceres, incluyendo el ACDP, presentan defectos en la vía de señalización TGF β . A pesar de que las alteraciones genéticas del gen *SMAD4* son frecuentes en el ACDP como veremos a continuación, también se han descrito mutaciones de los genes *TGFBR1* y *TGFBR2* (genes que codifican los receptores de TGF β) en un 1 y 4% de los cánceres de páncreas respectivamente²⁰⁰.

Como acabamos de ver, la inactivación del gen *SMAD4* (también llamado *DPC4* “delecionado en ACDP”) es una alteración que se encuentra frecuentemente en el cáncer de páncreas. Este gen codifica la proteína Smad4 que participa en la inhibición del crecimiento celular y la angiogénesis. La inactivación de *SMAD4* es relativamente específica del ACDP, a pesar de que también ocurre en otros cánceres, aunque con menor incidencia. Se ha visto que la deleción de *SMAD4* se encuentra hasta en un 50% de los ACDP²⁰¹ y en más del 90% existe una pérdida de heterocigosidad. Las alteraciones de *SMAD4* ocurren relativamente tardías en el proceso de carcinogénesis, siendo más frecuentemente encontradas en los carcinomas pobremente diferenciados. Estos tumores también presentan menor supervivencia comparados con los tumores sin pérdida de *SMAD4*²⁰². Además, la inactivación de *SMAD4* se suele acompañar de la

inactivación de *P16*, lo que pone de manifiesto la importancia de esta alteración en la patogenia del ACDP.

Aunque la inactivación de SMAD4 sólo ocurra en la mitad de los ACDP, la disrupción de la vía de señalización de TGF β ocurre en el 100% de los casos¹⁶⁴. Esto puede ser por que TGF β puede actuar también mediante vías Smad-independientes que afectan a *RAS*, *PI3K* y *MAPK1* por lo que la inactivación de Smad4 suprime algunas funciones tumor-supresoras mediadas por TGF β ²⁰³. TGF β actúa tanto a nivel de la célula pancreática tumoral como la célula estromal provocando una compleja interacción de ambos componentes o compartimentos en la que intervienen también otras rutas de señalización (Figura 17).

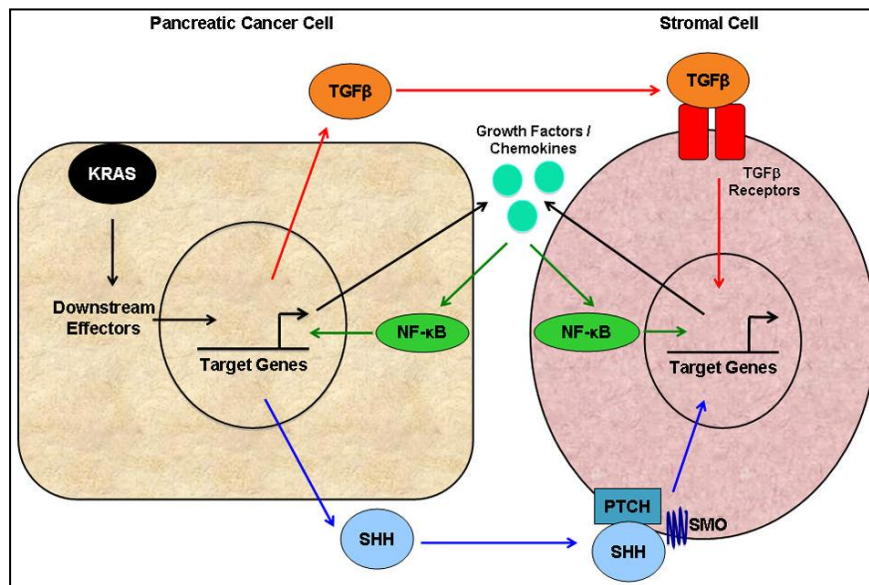


Figura 17: Representación esquemática de la interacción epitelio-mesénquima. Ambas células responden a la activación de la vía de señalización de TGF β y Hedgehog (SHH). La activación de *RAS* es un factor contribuyente. Los factores de crecimiento y quimiocinas producidas por las células inflamatorias, fibroblastos y PSCs pueden estimular la señalización de NF- κ B en ambos tipos celulares (Adaptado de McCleary-Wheeler *et al.*⁶⁶).

9.2.4. Otros genes supresores de tumores

Tal y como se comentó antes, el gen *CDKN1A* codifica la proteína p21, un inhibidor de las CDKs que forma un complejo con ciclina A/CDK2 y ciclina D1/CDK4 e inhiben su actividad, provocando la detención celular en fase G1. La pérdida de actividad de p21 se ha observado en el 50% de los cánceres de páncreas²⁰⁴.

CDKN1B codifica la proteína p27, otro inhibidor de CDKs que también regula la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S (Figura 18). La pérdida de la expresión de p27 también se ha descrito en el cáncer de páncreas⁹.

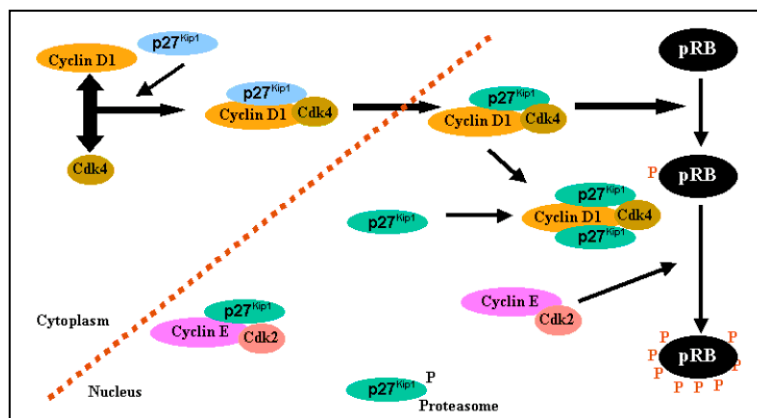


Figura 18: Representación esquemática de la actividad de p27. Este presenta una doble acción sobre los complejos ciclina D1/Cdk4 y ciclina E/Cdk2. (Adaptada de Zafonte et al.²⁰⁵).

Otro gen supresor, *BCRA2*, participa en la reparación del daño producido al ADN y las mutaciones en éste se han relacionado con un incremento del riesgo de padecer cáncer de páncreas.

9.3. Otras vías de señalización implicadas en el cáncer de páncreas

9.3.1. Vía de COX

Las enzimas ciclooxigenasas (COX) favorecen la formación de prostaglandina H₂ (PGH₂), precursor de otras moléculas de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos e induciendo el crecimiento celular mediante numerosos mecanismos como la inflamación o la regulación vascular y agregación plaquetaria²⁰⁶. Existen 2 isoformas: COX1 producida de manera constante en numerosos procesos fisiológicos y COX2, estimulada en procesos inflamatorios o tumorales por citocinas, factores de crecimiento y otros promotores tumorales (Figura 19). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que COX2 se encuentra sobreexpresada en el 50% de los ACDP²⁰⁷.

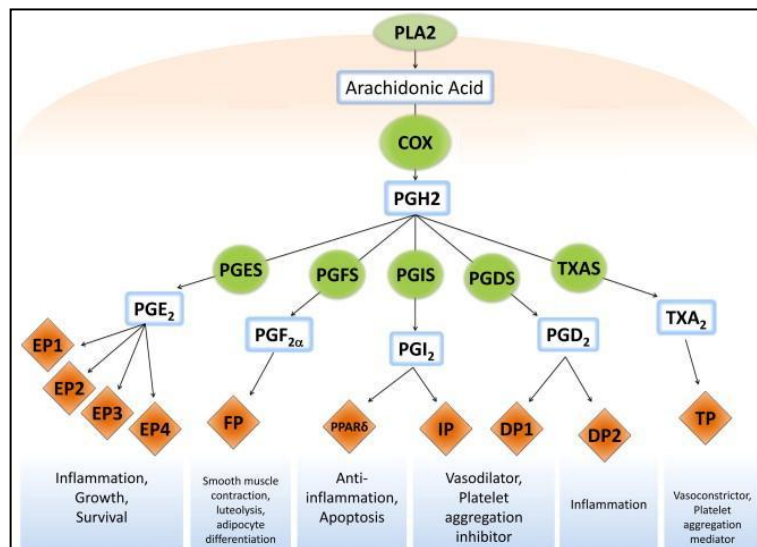


Figura 19: Representación esquemática de la vía de señalización COX y las distintas funciones de los productos resultantes (Adaptado de Cebola *et al.*²⁰⁶).

9.3.2. Vía de IGF-IR

El receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-IR) es un receptor tirosina cinasa que tiene efectos antiapoptóticos y de promoción del crecimiento, y actúa en múltiples cascadas de señales, como *PI3K*, *MAPK1* y *STAT3*²⁰⁸. IGF-IR se encuentra sobreexpresado en más de un 60% de los ACDP^{209,210}.

9.3.3. Vía de SRC

Src es uno de los 9 miembros de la familia de proteínas tirosina cinasas no receptoras SRC. En condiciones normales, Src se encuentra fosforilada e inactiva. Esta proteína tiene diversos papeles en la proliferación celular, supervivencia, motilidad, invasividad, resistencia a la quimioterapia y angiogénesis. Actúa en múltiples vías y es una diana ideal para intervenciones terapéuticas. Se postula que Src puede inducir transformación mediante la sobreexpresión de IGF-IR en líneas celulares de ACDP. Se ha descrito que hasta en un 70% de los ACDP se encuentra sobreexpresada y que hasta el 80% de estos muestra a su vez sobreexpresión de IGF-IR²⁰⁹.

9.3.4. Vía de PI3K-AKT

Esta vía de señalización interviene en la proliferación, supervivencia, resistencia a la apoptosis, angiogénesis e invasión^{10,211}. La activación de PI3K

puede ocurrir mediante la unión de ligandos a los receptores EGFR o IGF-IR. PI3K activa a Akt que induce a su vez la activación de múltiples cascadas como mTOR y NF- κ B. La activación de PI3K/AKT se encuentra en el 59% de los ACDP²¹² y representa un factor pronóstico negativo independiente²¹³.

AKT2 es uno de los 3 oncogenes que codifica la proteína AKT implicada en la activación de la vía PI3K-AKT. *AKT2* se encuentra amplificado en el 20% de los ACDP²¹⁴.

Otra forma de activación constitutiva de esta vía es mediante la expresión aberrante de *PTEN*, un antagonista natural cuya alteración ha sido frecuentemente observada en el ACDP²¹⁵. Por otro lado, el factor de transcripción HMGI(Y) que se encuentra sobreexpresado en el ACDP²¹⁶, parece que media la resistencia a gemcitabina a través de la vía AKT²¹⁷.

9.3.5. Vía de NF- κ B

La vía de señalización NF- κ B interviene en el control del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, inflamación, respuesta al estrés y otros procesos celulares fisiológicos²¹⁸. Normalmente, en ausencia de estímulo, NF- κ B se encuentra en el citoplasma secuestrada y puede ser activada mediante fosforilación. Esto produce su traslocación al núcleo y unión a promotores de genes diana como *Survivin*, *MMP9*, *UPA* y *VEGF*, los cuales intervienen en la supervivencia celular, apoptosis, invasión, metástasis y angiogénesis (Figura 20).

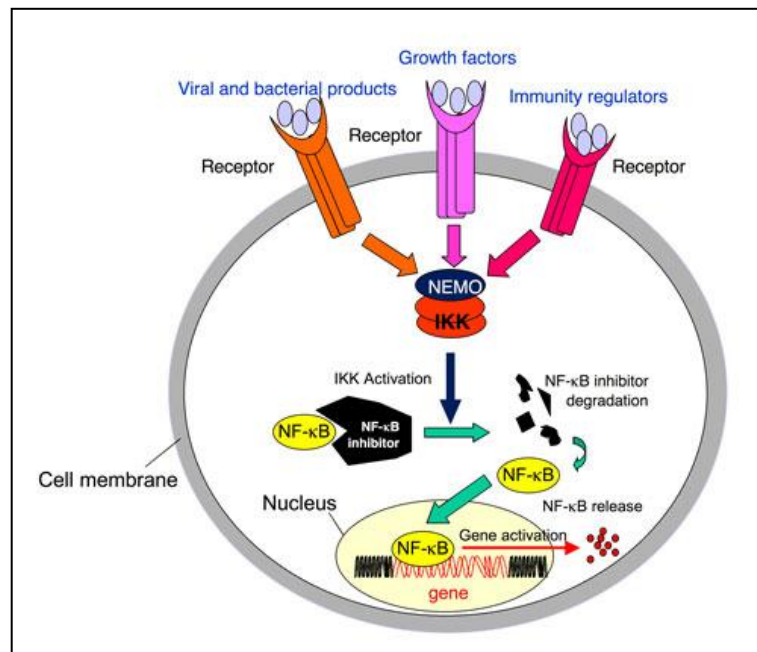


Figura 20: Representación esquemática de la vía de señalización NF-κB. La proteína NEMO activa el complejo IKK el cual actúa sobre el inhibidor de NF-κB, promoviendo su degradación. De esta manera, la molécula NF-κB libre se transloca al núcleo y activa sus genes diana (Adaptada de Agou *et al.* ²¹⁹).

NF-κB se encuentra constitutivamente activada en muestras tisulares y líneas celulares de ACDP, pero no en tejido pancreático normal²²⁰. Además, la desregulación de NF-κB puede ser inducida mediante un cruce con la vía Notch, de manera que ambas vías aparecen como importantes fenómenos en el proceso de invasión y angiogénesis del ACDP.

9.3.6. Vía de Hedgehog

La vía de señalización de Hedgehog es una vía esencial para el desarrollo embriológico del páncreas. Uno de sus ligandos, sonic hedgehog (SHH) se expresa en el epitelio endodérmico en estadios embrionarios, pero no en páncreas

adulto. SHH sólo es secretado por el compartimento epitelial tanto en lesiones precursoras como invasoras²²¹. La activación constitutiva de esta vía de señalización es considerada un prerrequisito para la viabilidad de las *cancer stem cells* o células madre tumorales (CSCs) pancreáticas tanto en el compartimento epitelial como estromal^{222,66}. La expresión aberrante de SHH se ha encontrado en el 70% de los ACDP²²³. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización de SHH se correlaciona con el desarrollo de un estroma desmoplásico que es reconocido como parte activa en la carcinogénesis y resistencia a la terapia^{224,225}.

9.3.7. Vía de CXCR4 y su ligando CXCL12

El receptor 4 de quimiocina (CXCR4) y su ligando CXCL12 tienen una importante función en la mediación de la invasión del ACDP. Li *et al.*²²⁶ no sólo demostraron esto, sino que además han demostrado que existe un punto de cruce con la vía de Hedgehog.

9.3.8. Vía de FAK

FAK (PTK2) es una tirosina cinasa citoplasmática que interviene en la señalización celular, adhesión, migración, apoptosis y progresión del ciclo celular y está estrechamente relacionada con la vía de señalización de las integrinas. Furuyama *et al.*, demostraron la sobreexpresión de FAK en un 48% de los ACDP, hecho que se relacionaba con el tamaño tumoral pero no con otros factores

pronóstico. Estos autores especulaban que FAK podría tener un papel importante en la progresión tumoral²²⁷.

9.3.9. Los receptores de gastrina y colestocinina

La gastrina es un péptido segregado por las células G del antro gástrico y duodeno y puede actuar como factor de crecimiento en el cáncer de páncreas entre otros. Tanto CCKBR (receptor de gastrina y colestocinina) como los precursores de la gastrina se encuentran expresados en un 95 y 55-91% de los ACDP²²⁸.

9.4. Otros mecanismos implicados en la patogénesis del cáncer de páncreas

9.4.1. Inflamación

La iniciación, promoción y progresión de los tumores puede verse influenciada por numerosos mediadores de la inflamación tales como las citocinas TNF- α , IL-6, IL-8 e interferón γ u otros como COX2 o PPARG. También los radicales libres de oxígeno se han relacionado con la iniciación del cáncer, ya que inducen alteraciones y modificaciones post-translacionales de proteínas clave. Los intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno causan daño oxidativo y nitración de las bases de ADN aumentando la probabilidad de que ocurran mutaciones²²⁹. En este sentido hay que tener en cuenta que factores de riesgo conocidos como el tabaco, la pancreatitis crónica hereditaria, la obesidad y la diabetes tipo II están directamente ligados al proceso inflamatorio y que el papel de la inflamación en la

promoción del ACDP desde lesiones precursoras se ha demostrado experimentalmente en modelos de ratón *KRAS*-mutado²³⁰. Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción STAT3 es un importante regulador de la supervivencia celular, de la autorenovación de las células madre y de la inflamación, imprescindible para el desarrollo normal. Se ha visto que en el ACDP existe una activación constitutiva de STAT3, que parece actuar en la tumorigénesis en estadios tempranos²³¹ (Figura 21).

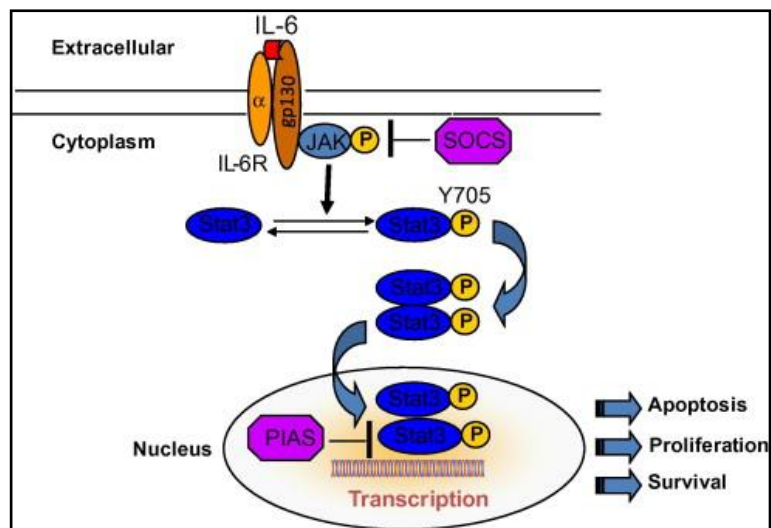


Figura 21: Representación esquemática de la vía de señalización IL-6/JAK/STAT. IL-6 se une a su receptor e induce la fosforilación de la cinasa JAK que permite la activación de STAT3 que a su vez se transloca al núcleo donde hace diana con genes relacionados con la apoptosis, proliferación y supervivencia. SOCS y PIAS son proteínas reguladoras negativas de la vía (Adaptada de *Guo et al.*²³²).

9.4.2. Telomerasas

Las telomerasas se localizan al final de los cromosomas y se contraen en cada división celular, de modo que imponen un período de vida limitado a la célula. Muchas células neoplásicas tienen una actividad detectable de las

telomerasas con una plantilla de ARN que permite la elongación de las telomerasas. La telomerasa está sobreexpresada en el 95% de los ACDP²³³.

9.4.3. Angiogénesis

La extensión tumoral y la producción de metástasis se deben fundamentalmente a los fenómenos de angiogénesis. Numerosos estudios confirman que la expresión de varios factores angiogénicos como VEGF, bFGF y endostatina está aumentada en el ACDP, lo que sugiere que estos factores son muy importantes para el desarrollo tumoral^{234,235}.

9.4.4. Receptores de integrina

Los receptores de integrina están en la superficie celular e interactúan con la matriz celular mediante varias vías de señalización. Estos receptores están implicados en varios procesos relacionados con la carcinogénesis como la supervivencia tumoral, la capacidad de invasión y la producción de metástasis. Las integrinas α Vb34 y α Vb5 inducen angiogénesis mediante el factor de crecimiento fibroblástico básico y VEGF respectivamente.

9.4.5. Metaloproteinasas de la matriz

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) constituyen una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc que degradan la matriz extracelular y son esenciales para la extensión del tumor y la producción de neovascularización.

El desequilibrio entre las MMPs y sus inhibidores naturales es un hecho frecuente en el ACDP⁹.

9.4.6. Células madre tumorales

Cada vez es mayor la evidencia que sugiere que las neoplasias poseen una pequeña población de CSCs. Estas células forman un grupo heterogéneo en la población tumoral y contribuyen a la progresión, capacidad metastásica y resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Las CSCs pancreáticas se identifican por marcadores de superficie como el CD133, CD44, CD24 y flotillin 2. Algunas vías de señalización como *mTOR*, *Hedgehog*, *Notch* y *Wnt* parecen estar implicadas en el mantenimiento de la viabilidad de las CSCs. La inhibición de la vía *mTOR* mediante rapamicina reduce la viabilidad de estas células madre CD133⁺ por lo que suponen una diana terapéutica muy prometedora²³⁶.

III. Hipótesis

III. HIPÓTESIS

El ACDP, al igual que otros tipos de cáncer, se caracteriza por múltiples cambios en la expresión génica. El conocimiento molecular actual sobre los perfiles de expresión del ACDP se basa fundamentalmente en los genes diferencialmente expresados, conociéndose poco por el momento sobre las interrelaciones existentes entre ellos. Para poder definir el ACDP en términos moleculares es necesario llevar a cabo un análisis sistemático de la expresión génica de estos tumores.

La hipótesis de este trabajo supone la existencia de diferentes patrones de expresión génica que determinarían la respuesta al tratamiento, la agresividad y la evolución de la enfermedad y que, por tanto, podrían correlacionarse con el tiempo de supervivencia.

Este trabajo pretende investigar estos diferentes patrones de expresión y, al igual que en otros tipos de tumores, relacionarlos con el estadio tumoral y la evolución clínica de los pacientes.

IV. Objetivos

IV. OBJETIVOS

Los objetivos concretos son:

1. Caracterizar el perfil o perfiles de expresión génica del ACDP.
2. Clasificar los diferentes patrones de expresión obtenidos.
3. Correlacionar estos patrones con la supervivencia.

El objetivo último del trabajo será la mejora en el conocimiento de las alteraciones moleculares en el ACDP para contribuir al progreso de la investigación básica y clínica en el cáncer de páncreas y ayudar a mejorar su tratamiento y pronóstico.

V. Material y métodos

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

Este estudio tiene un diseño de cohorte, con un seguimiento de los pacientes desde el momento del diagnóstico hasta su defunción o hasta el momento de realizar el análisis genético. Sobre dicha cohorte de pacientes se han realizado los perfiles de expresión génica que se tratarán de correlacionar con la supervivencia.

2. Identificación y selección de pacientes y muestras histológicas

Para la selección de los pacientes a incluir en el estudio se identificaron en primer lugar todos los pacientes intervenidos por cáncer de páncreas y resecaados por el equipo investigador entre 1998 y 2010, de los cuales se disponía de seguimiento clínico completo. Este seguimiento clínico de los pacientes fue realizado por los servicios de oncología médica y cirugía digestiva mediante los controles clínicos y analíticos habituales.

Sobre esta serie de pacientes se localizó el material histológico (cortes histológicos y tejido tumoral en parafina) disponible en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los cortes histológicos de todos los casos fueron revisados por dos patólogos para confirmar de forma definitiva el diagnóstico y descartar aquellos casos que presentasen un tipo histológico tumoral

diferente al adenocarcinoma ductal. Finalmente, sobre esta serie de casos corroborados histológicamente se buscó y clasificó todo el material en parafina del que se disponía y se seleccionó un bloque representativo por cada caso.

3. Base de datos de casos

Con la totalidad de pacientes seleccionados con diagnóstico anatomopatológico confirmado, seguimiento clínico completo y material histológico suficiente, se confeccionó una base de datos incluyendo los siguientes parámetros: edad, sexo, tamaño del tumor, número de ganglios resecaos, número de ganglios afectos, invasión vascular, invasión perineural, estatus del margen de resección, estadio y tiempo de supervivencia.

El número total de pacientes que cumplieron los criterios y finalmente fueron incluidos en el estudio y en la base de datos fue de 65 (Figura 22).

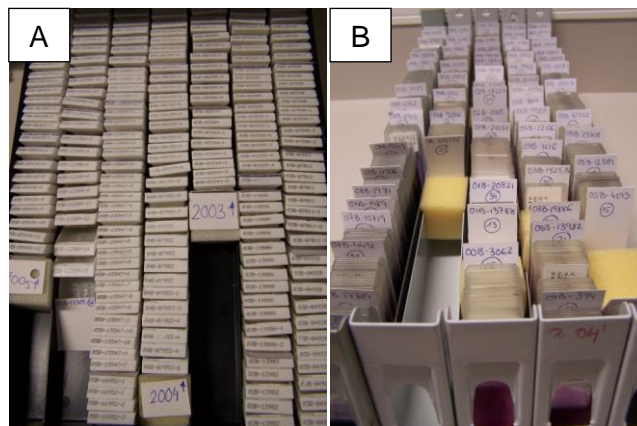


Figura 22: Material histológico clasificado. A: Material en parafina; B: Cortes histológicos.

4. Microdissección láser

Para obtener muestras de tejido tumoral con el mínimo contenido posible de celularidad no tumoral se realizó microdissección. Para ello se realizaron en primer lugar cortes de parafina de diferente grosor que dispusimos sobre portaobjetos específicos para la microdissección y libres de ARNasas. A continuación se desparafinaron y se tiñeron con H-E estéril (Figura 23).

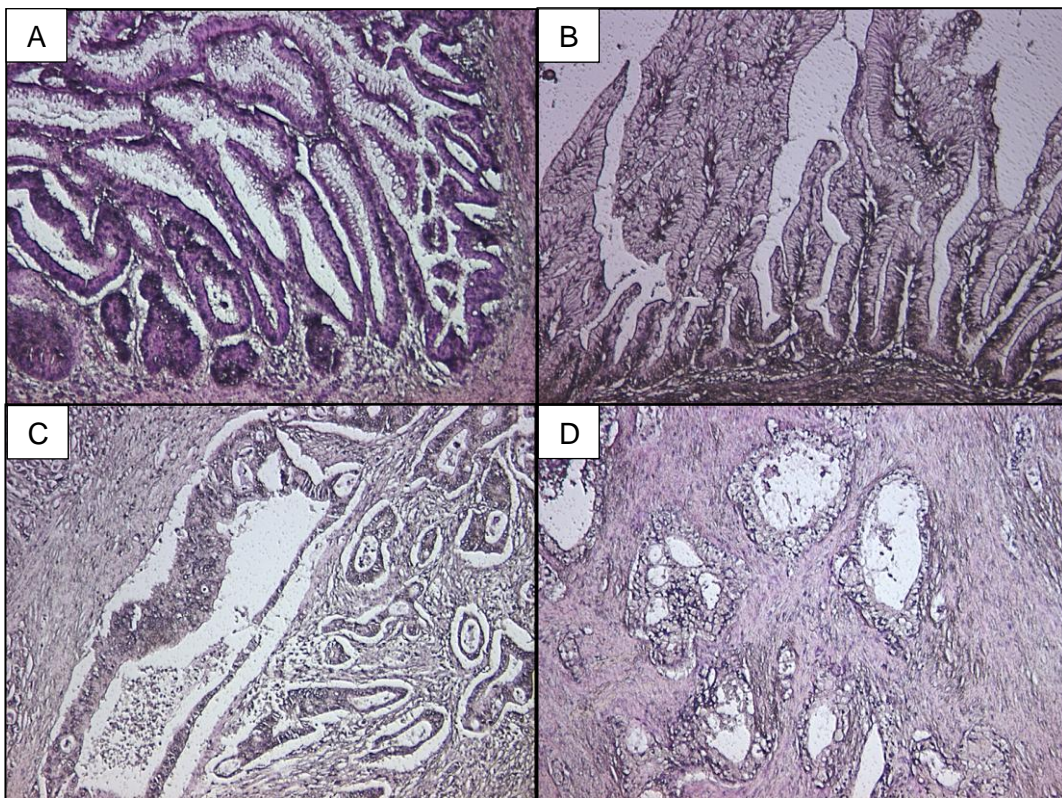


Figura 23: Diferentes ejemplos de los cortes de parafina teñidos con H-E. Los portas utilizados eran especiales para la microdissección y sin cubreobjetos.

El microscopio de disección láser utilizado fue AS-LMD Laser Microdissection System (Leica Microsystems). Este consiste en un microscopio óptico convencional con

pantalla de ordenador y un láser acoplado (Figura 24). El portaobjetos especial sin cubreobjetos se coloca en la pletina boca-abajo. Debajo de esta pletina existe un sistema colector donde se dispone el tubo de Eppendorf para la recolección de los fragmentos de tejido disecado tal y como se observa en el dibujo (Figura 25). Este sistema permite seleccionar exclusivamente las células tumorales mediante un sencillo software de ordenador.

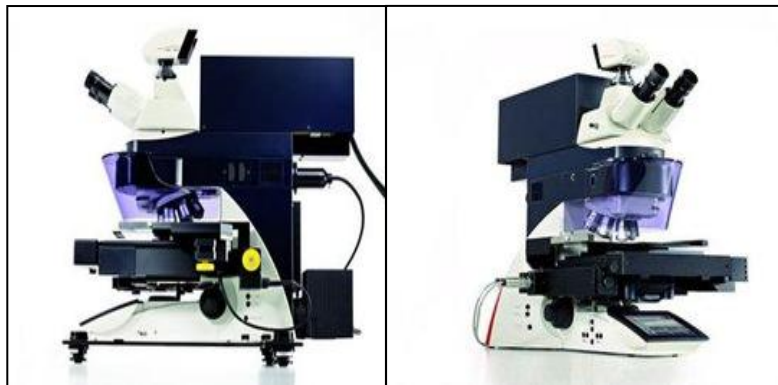


Figura 24: Microscopio disector láser AS-LMD (Leica Microsystems).

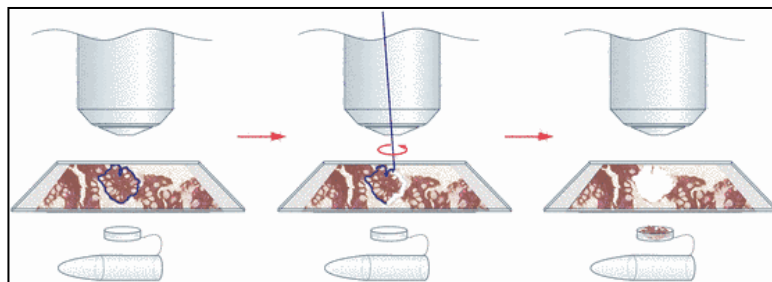


Figura 25: Esquema del funcionamiento del microdisector láser.

Para la optimización del procedimiento de microdissección se introdujeron variables diferentes, para determinar aquellas que permitieran una mejor recuperación del material génico.

Así pues, se utilizaron diferentes grosores para los cortes teñidos con H-E (2 μm , 4 μm , 6 μm y 8 μm) para determinar el grosor máximo capaz de ser cortado por el láser del microdisector. Se determinó como grosor óptimo de corte 6 μm puesto que a mayor grosor los fragmentos no se cortaban completamente.

Además se realizaron variaciones en el tiempo de secado del corte para minimizar el daño del ARN (Figura 26).

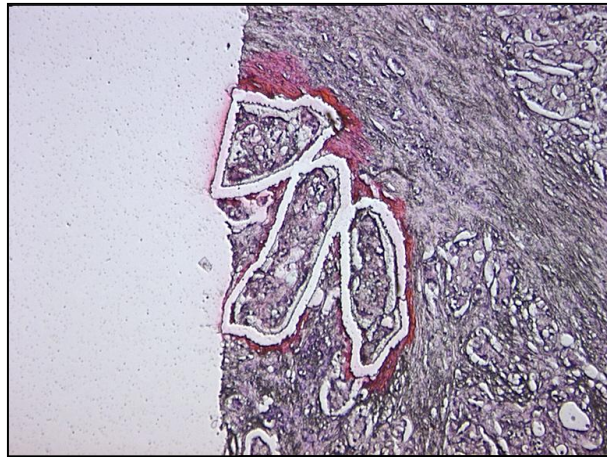


Figura 26: Corte con un tiempo insuficiente de secado. Esto produce cocción del tejido (halo rojo) e impide su caída en el tubo de recogida.

También se hicieron distintas pruebas para establecer la cantidad de tejido necesario (10.000-11.000 células) que permitiesen obtener material génico suficiente. De esta manera se tomaron diferentes cantidades en función del área de tumor disecada, parámetro que era calculado por el software del programa (Figura 27).

Una vez optimizados los parámetros anteriores, se microdisecaron los 65 casos (Figuras 28). El material disecado iba siendo recogido en la tapadera del tubo Eppendorf colocado debajo del portaobjetos y donde se colocaba una gota de solución preservadora de ARN (Figuras 29).

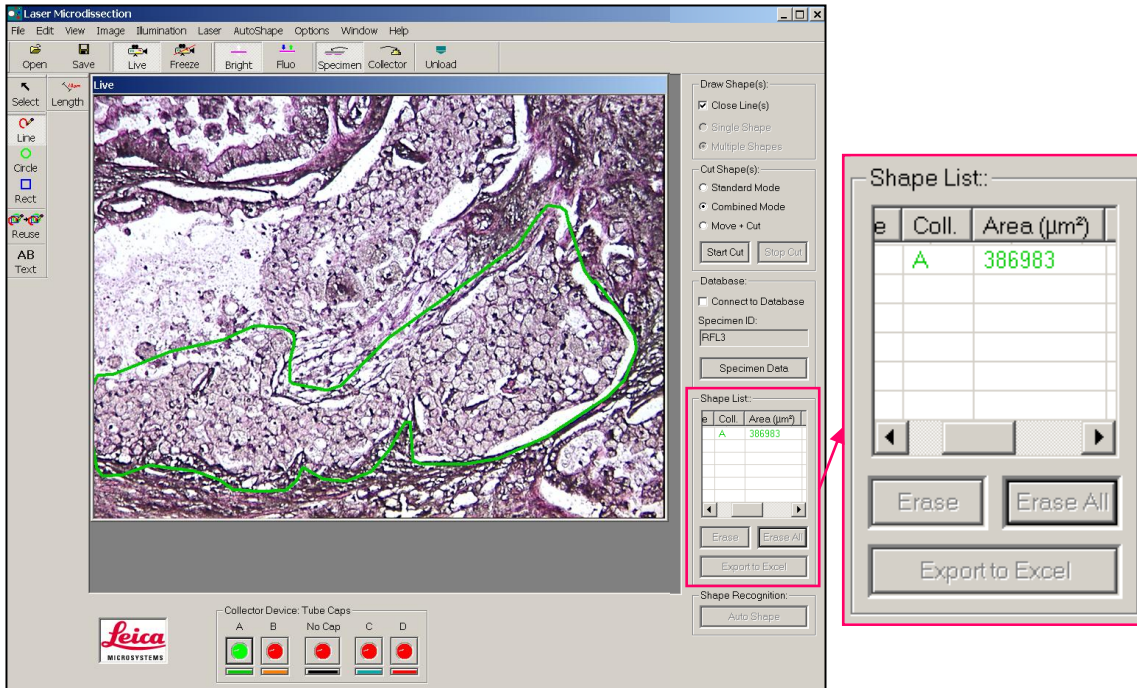


Figura 27: Programa informático del microdisector láser. En él se selecciona la zona de corte (marcada en verde) y calcula dicha área para cortar.

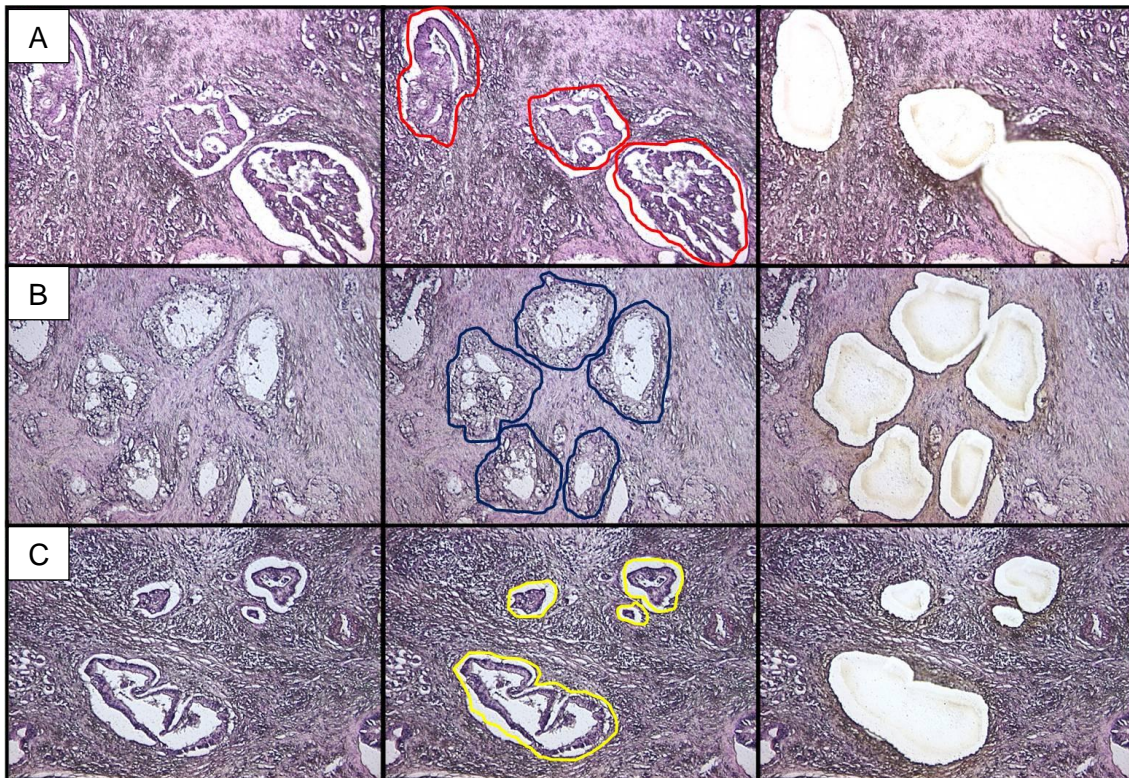


Figura 28: Tres ejemplos de casos utilizados para la microdissección.

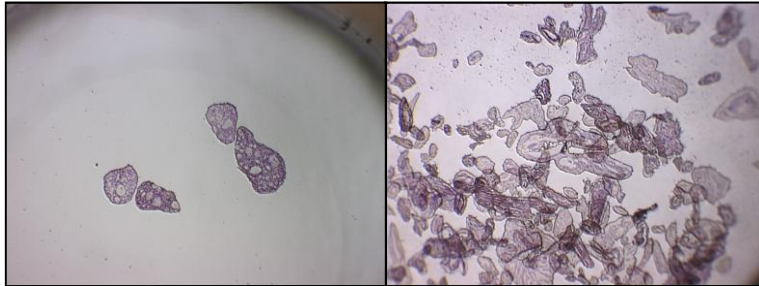


Figura 29: Material tumoral microdisecado recogido en la tapa del tubo Eppendorf.

5. Obtención de ARN

Para la optimización de los métodos para la obtención de ARN de la mejor calidad posible se probaron 2 kits diferentes de extracción:

- High Pure FFPE RNA Micro Kit de Roche
- RNA isolation from FFPE Samples de Macherey-Nagel

Se analizaron los resultados en 2 muestras del mismo caso cortadas en iguales condiciones obteniéndose ARN con menor degradación en el primero.

Tras las primeras comprobaciones se observó que las concentraciones de ARN obtenidas eran bajas (menores de 5 ng/ μ L), existiendo además gran variabilidad entre las diferentes muestras. Para mejorar la eficiencia se ajustó el protocolo de extracción del kit de manera que, una vez digerida la muestra con proteinasa K, se cargaba en una columna y el filtrado obtenido a su vez se cargaba en una segunda columna, continuándose el procesado con las dos en paralelo. También se cambió la elución de la

muestra en la columna: calentamos el tampón de elución (agua Gibco RNase free) a 55°C, añadimos 50µL por columna y se incubó 5 minutos antes de la última centrifugación. De esta forma se mejoró considerablemente la cantidad obtenida de ARN manteniendo la calidad de la muestra.

5.1. Comprobación de la degradación del ARN

Además de la cantidad, se comprobó la calidad del ARN de todos los casos para corroborar que era suficiente. La degradación del ARN se verificó en un gel de agarosa y con un bioanalizador. Los resultados mostraron que estaba muy degradado, como era de esperar, al no poderse identificar los picos correspondientes a los ARNs ribosómicos y detectarse que todo el ARN estaba fragmentado (Figura 30).

5.2. Amplificación del ARN

Dado que la cantidad de ARN obtenido era insuficiente para ser analizado mediante los microchips seleccionados (“HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Illumina), se amplificó el ARN mediante un sistema que mantiene las proporciones de cada uno de los ARNs en la muestra y permite obtener cantidad de ARN suficiente como para poder utilizar dichos chips. El kit empleado fue el kit “Sensation TM RNA Amplification kit” de Genisphere, usando un protocolo específico para muestras obtenidas de parafina en el cual se utilizaban 10ng de ARN para obtener más de 1.000 ng en total. Este extremo se comprobó en 12 muestras obteniéndose resultados totalmente fiables.

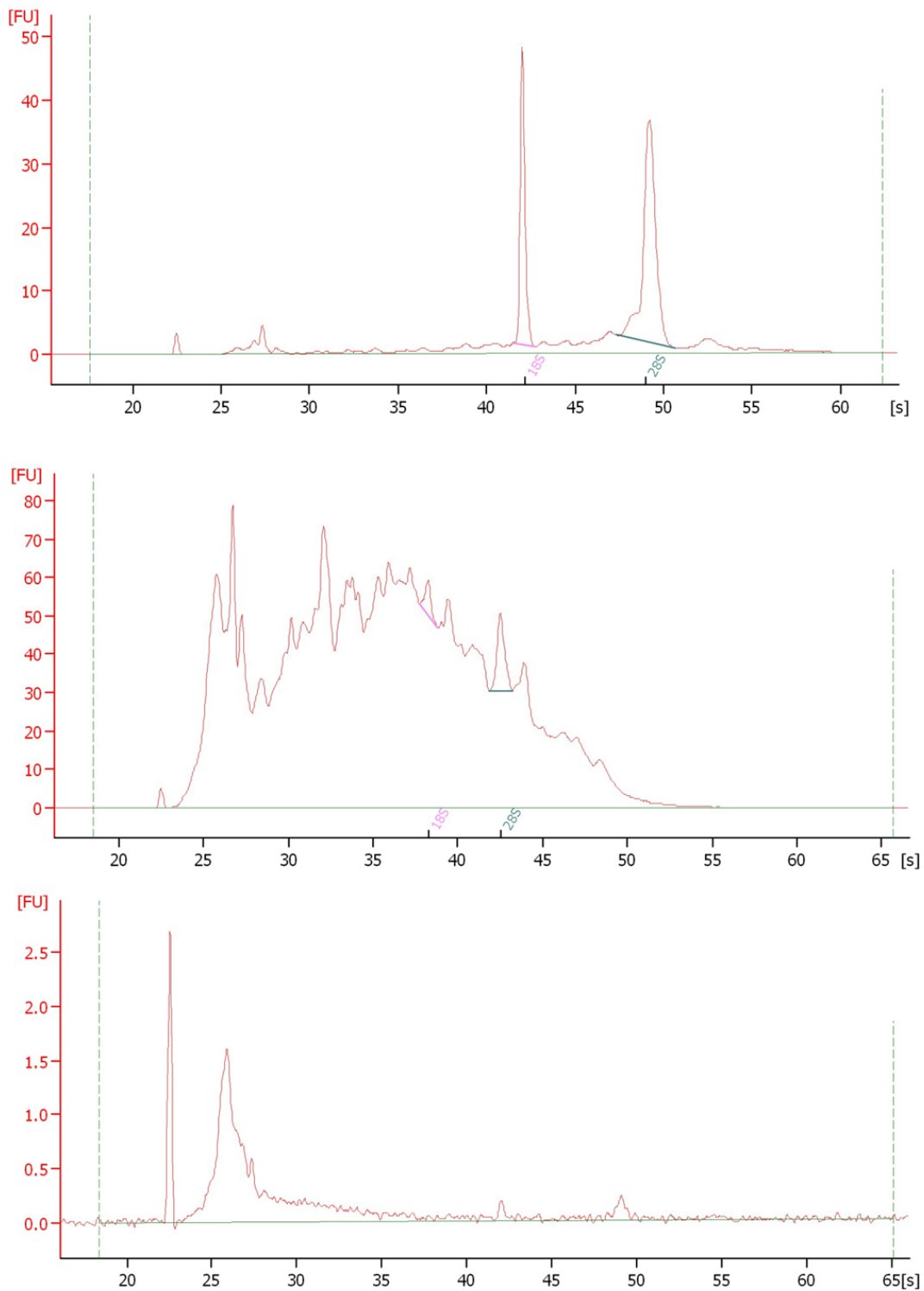


Figura 30: Imagen del bioanalizador para control de calidad del ARN. La gráfica superior es la forma ideal de ARN, la segunda es un ARN parcialmente degradado, y la tercera corresponde a un ARN totalmente degradado.

6. Análisis mediante microchips

Todas las muestras seleccionadas fueron analizadas mediante el microchip HumanHT-12 v3 Expression BeadChip que utiliza el sistema DASL HT FFPE ASSAY KIT (ambos de Illumina) http://support.illumina.com/array/array_kits/humanht-12_v4_expression_beadchip_kit.ilmn (Figura 31 y 32).

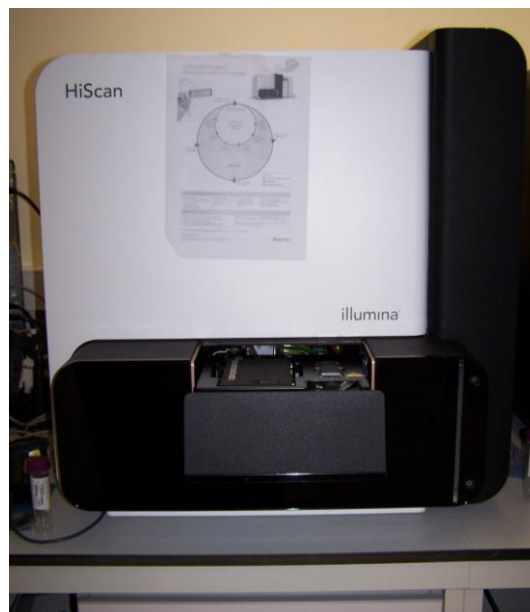


Figura 31: Imagen del sistema de análisis de Illumina.

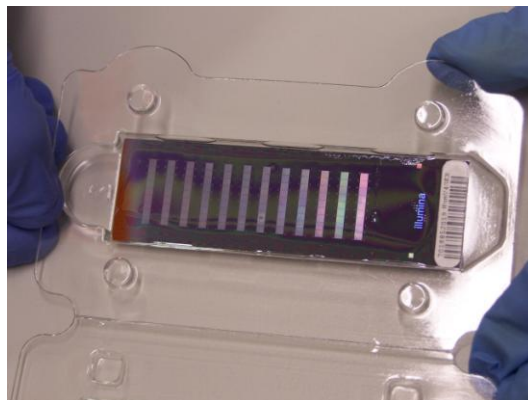


Figura 32: Plataforma 15018363_A_WGDASL_HT. Cada “línea” corresponde a un array diferente. Esta plataforma permite el análisis de 12 muestras simultáneamente.

7. Estudio estadístico

El análisis de los microarrays de expresión fue realizado mediante el paquete Beadarray para identificar la posible asociación entre los niveles de ARN de todos los genes estudiados y la supervivencia de los pacientes mediante diferentes estrategias:

- Según supervivencia mayor o menor de 24 meses.
- Selección de muestras con estadio 2B, y comparar según supervivencia.
- Comparación según afectación del margen retroperitoneal con la supervivencia.
- Selección de las 10 muestras de los pacientes con más supervivencia y las 10 con menos supervivencia e identificación de los genes que se relacionen con esta situación.

Previo al análisis los datos se pre-procesaron, lo cual supone el ajuste del ruido de fondo y la normalización de los chips. Este pre-procesamiento supone un análisis de la calidad de los chips y permite decidir si es necesario eliminar alguno de ellos del estudio. Se ajustó el ruido de fondo y se normalizaron los datos para permitir la comparación de los resultados entre los distintos microchips.

Por último, se realizaron los estudios estadísticos específicos mediante el programa Limma, para la determinación de perfiles de expresión y estudio de los genes cuya expresión se encuentre alterada, correlación entre el perfil de expresión y período

libre de enfermedad y supervivencia e identificación de los genes o sistemas funcionales que puedan tener una mayor relevancia.

Para las 4 comparaciones se aplicó un filtro no específico, ya que lo normal es que la mayoría de los genes del array no se expresen. Por ello aplicamos un filtro en el cual eliminábamos sondas con baja variabilidad entre las muestras y que tenían más de un valor determinado de fluorescencia (es decir, que se expresaran). Lo que hicimos fue seleccionar las sondas que tuviesen más de 100 unidades de fluorescencia en al menos el 25% de las muestras.

VI. Resultados

VI. RESULTADOS

1. Datos clínicos

Inicialmente se disponía de 76 pacientes diagnosticados y operados por ACDP en el Hospital Clínico Universitario de Valencia entre 1998 y 2010 con seguimiento completo. De ellos, 5 casos fueron excluidos por no tener acceso al material parafinado o estar éste deteriorado. Otros 3 mostraban escasas células tumorales lo que hacía imposible obtener cantidad suficiente de células mediante microdissección y otros 3 fueron descartados por tener un componente escamoso o neuroendocrino. Los 65 casos restantes fueron finalmente analizados (Figura 33). En la Tabla 5 se resumen los datos clínicos e histológicos.

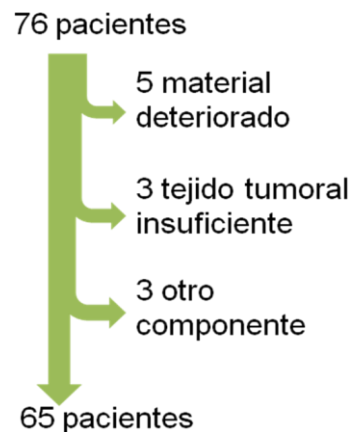


Figura 33: Diagrama del número de casos utilizados.

Dependiendo de las diferentes estrategias sobre las que se ha basado el análisis génico, se han utilizado un número diferente de muestras: según las características de cada tumor, el rendimiento de la extracción de ARN sobre las muestras parafinadas ha

RESULTADOS

sido diferente, de manera que aquellos tumores que sólo presentaban glándulas muy aisladas o escasas células tumorales, la microdissección no consiguió extraer células suficientes.

En la primera estrategia de análisis, supervivencia mayor o menor de 24 meses, se obtuvieron 36 muestras válidas para su análisis. Para la segunda estrategia (pacientes con estadio IIb) se obtuvieron 16 muestras válidas. Para la tercera comparación según la afectación del margen retroperitoneal, se obtuvieron 37 muestras válidas. Finalmente para la última estrategia, comparación de muestras de los 10 pacientes con mayor supervivencia frente a los 10 pacientes con menor supervivencia, se utilizaron 20 muestras válidas.

Tabla 5. Datos clínicos e histológicos de los casos que fueron analizados en el estudio.

	Media	SD
Edad (años)	64,5	7,68
Sexo (H/M)	41/24	
Seguimiento (meses)	24,7(18*)	25,56
Tamaño (cm)	3,03	1,4
LNR	0,16	0,24
Adenopatías positivas	1,85	2,97
	Si	No
Invasión linfovascular	41	24
Invasión perineural	45	20
Margen retroperitoneal	R1:28	R0: 37
SD: Desviación estándar		
LNR: Lymph Node Ratio		
R1: resección incompleta (margen afecto)		
R0: resección completa (margen libre)		
* mediana		

2. Normalización de los resultados

Los datos no normalizados (Figura 34A) muestran que la intensidad y su variación en los chips considerados como correctos son adecuadas. Estos valores han sido normalizados para un correcto análisis de los datos (Figura 34B).

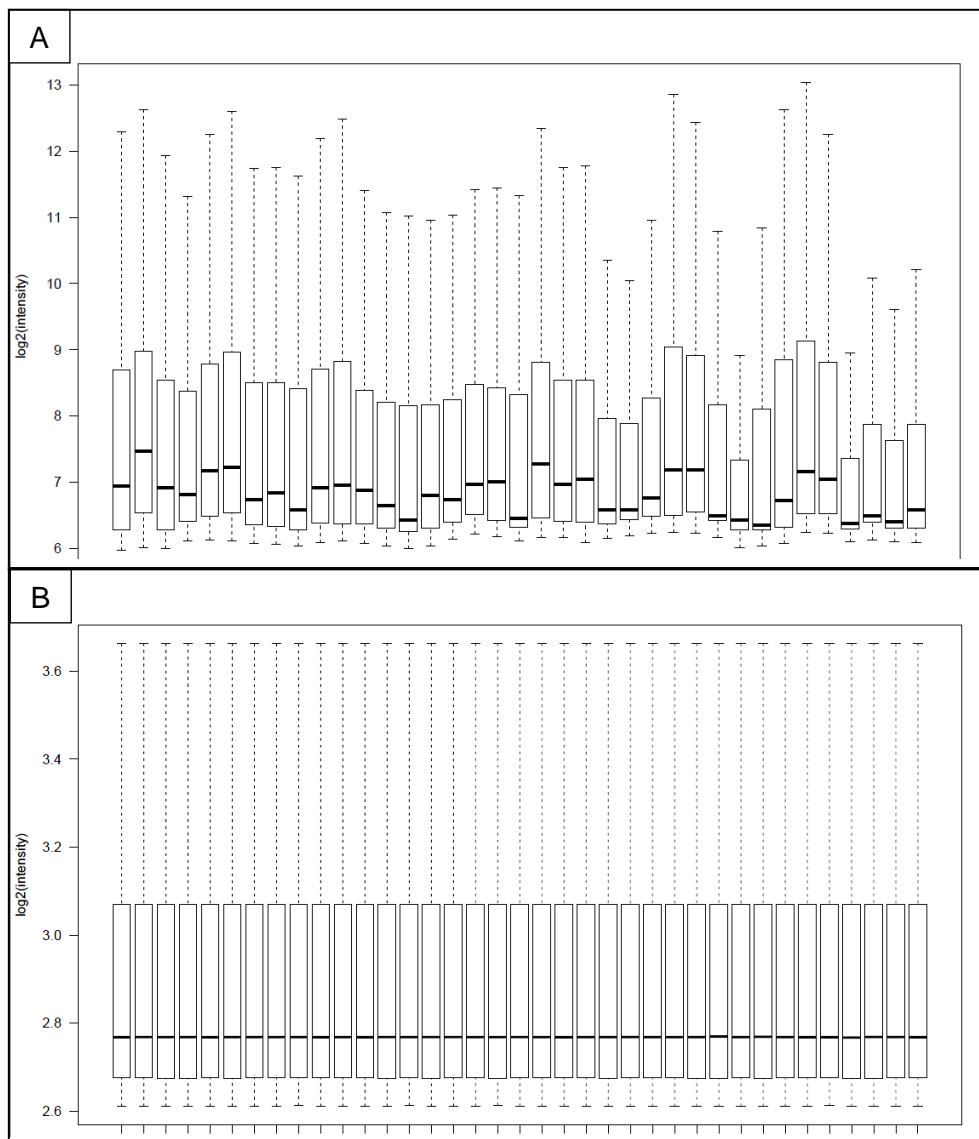


Figura 34: Intensidades de señal y desviación obtenidas en varios de los chips analizados. A: Datos no normalizados; B: Datos normalizados.

RESULTADOS

3. Clustering

Se han obtenido los niveles de expresión de todos los genes en las diferentes muestras. Pese a ser muestras microdisseccionadas, se han obtenidos resultados válidos en la mayoría de las muestras analizadas (Figura 35).

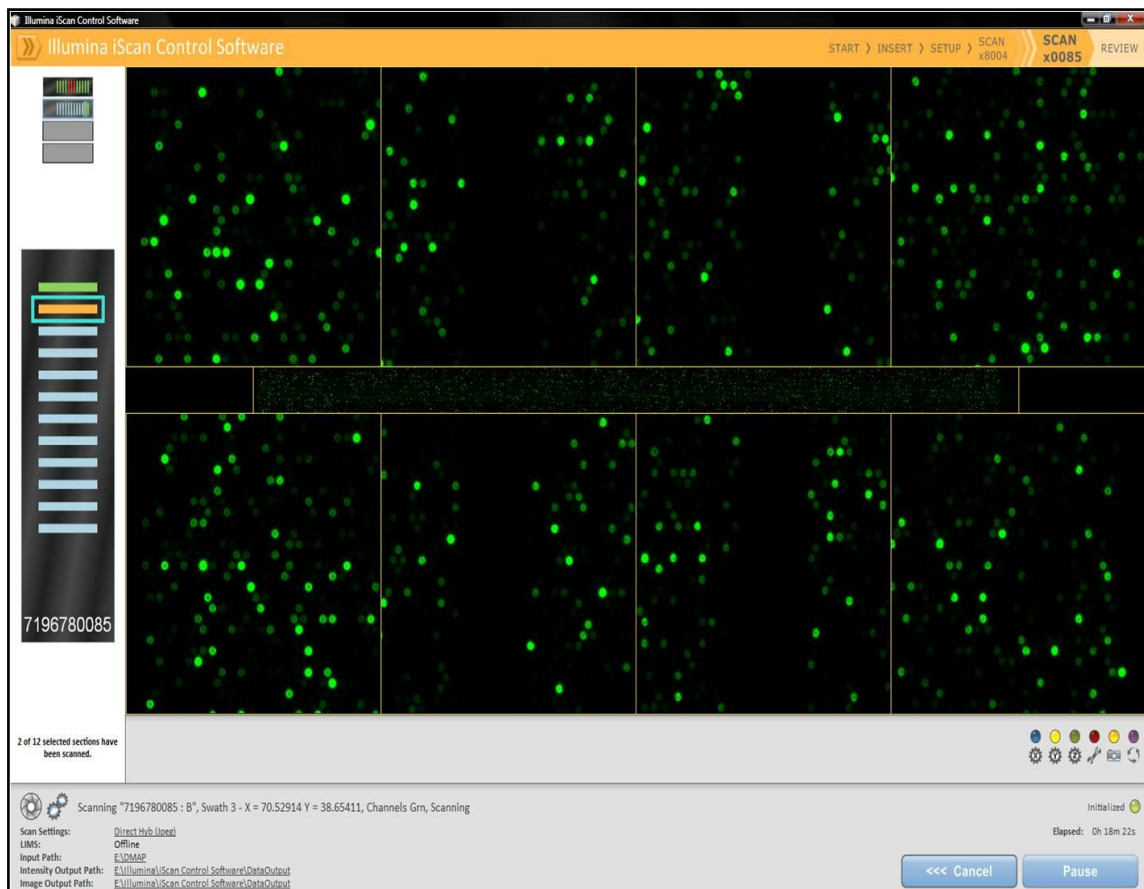


Figura 35: Resultados obtenidos del análisis de microarrays.

Con estos datos hemos estudiado la posible agrupación de las muestras formando “clustering” en base a los resultados obtenidos para ver homologías y diferencias entre ellas. Para esto hemos utilizado las 4 estrategias mencionadas anteriormente, siendo estos los resultados (Figura 36-39).

Los resultados muestran que hemos encontrado que los niveles de ARNm de numerosos genes presentan una asociación con los niveles de supervivencia con valores de p del orden de 10^{-4} (Tabla 6-9). Sin embargo, estos valores de p se obtienen de comparar cada gen de manera independiente. Es por ello que al ajustar el valor de p para comparaciones múltiples, este valor no resulta ser significativo.

Tabla 6. Resultados obtenidos al analizar las muestras en base a la supervivencia

ID	logFC	p	p ajustado	Gen
610129	0,9456	8,87E-05	0,7445	ZSCAN29
380671	1,2378	1,46E-04	0,7445	NCRNA00093
780356	1,6249	1,62E-04	0,7445	CCL24
20152	1,3925	1,89E-04	0,7445	GABRA2
6270706	1,0232	2,14E-04	0,7445	SMG7
4210300	1,3655	3,53E-04	0,7638	JMJD4
4200438	1,3621	3,86E-04	0,7638	VWA2
270114	1,6743	4,38E-04	0,7638	FAM134B
780035	1,7025	4,61E-04	0,7638	SYTL2
5870301	1,4540	4,62E-04	0,7638	KIAA0513
1470669	-1,3863	4,83E-04	0,7638	TNC
5670398	1,0184	5,81E-04	0,7958	EDEM3
7550324	1,3652	6,44E-04	0,7958	SHROOM2
1440575	1,1639	7,55E-04	0,7958	OSBPL7
10392	1,0257	7,67E-04	0,7958	LRRC23
1300706	-1,4171	7,73E-04	0,7958	MTHFD2
3940152	1,0650	7,78E-04	0,7958	C22ORF40
290377	1,3175	8,88E-04	0,8141	FOXD4
10324	0,9035	9,71E-04	0,8141	PRR16
4120154	0,9948	9,72E-04	0,8141	EIF2AK1

ID: código de identificación.
logFC: logaritmo del Fold Change.

Tabla 7. Resultados obtenidos al analizar las muestras en estadio 2B según la supervivencia

ID	logFC	p	p ajustado	Gen
270538	2,7703	5,343E-07	0,0092	PMP22
4290360	-2,4736	4,602E-05	0,3876	CLEC4F
1090561	-2,1393	6,788E-05	0,3876	GSTA1
3370482	-2,2107	9,687E-05	0,4066	CYP2B7P1
1690008	-2,0740	1,187E-04	0,4066	KPRP
4050040	3,1367	1,564E-04	0,4466	TUBB3
1110300	2,1840	2,367E-04	0,5240	TMEM154
2810687	2,9706	2,447E-04	0,5240	LRRC14
5560288	-2,3243	2,892E-04	0,5505	ZNF599
50497	1,8880	3,782E-04	0,5792	MFI2
2570551	1,9614	3,893E-04	0,5792	JUP
4290209	1,9781	4,601E-04	0,5792	TMC6
7100181	-2,0633	4,792E-04	0,5792	GUCA2A
5080551	-1,6581	5,017E-04	0,5792	SCN5A
2570747	-1,4801	5,370E-04	0,5792	LOC650293
4590577	-1,7760	5,409E-04	0,5792	ATP8A2
4120673	-1,5714	6,410E-04	0,5816	TRIM14
4150014	1,4671	6,665E-04	0,5816	CEACAM1
4050427	-1,3102	6,983E-04	0,5816	IHPK3
290377	-2,1838	7,361E-04	0,5816	FOXD4

ID: código de identificación.
logFC: logaritmo del Fold Change.

RESULTADOS

Tabla 8. Resultados obtenidos al analizar las muestras en base al margen retroperitoneal

ID	logFC	p	p ajustado	Gen
4850521	1,2078	1,212E-05	0,2108	NUP35
3290008	1,7490	2,997E-05	0,2362	ERN1
1300706	1,5897	4,074E-05	0,2362	MTHFD2
3800603	1,5245	1,601E-04	0,6959	WWP2
2630220	1,1794	2,275E-04	0,7915	SEPSECS
4040672	1,5671	3,642E-04	0,8061	DDX47
3710086	-1,3024	4,017E-04	0,8061	DHRS12
2850184	0,7790	4,125E-04	0,8061	CTBS
5290598	0,9515	4,781E-04	0,8061	ABC9
6060706	1,1708	5,948E-04	0,8061	ATP11B
6940280	1,1326	6,775E-04	0,8061	GPR177
4850538	1,7972	6,856E-04	0,8061	PAOX
5910019	1,2849	7,261E-04	0,8061	C1QB
4920669	1,0422	7,503E-04	0,8061	OXSRI
2760403	0,9252	9,173E-04	0,8061	GABRE
5670400	1,1898	9,677E-04	0,8061	PEPD
150176	1,1637	1,225E-03	0,8061	OSGEP
2850392	-0,8316	1,288E-03	0,8061	FLJ10996
2900053	-0,9113	1,382E-03	0,8061	CSF2RA
6040626	1,4426	1,439E-03	0,8061	CA9

ID: código de identificación.
logFC: logaritmo del Fold Change.

Tabla 9. Resultados obtenidos al analizar las 10 muestras con más supervivencia vs las 10 con menos

ID	logFC	p	p ajustado	Gen
780356	-2,4764	2,61E-05	0,4489	CCL24
7560288	-1,7528	1,06E-04	0,5449	DCUN1D3
610358	1,4053	1,12E-04	0,5449	PGS1
4590025	-2,7027	1,27E-04	0,5449	TPSG1
4810114	-1,6788	2,87E-04	0,8115	MGC12982
4290626	1,1557	3,66E-04	0,8115	MEST
5910392	1,4454	3,77E-04	0,8115	RPRD1B
150349	-1,6526	4,30E-04	0,8115	PHKB
620577	-2,2794	4,56E-04	0,8115	ACSL5
1190470	-2,5752	4,83E-04	0,8115	PPFIA2
6290707	-1,7170	7,10E-04	0,8115	SERPINB5
5560398	-1,1275	7,20E-04	0,8115	DEGS1
4120240	-2,0837	7,42E-04	0,8115	C12ORF36
7650343	1,7115	7,55E-04	0,8115	USP47
3460086	-1,1664	7,76E-04	0,8115	SSH1
6270082	-1,2572	9,42E-04	0,8115	MPZL3
1110382	-1,2445	9,51E-04	0,8115	ANKS4B
7200041	1,0216	1,04E-03	0,8115	PPT1
1500056	-1,4230	1,04E-03	0,8115	DKFZP686I15217
1780132	-1,1243	1,05E-03	0,8115	TFAP2A

ID: código de identificación.
logFC: logaritmo del Fold Change.

Estas gráficas muestran una gran diversidad en los niveles de ARNm entre los diferentes tumores. Por otro lado, hay que señalar que los *clusters* son pequeños y que no incluyen muestras de nivel similar de supervivencia.

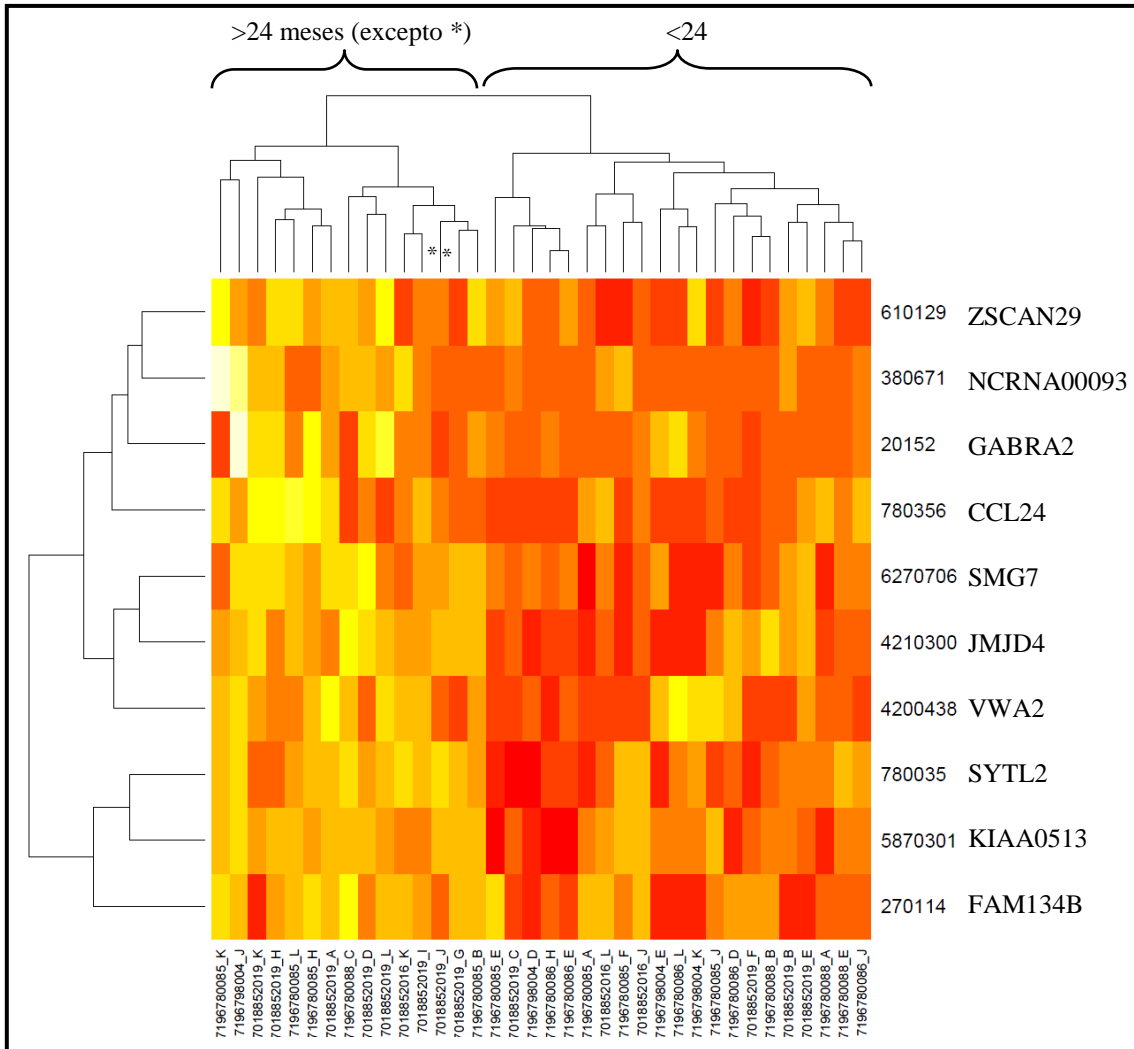


Figura 36: Dendograma realizado con 36 muestras en relación a la supervivencia (mayor o menor de 24 meses). A la derecha resumen de 10 de los genes obtenidos.

RESULTADOS

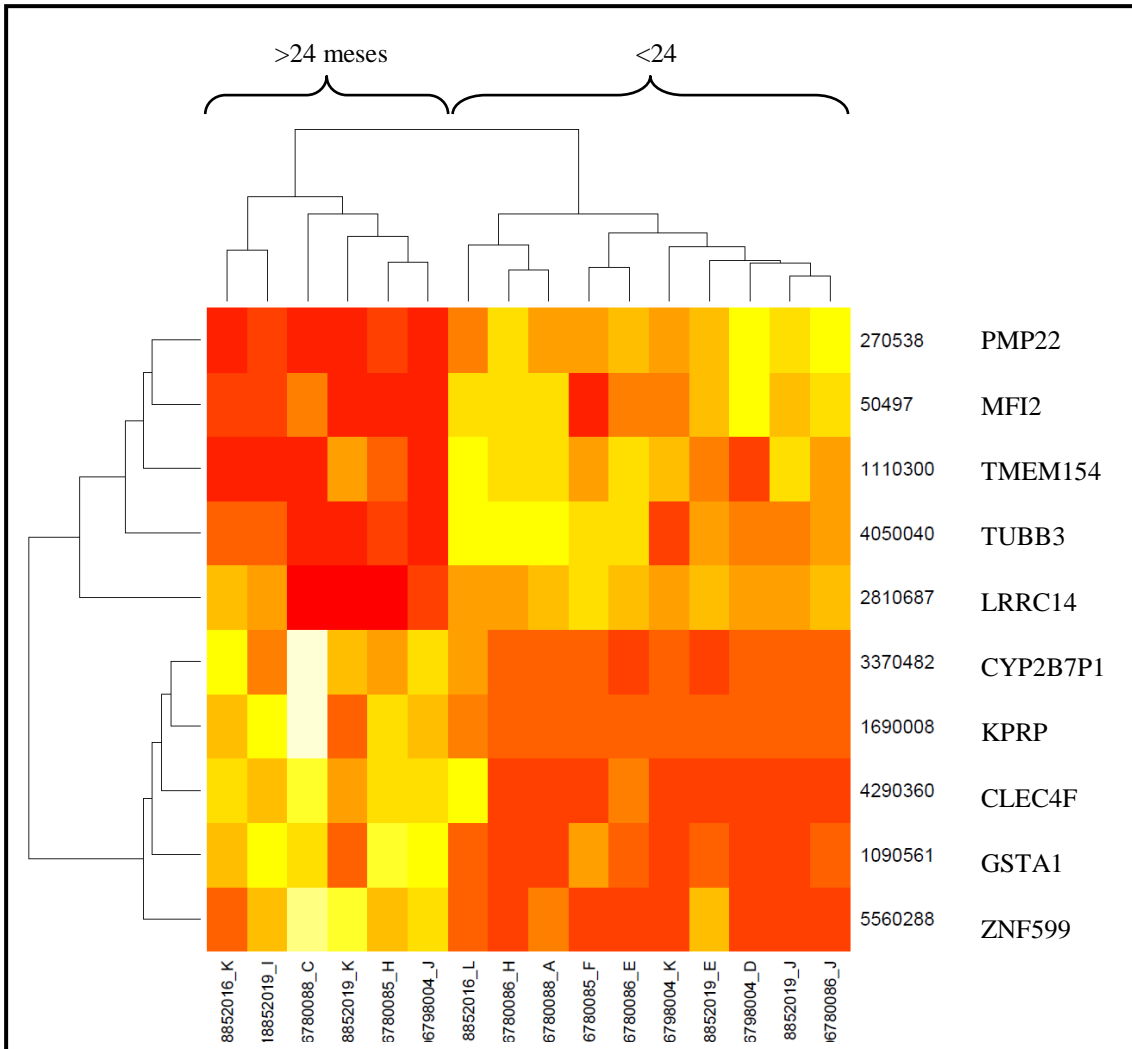


Figura 37: Dendrograma realizado con los casos en estadio 2B (16 muestras).

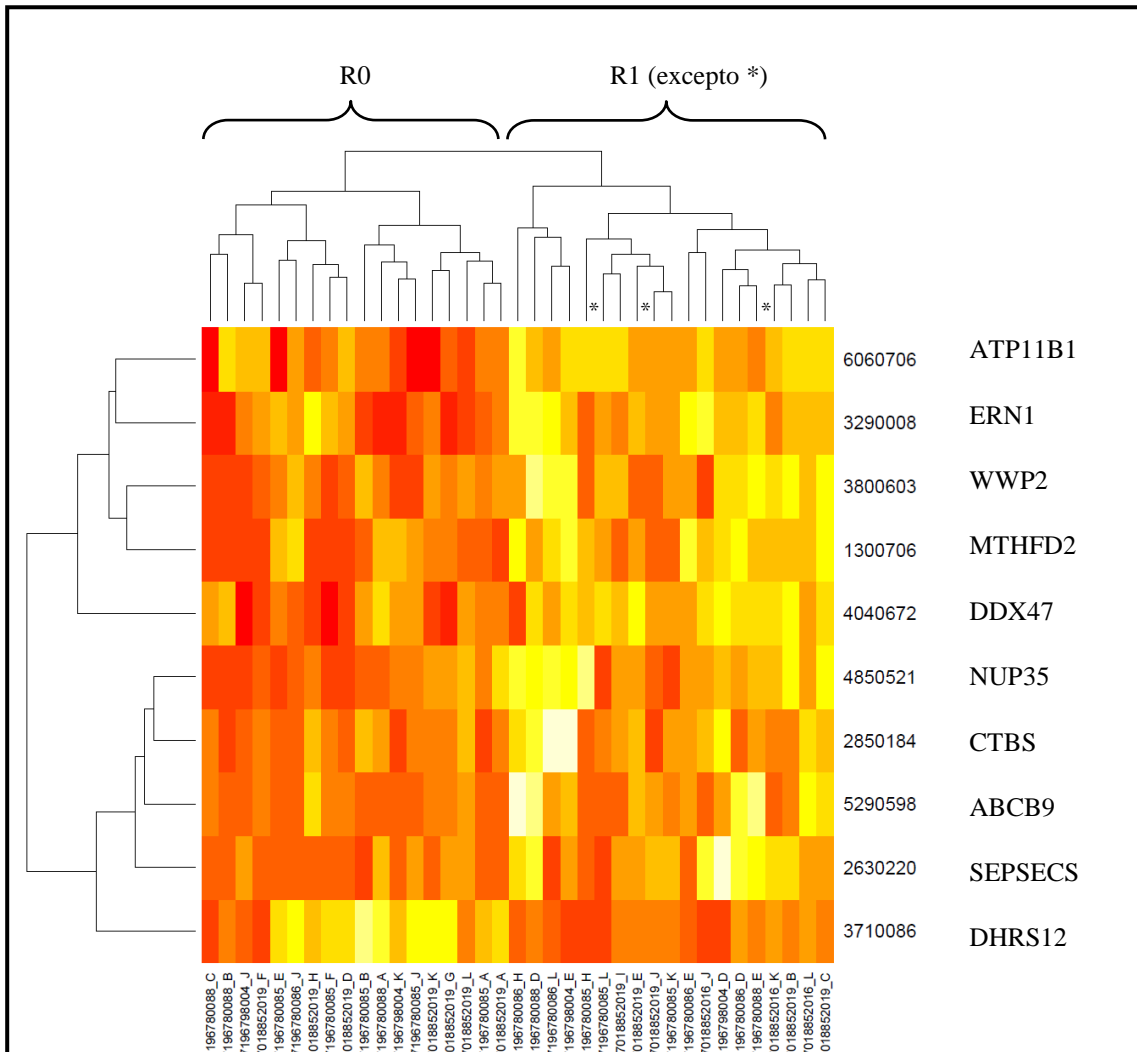


Figura 38: Dendograma realizado en relación al status del margen retroperitoneal (37 muestras).

RESULTADOS

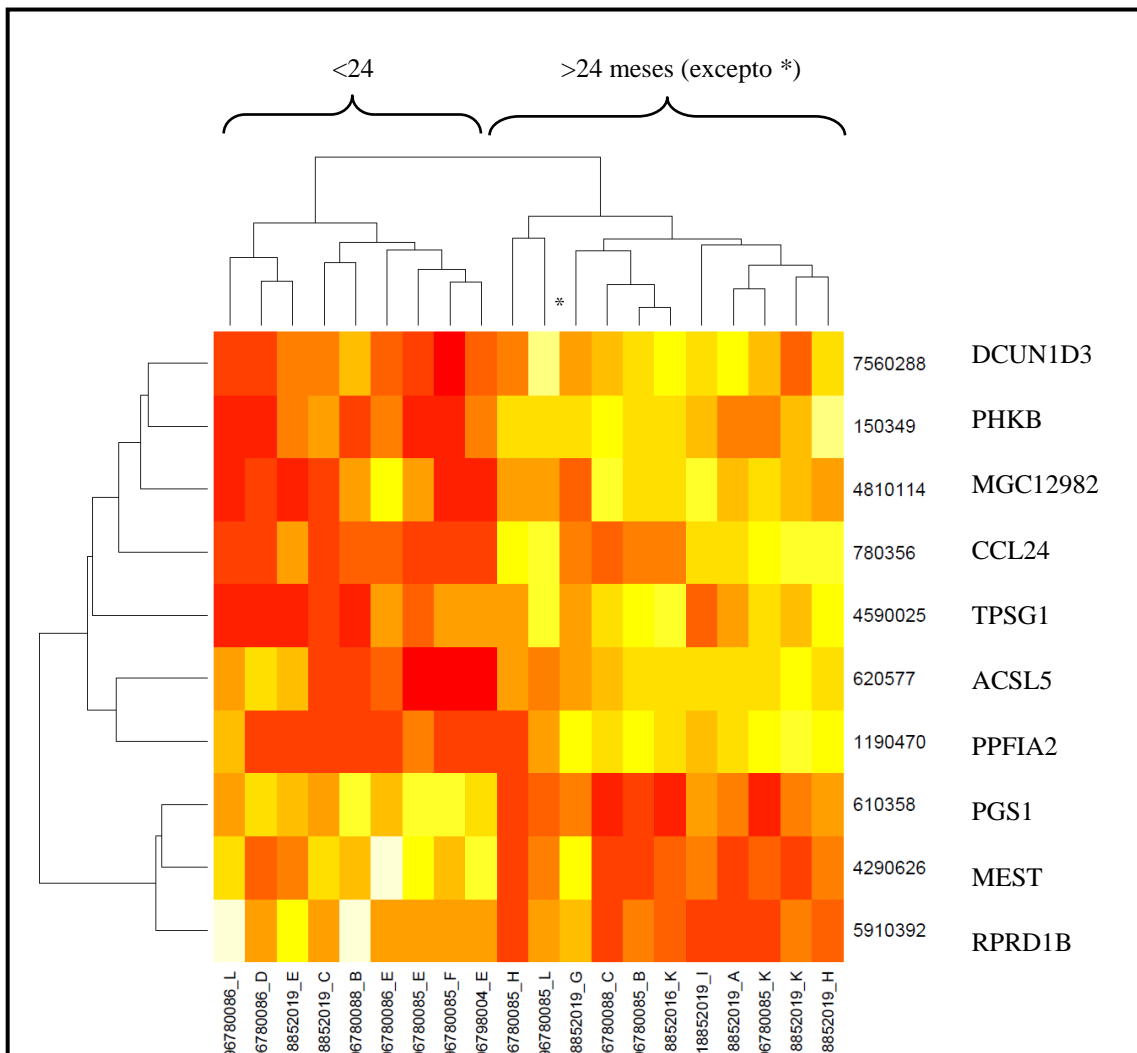


Figura 39: Dendrograma realizado en función de la máxima diferencia en supervivencia (20 muestras).

VII. Discusión

VII. DISCUSIÓN

1. Aspectos clínicos

El cáncer de páncreas supone uno de los mayores retos oncológicos de la actualidad. La incidencia de estos tumores está aumentando exponencialmente en los últimos años y, aunque la cifra global de pacientes es mucho menor que la de otros tumores como la mama, el pulmón o el colon, ya es la cuarta causa de muerte por cáncer con cifras de supervivencia a 5 años menores del 5%, lo cual no es más que el reflejo de su gran letalidad¹.

Para nuestro estudio incluimos 76 pacientes que habían sido diagnosticados y operados en nuestro centro entre 1998 y 2010. De ellos, sólo obtuvimos material de suficiente calidad para su análisis en 65 de ellos, bien porque el material estaba degradado, era insuficiente o mostraba algún otro componente tumoral diferente del tipo ductal.

La media de edad de nuestros pacientes fue de 64,5 años, con un rango entre 42 y 81 años. El 63% de los pacientes eran hombres. El seguimiento medio fue de 24,7 meses con una mediana de 18 meses. Los tumores resecados tenían un tamaño medio de 3,03 cm (con un rango entre 1 y 7 cm). El número medio de adenopatías aisladas en cada pieza fue de 8,15 adenopatías, con una mediana de 10 ganglios por paciente y una media de afectación metastásica de 1,85 (con una variación entre 0 y 17). El LNR medio fue de 0,16. Se detectó invasión linfovascular en 41 casos (63%) y perineural en

45 casos (69%). El margen retroperitoneal estaba afecto en 28 casos (43%). Todos estos datos clínicos e histológicos de los 65 pacientes están resumidos en la Tabla 5 mostrada en el apartado de resultados.

2. Dificultades para la obtención de ARN

2.1. Peculiaridades de las muestras de cáncer de páncreas

El estudio de perfiles de expresión en muestras de tejido pancreático plantea 2 problemas específicos y únicos de este órgano: los altos niveles de ARNasas y otras enzimas pancreáticas así como la baja celularidad neoplásica de la mayoría de estos cánceres.

El contenido de ARNasas del tejido pancreático podría interferir en la extracción de ARNm para estudios de expresión. Sin embargo, las ARNasas son un producto de secreción mayoritario de las células acinares, las cuales suelen perderse en las neoplasias, bien por atrofia, bien por destrucción.

Por otro lado y como ya hemos comentado con anterioridad, las piezas de resección por ACDP están compuestas de una minoría de células epiteliales tumorales rodeadas de un estroma no neoplásico fibroso denso predominante, que contiene fibroblastos activos, vasos pequeños, células inflamatorias y componentes atróficos residuales atrapados de los órganos invadidos, una característica casi exclusiva del ACDP^{137,138}. La microdissección es un método que permite la purificación del componente epitelial para realizar estudios de perfiles de expresión.

No obstante, esta característica de los ACDP permite comparar perfiles de expresión entre muestras completas y microdisecadas, de lo que se obtienen datos interesantes sobre la interacción tumor-estroma^{137,138}.

2.2. Muestras de tejido en parafina

La extracción de ARN en tejidos parafinados supone un reto importante, ya que el ARN es muy sensible y se degrada fácilmente. Es por ello que la mayoría de estudios se realizan sobre tejido congelado. Sin embargo, el número de piezas de resección y la disponibilidad de tejido congelado pancreático a veces está limitada y requiere mucho tiempo para conseguir un tamaño muestral amplio. Por el contrario, las muestras en parafina son la herramienta común de uso en todos los laboratorios de anatomía patológica, por lo que la disponibilidad de éstas es mucho más amplia. Actualmente se disponen de kits comerciales que permiten la extracción de ARN de muestras parafinadas.

Otro problema añadido es la escasa cantidad de ARN obtenido mediante microdissección. Esto puede ser solventado con métodos de amplificación, los cuales no introducen errores significativos, ya que mantienen las proporciones obtenidas²³⁷.

3. Revisión de los perfiles de expresión génica en el ACDP

El número de estudios publicados en la literatura internacional sobre perfiles de expresión del ACDP ha crecido de forma exponencial en los últimos años. Prueba de ello es el resultado obtenido al realizar una búsqueda en Pubmed²³⁸ tras introducir los

siguientes términos: “*gene*”, “*expression*”, “*profiling*”, “*pancreatic*” y “*cancer*” y analizarlo por años tal y como se muestra en la Tabla 10.

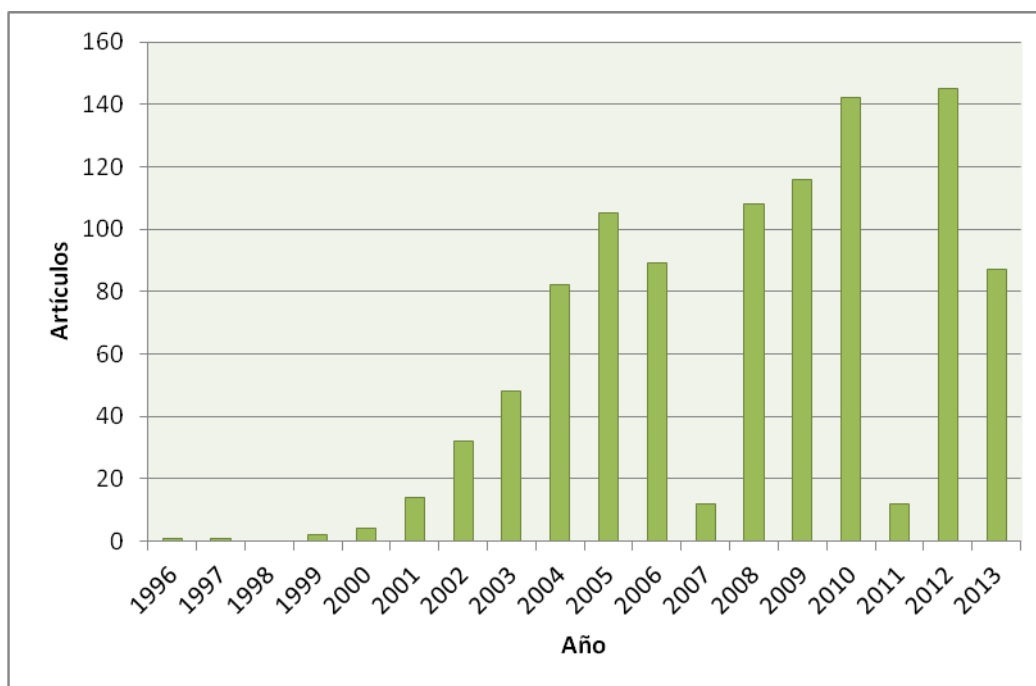


Tabla 10: Artículos publicados en Pubmed²³⁸. Resultados obtenidos desde 1996 hasta 2013 introduciendo las palabras “*gene*”, “*expression*”, “*profiling*”, “*pancreatic*” y “*cancer*”.

Estas publicaciones han generado un número considerable de genes diferencialmente expresados en el ACDP. Estos estudios han utilizado tejidos tumorales y sanos al completo, células ductales microdisecadas, líneas celulares y xenotransplantes. Además, no sólo se han estudiado las diferencias entre el tejido sano y tumoral si no que también se han estudiado las diferencias de expresión con el estroma y con otras entidades no neoplásicas como la pancreatitis crónica, la cual supone uno de los diagnósticos diferenciales más difíciles e importantes del ACDP. En la Tabla 11 se resumen todos los estudios publicados en la literatura internacional y analizados en este estudio (Tabla 11).

Tabla 11. Estudios publicados en la literatura internacional sobre perfiles de expresión en el ACDP.

Autor	Año	Método	Genes	Tipos de muestras y características
Zhang <i>et al.</i> ¹⁴⁴	1997	SAGE	500	2PT, 2LPT, 2LTT, 2TT, 2TN
Zhou <i>et al.</i> ¹⁴⁷	1998	SAGE	183	10PT
Argani <i>et al.</i> ²³⁹	2001	SAGE	1	4PT, 20LPT, 6PT
Argani <i>et al.</i> ¹⁴⁵	2001	SAGE database	3	4LPT
Crnogorac-Jurcevic <i>et al.</i> ¹⁴⁸	2001	Microarray de ADN	187	6PT. PAAF
Friess <i>et al.</i> ²⁴⁰	2001	Array de ADN	152	8PT, 8PC, 8PN
Ryu <i>et al.</i> ¹³⁷	2001	SAGE	74	2PT, 2LPT, 2LTT, 2TT, 2TN
Crnogorac-Jurcevic <i>et al.</i> ¹³⁶	2002	Microarray de ADN	15	3PT Microdissección láser
Han <i>et al.</i> ²⁴¹	2002	Microarray de ADN	58	9LPT
Iacobuzio-Donahue <i>et al.</i> ¹⁵⁰	2002	Oligonucleótidos	97	8LPT, 14PT, 11PN, 22TN
Ryu <i>et al.</i> ¹⁴²	2002	SAGE	86	6LPT, 2LPN, 2PT
Crnogorac-Jurcevic <i>et al.</i> ²⁴²	2003	DNA array	75	9PT, 3LPT, 3PN
Friess <i>et al.</i> ²⁴³	2003	Microarray	808	PT, PC, PN
Grützmann <i>et al.</i> ²⁴⁴	2003	Oligonucleótidos	81	7PT, 3PN, 1LPN, 5LPT Microdissección láser
Grützmann <i>et al.</i> ²⁴⁵	2003	Librerías públicas y propias	222	4 millones tags
Iacobuzio-Donahue <i>et al.</i> ²⁴⁶	2003	Oligonucleótidos	217	39PT y LPT, 7PC, 25PN, 25TN
Iacobuzio-Donahue <i>et al.</i> ¹⁵¹	2003	Microarray de ADN	149	14LPT, 17PT, 5PN
Logsdon <i>et al.</i> ²⁴⁷	2003	Oligonucleótidos	158	10PT, 5PC, 5PN, 7LPT Microdissección
Tan <i>et al.</i> ²⁴⁸	2003	Microarray de ADN	301	6PT, 6PN
Yoshida <i>et al.</i> ²⁴⁹	2003	Microarray de ADN	27	6JPPT, 3JPPN
Cao <i>et al.</i> ²⁵⁰	2004	Oligonucleótidos	43	50PT, 14LPT, 20PN, 40TN
Binkley <i>et al.</i> ²⁵¹	2004	Oligonucleótidos	107	10PT, 5PC, 5PN, 7LPT Microdissección
Brandt <i>et al.</i> ²⁵²	2004	Meta-análisis	978	11 estudios de microarrays de ADN
Grützmann <i>et al.</i> ²⁵³	2004	Oligonucleótidos	616	11PN, 14PT, 4 LPT Microdissección manual
Grützmann <i>et al.</i> ²⁵⁴	2004	Meta-análisis		
Hustinx <i>et al.</i> ¹⁴⁶	2004	SAGE	395	2PT, 4LPT, 11N (2LPN, otras L y otros TN)
Lu <i>et al.</i> ²⁵⁵	2004	Proteómica	111	12PT, 12PN
Missiaglia <i>et al.</i> ²⁵⁶	2004	Microarray de ADN	337	19LPT, 1LPN
Nakamura <i>et al.</i> ²⁵⁷	2004	Microarray de ADN	606	18PT, 7PN Microdissección láser
Buchholz <i>et al.</i> ²⁵⁸	2005	Oligonucleótidos	1251	39PT, 14PN

DISCUSIÓN

Crnogorac-Jurcevic <i>et al.</i> ²⁵⁹	2005	Proteómica	132	5PT, 5PC, 5PN
Fukushima <i>et al.</i> ²⁶⁰	2005	Oligonucleótidos	20	3PT, 3PC, 3PN Microdissección láser
Grützmann <i>et al.</i> ²⁶¹	2005	Meta-análisis	568	4 estudios
Ishikawa <i>et al.</i> ²⁶²	2005	Microarray de ADN	20	24JPPT, 25JPPN
Jin <i>et al.</i> ²⁶³	2005	Microarray de ADN	184	9PT
Prasad <i>et al.</i> ²⁶⁴	2005	Microarray de ADN	49	6PT, 6PN Microdissección láser
Segara <i>et al.</i> ²⁶⁵	2005	Oligonucleótidos	37	12PT, 6PN
Johnson <i>et al.</i> ²⁶⁶	2006	Oligonucleótidos	150	11PT, 14PN
Laurrel <i>et al.</i> ²⁶⁷	2006	ADNc macroarrays	29	6PT, 6LTT*, 3PN
Rogers <i>et al.</i> ²⁶⁸	2006	Oligonucleótidos	37 y 133	6JPPT, 5JPPC, 5JPPN
Nakamura <i>et al.</i> ²⁶⁹	2007	Oligonucleótidos	346/1222 /324/223	3LPT
Nakamura <i>et al.</i> ²⁷⁰	2007	Oligonucleótidos	1222	1LPT Microdissección láser
Niedergethmann <i>et al.</i> ²⁷¹	2007	Oligonucleótidos	1066	1LPT
Kim <i>et al.</i> ²⁷²	2007	Oligo chip	194	10PT
Lowe <i>et al.</i> ²⁷³	2007	Microarray de ADN	293	80 PT, PN, PC
Badea <i>et al.</i> ²⁷⁴	2008	Oligonucleótidos	239	36 PT + [17 ePN, 20 ePT, 9 sPC, 11 sPT] (casos Grützmann <i>et al.</i> ²⁵³ y Pilarsky <i>et al.</i> ²⁷⁷)
Balagurunathan <i>et al.</i> ²⁷⁵	2008	Microarray de ADN	2177	28PT, 103TN
Karanjawala <i>et al.</i> ²⁷⁶	2008	Oligonucleótidos	4	24PT, 4PC, 14TN
Pilarsky <i>et al.</i> ²⁷⁷	2008	Oligonucleótidos	316	11EPT, 9EPC Microdissección
Hirono <i>et al.</i> ²⁷⁸	2009	Microarray	46	20PT Microdissección láser
Stratford <i>et al.</i> ²⁷⁹	2010	Oligonucleótidos	6	30 PT Macrodissección
Collisson <i>et al.</i> ²⁸⁰	2011	Oligonucleótidos	62	27 PT + 36 PT (casos Badea <i>et al.</i> ²⁷⁴) Microdissección
Bournet <i>et al.</i> ²⁸¹	2012	Low density arrays	8	44PT y 17 PC Material de ECO-PAAF

LPT: línea celular de ACDP; LPN: línea celular de páncreas no tumoral; LTT: línea celular de otro tumor; PT: páncreas tumoral (pieza quirúrgica); PN: páncreas normal (pieza quirúrgica); PC: pancreatitis crónica; EPT: estroma de páncreas tumoral (pieza quirúrgica); EPN: estroma de páncreas normal (pieza quirúrgica); TN: tejido no tumoral; TT: tejido tumoral; JPPT: jugo pancreático de sujeto con ACDP; JPPN: jugo pancreático de sujeto sano.

3.1. Historia de los perfiles de expresión

Los primeros estudios publicados en 1997 y 1998 por el grupo de trabajo de Zhang y Zhou de la “*Johns Hopkins University School of Medicine*” de Baltimore^{144,147} utilizaron la tecnología SAGE, con la que obtuvieron una lista de 500 y 183 genes respectivamente, tras estudiar tejido tumoral, tejido sano y líneas celulares. Algunos años después y con la misma técnica, el grupo de trabajo de Ryu *et al.*^{137,142} de la misma institución americana describió 74 y 86 genes diferencialmente expresados utilizando tanto piezas quirúrgicas como líneas celulares.

Posteriormente se desarrollaron otras técnicas basadas en microarrays de ADN. Las primeras publicaciones fueron en el año 2001. Unos de los primeros trabajos de ese año fue el trabajo de Friess *et al.*²⁴⁰ donde estudiaron mediante microarrays 8 casos de ACDP, PC y páncreas normal, identificando 152 genes sobreexpresados en las piezas tumorales.

Otro estudio publicado en el mismo año por el grupo británico liderado por Tatjana Crnogorac-Jurcevic¹⁴⁸ describió 187 genes diferencialmente expresados en el ACDP estudiados en 6 piezas quirúrgicas. Numerosos genes que ya habían sido descritos en páncreas hasta ese momento fueron identificados también en este estudio (*Caspase 8*, *TIMP1*, *CD9*, *IL13*) además de otros tantos no asociados previamente al ACDP como *RAC1*, *GLG1*, *NEDD5*, *RPL13A*, *RPS9* y miembros de la familia del gen *WNT5A*. Un año más tarde el mismo grupo¹³⁶ estudió 3 tumores de páncreas y

describió la expresión diferencial de 15 genes, 11 de ellos sobreexpresados y 4 cuya expresión estaba disminuida. Estos genes intervienen en la regulación del crecimiento, invasión, señalización, desarrollo y ciclo celular. Algunos de ellos ya habían sido descritos anteriormente, como *GAPDH*, *TIMP1*, *MMP7*, *CD59*, *RHOC* y *NDKA*, pero otros no habían sido relacionados con el ACDP hasta el momento. Entre estos se incluían *ABL2*, *NOTCH4*, *Keratin 7*, *COL1A2* y *SOD1*, todos ellos sobreexpresados, así como *Cyclin C*, *E2-CDC34*, *COL6A2* y *XRCC1* cuyos transcritos mostraban disminución de su expresión.

En los siguientes años se sucedieron numerosos estudios como el de Han *et al.*²⁴¹ en el que obtuvieron tras estudiar 9 líneas celulares de ACDP una lista de 58 genes, 30 de los cuales se encontraban sobreexpresados (*MYC*, *RAD51*, *UPAR*, *STK15*, *TRXR1* y *CKS2* entre otros). El estudio de Iacobuzio-Donahue *et al.*¹⁵⁰, pertenecientes al grupo de trabajo del “*Johns Hopkins University School of Medicine*”, describieron 97 genes tras estudiar piezas quirúrgicas y líneas celulares. Estos genes estaban envueltos de una serie de procesos celulares como las uniones intercelulares de membrana (*Claudin 1*, *Connexin 26*), señales de transducción (*TACSTD2*, *RASA1*), homeostasis del calcio (*S100P*), ensamblaje del citoesqueleto (*Fascin*, *Keratin 7*, *Rabkinesin 6* y *Pleckstrin*), adhesión a la superficie celular y reconocimiento (*ITGBL1*), transcripción de ADN (*TOP2A*, *BMAL2* y *AML1*), reparación del ADN (*ATDC*) o remodelamiento y funcionamiento de la ECM (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL11A1*, *SERPINH1*, *MMP14* y *MMP7*).

Otro nuevo estudio del grupo inglés de Tatjana Crnogorac-Jurcevic²⁴² describió 75 genes tras estudiar 9 piezas quirúrgicas y 3 líneas celulares de ACDP y 3 tejidos pancreáticos normales. Dos genes de interés, miembros de la familia S100, fueron descritos y estudiados con mayor profundidad: *S100P* y *S100A6*.

También se han realizado estudios de proteómica para la expresión diferencial de proteínas. El primero de ellos, del grupo de Lu *et al.*²⁵⁵, describió 111 proteínas de las cuales 70 se encontraban sobreexpresadas en las muestras tumorales, destacando proteínas de la familia S100 y la fascina, ya descritas con anterioridad.

Muchos otros estudios basados en distintas técnicas han sido publicados en estos últimos años y sus datos están resumidos en la Tabla 11.

3.2. Microdissección y otros métodos de enriquecimiento celular tumoral

La escasa celularidad de los ACDP ha sido uno de los principales problemas en los estudios de expresión. Una de las alternativas ha sido la utilización de líneas celulares, pero el mayor problema que presentan es la ausencia de interacción con la ECM cuya función es de gran importancia en el mantenimiento y progresión del tumor.

Otra de las medidas para intentar solventar este problema ha sido la realización de PAAF de las piezas para purificar la celularidad tumoral. En el estudio de Crnogorac-Jurcevic *et al.*¹⁴⁸, como ya se ha señalado previamente, se utilizaron 6 piezas quirúrgicas, de las cuales realizaron PAAF en 3 de ellas para enriquecer en un

95% la celularidad tumoral. De esta forma compararon tanto las piezas directamente con el tejido sano como con las muestras de PAAF, obteniendo 149 genes que se sobreexpresaban en ambos casos (en comparación con el tejido sano).

El otro método más utilizado ha sido la microdissección láser (LMD). Fue utilizada por primera vez en páncreas por el grupo inglés de Crnogorac-Jurcevic *et al.*¹³⁶ en 2002.

Otro de los grupos que utilizaron la LMD fue el grupo alemán de Grützmann *et al.*²⁴⁴ en 7 tumores (1 de ellos afectando a la ampolla) que compararon con 3 muestras de tejido sano y 6 líneas celulares (5 tumorales y 1 sana). En total describieron 81 genes expresados diferencialmente, 15 de los cuales habían sido descritos anteriormente en relación con la tumorigénesis del páncreas, como *IFI27*, *MUC5B*, *Tapasin*, *PAP*, *SDF1* y *POVI*. Adicionalmente, otros genes como la *Annexin A1*, *STK15*, *PTGES* y *HMGI-C* habían sido descritos previamente en otras neoplasias.

Numerosos estudios han utilizado también esta técnica de microdissección láser y otras variantes como la microdissección manual o macrodissección^{247,251,253,257,264,270,277,279,280}.

3.3. Meta-análisis

En el año 2004 y 2005 surgieron varios meta-análisis que intentaban analizar la disparidad que existía en los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación tras el amplio uso de las nuevas tecnologías de arrays.

Uno de ellos, publicado por el grupo alemán de Brandt *et al.*²⁵², encontró un total de 978 genes descritos tras analizar 11 estudios de microarrays de ADN publicados hasta ese momento. Sin embargo, sólo 148 de estos genes aparecían descritos en al menos 2 de los estudios. Según estos autores, existen diversas razones para esta gran variabilidad.

La primera de ellas es el tipo de muestras utilizadas (líneas celulares o tejido parafinado) e incluso la histología de éstas, ya que algunos estudios incluyen tumores neuroendocrinos o de ampolla de Vater. La misma variabilidad existe también en las muestras de tejido normal (ARN comercial, tejido de piezas de resección de ACDP o de donantes sanos).

En segundo lugar, la microdissección sólo se había aplicado a algunos de los estudios incluidos en el meta-análisis²⁵⁴ mientras que en el resto se habían utilizado tejidos completos o líneas celulares. El principal problema que presentan la líneas celulares es que las condiciones *in vitro* pueden inducir cambios en la expresión génica que no estarían presentes en muestras *in vivo*. Además estas piezas de ACDP contienen distintos tipos celulares que incluyen desde las células ductales, acinares y de los islotes de Langerhans así como células inflamatorias, neurales y otros

elementos de la ECM. Cuando se utilizan estas muestras, los perfiles representan tanto al tumor como al tejido adyacente.

En tercer lugar, los diferentes arrays y tecnologías pueden dar resultados diferentes. Como demostró el estudio de Kuo *et al.*²⁸² existe poca correlación cuando las mismas muestras se analizan con 2 tecnologías diferentes (microarrays de ADNc vs microarrays de oligonucleótidos).

En cuarto lugar el análisis estadístico y los procedimientos de búsqueda y procesamiento de datos difieren entre los estudios.

Por último, pequeñas variaciones en los perfiles podrían ser debidas a la reacción individual del paciente a la enfermedad más que estar relacionadas directamente con el tumor.

Otros dos trabajos fueron publicados por el grupo alemán de Robert Grützmann en 2004²⁵⁴ y 2005²⁶¹. En este último de 2005 utilizaron los datos de 4 estudios diferentes y tras seleccionar un total de 2984 genes, aplicaron un meta-análisis para evaluar los datos combinados. Demostraron que existían numerosos genes alterados, independientemente de la tecnología utilizada. Esta valoración cruzada inter-estudio generó un total de 568 genes consistentemente y significativamente alterados, 364 de los cuales estaban sobreexpresados y 204 mostraban una disminución de su expresión.

3.4. Perfiles de expresión de la pancreatitis crónica

Varios son los estudios que han comparado también los perfiles de expresión de la PC y el ACDP.

Dos estudios del grupo de Friess^{240,243} describieron estas diferencias. En 2001 Friess *et al.*²⁴⁰ estudiaron, como ya comentamos en el apartado 3.1., piezas de ACDP, PC y tejido sano. Identificaron 152 genes que estaban sobreexpresados tanto en el ACD como en la PC, comparado con el tejido no tumoral, y 34 genes que tenían disminuida su expresión en las piezas tumorales. Dos años más tarde ampliaron el estudio²⁴³ e identificaron 808 genes, 467 genes que se encontraban sobreexpresados en el ACD frente al tejido sano (120 de ellos sólo en el ACD y no en la PC) y otros 341 con expresión disminuida.

Logsdon *et al.*²⁴⁷ también estudiaron la expresión diferencial de ambas entidades utilizando la microdissección para evitar los enmascaramientos del estroma en ambas entidades. De esta manera identificó 158 genes diferencialmente expresados.

Mediante el mismo sistema de microdissección, Binkley *et al.*²⁵¹ describieron numerosos genes, entre ellos 107 que se expresaban tanto en el estroma del ACD como de la PC.

El grupo de Crnogorac-Jurcevic *et al.*²⁵⁹ estudiaron también las diferencias entre PC y ACD mediante proteómica y describieron 132 genes diferenciales, 30 en la PC y 102 en el ACD frente al tejido sano.

3.5. *Perfiles de expresión en el tejido adyacente*

Pero no sólo el tejido tumoral ha sido el objetivo de los estudios de expresión.

El grupo americano de Fukushima *et al.*²⁶⁰ describieron la expresión diferencial de los acinos peritumorales comparados con aquellos de PC o tejido sano obtenidos mediante microdissección.

El estudio de Pilarsky *et al.*²⁷⁷ también se sirvió de la microdissección para estudiar esta vez la diferencia de expresión entre el estroma del tumor y de la PC: 316 genes se encontraban alterados, 255 de ellos sobreexpresados en el estroma peritumoral y 61 con expresión disminuida.

3.6. *Perfiles de expresión en el jugo pancreático.*

Debido a la difícil accesibilidad del páncreas se ha intentado el estudio de perfiles de expresión en jugo pancreático para intentar determinar a su vez posibles dianas diagnósticas que permitan la identificación de estas neoplasias en estadios precoces.

El grupo de Yoshida²⁴⁹ fue uno de los primeros en utilizar el jugo pancreático para la obtención de células tumorales, ya que con las técnicas de LCM es difícil

obtener una cantidad de material génico suficiente para los estudios de array ya que conllevan mucho tiempo para obtener un mínimo de células y numerosas rondas de amplificación de ARN. Estas muestras de jugo pancreático permiten obtener ARNm de gran calidad. En este trabajo compararon las células ductales aisladas del jugo pancreático de 6 tumores y 3 pacientes sanos, obteniendo 27 genes diferencialmente expresados.

Dos años después el grupo de Ishikawa *et al.*²⁶² estudiaron 49 pacientes, 24 de ellos con ACDP y 25 sujetos sanos y tras comparar las muestras de jugo pancreático de ambos grupos, identificaron 20 genes diferencialmente expresados. También describieron la posibilidad de realizar un diagnóstico precoz mediante la utilización de sólo 5 genes.

El estudio de Rogers *et al.*²⁶⁸ también comparó jugo pancreático de ACD, PC y páncreas no tumoral mediante 2 arrays diferentes, con los que identificó 37 y 133 genes respectivamente.

3.7. Perfiles de expresión en las lesiones precursoras

También se han estudiado los perfiles de expresión de las lesiones precursoras mediante microdissección. Uno de estos estudios fue el de Prasad *et al.*²⁶⁴ en el que compararon 6 casos de lesiones de bajo grado (PanIN1B/2) con tejido sano del mismo sujeto, obteniendo 49 genes diferencialmente expresados.

En otro estudio más amplio realizado por Bucholz *et al.*²⁵⁸ investigaron 15 casos de PanIN1B, 6 de PanIN2, 8 de PanIN3 y 8 de ADC que compararon individualmente con 14 muestras de tejido sano. De esta manera identificaron 16, 76, 418 y 303 genes sobreexpresados respectivamente y 31, 362, 160 y 307 cuya expresión se encontraba disminuida.

3.8. Perfiles de expresión y heterogeneidad del tumor

En 2007 se publicaron 3 estudios que investigaban las diferencias dentro de un mismo tumor según el área estudiada.

El primero de ellos²⁷⁰ comparaba la expresión génica del área central y periférica de un tumor obtenido tras implantar 1 línea celular en un ratón *nude*, encontrando 1222 genes diferencialmente expresados.

Del mismo grupo de trabajo²⁶⁹ y publicado en el mismo año, es otro estudio en el que comparan tumores *in vitro* con xenotransplantes orto y heterotópicos para demostrar la importancia del entorno en la expresión génica. Para ello utilizan 3 variantes de líneas celulares de ACDP con diferente potencial metastásico que implantaron en tejido celular subcutáneo y páncreas de ratones *nude*. Entre otros resultados destaca la relación de 324 genes diferencialmente expresados entre los xenotransplantes orto y heterotópicos así como 223 genes cuya expresión se encontraba disminuida en el patrón metastásico.

El estudio del grupo alemán²⁷¹ demostró que también existían diferencias de expresión entre el tumor, el frente tumoral y la metástasis en un tumor implantado ortotópicamente en un ratón *nude*: 962 genes diferenciaban el tumor y el frente tumoral y 206 la metástasis y el tumor primario. De entre estos genes destacan *BNIP3L*, *RGS4*, *PAI-1*, *GADD45A*, *PTPN14*, *VEGF*, *NSE* y *HSP27*.

3.9. Genes de expresión pronósticos y firmas pronósticas

El grupo de Golub y colaboradores²⁸³ fue uno de los primeros que estudió las diferencias de expresión que existían entre los tumores sólidos primarios (adenocarcinomas fundamentalmente) y sus metástasis. Describieron una firma de 17 genes (*SNRPF*, *EIF4EL3*, *HNRNPAB*, *DHPS*, *PTTG1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *LMNB1*, *ACTG2*, *MYLK*, *MYH11*, *CNN1*, *HLA-DPBI*, *RUNX1*, *MT3*, *NR4A1* y *RBM5*) mediante la cual identificaban un subgrupo dentro de los tumores primarios, los cuales mostraban ciertas similitudes con la firma génica de las metástasis. Estos tumores desarrollaron metástasis antes y tuvieron peor pronóstico.

Siguiendo esta idea el grupo de Kim *et al.*²⁷² compararon mediante microarrays de ADN las diferencias de expresión entre aquellos ACDP con metástasis ganglionares frente a aquellos que no presentaban metástasis. Identificaron 194 genes, 66 de ellos estaban sobreexpresados y 128 tenían reducida su expresión en aquellos tumores con metástasis ganglionares.

Otro estudio que también comparó los tumores con metástasis ganglionares frente a los que no las tenían fue el de Hirono *et al.*²⁷⁸. Estudiaron 20 piezas de

resección (11 de ellas con metástasis ganglionares) y describieron 46 genes diferencialmente expresados, 17 de los cuales aparecían sobreexpresados en el grupo con metástasis. Entre los genes descritos destacaban como sobreexpresados *LI-cadherin*, *Granzyme A*, *MUC17*, *C4BPB*, *XK* y *LSD1*, mientras que por el contrario *DOK7*, *AP2 α* , y *FOXL1* mostraban disminución de su expresión.

Un año después el grupo de Badea *et al.*²⁷⁴ mediante la utilización de tejido tumoral microdisecado y completo, describieron una lista de 239 genes que compararon con otros 25 estudios de microarrays de ACDP previamente publicados: 135 de estos 239 genes habían sido mencionados en al menos otro de los estudios. La correlación de los perfiles de expresión de los genes individualmente con la supervivencia generó una serie de ellos cuya sobreexpresión estaba inversamente correlacionada con la supervivencia: *ANXA2*, *ANXA2P2*, *KRT7*, *MAP4K4*, *LAMC2*, *OACT2*, *SLC16A3*, *TM4SF1* y *KYNU*.

Posteriormente se publicaron 2 “*gene signatures*” pero ninguna de ellas ha sido reproducida hasta el momento.

En el trabajo del grupo de Stratford *et al.*²⁷⁹ compararon 15 muestras de ACDP resecados sin metástasis frente a otros 15 ACDP de pacientes con metástasis cuyas muestras fueron tomadas post-mortem. Al compararlo mediante microarrays de ADN, identificaron 6 genes que estaban diferencialmente sobreexpresados. Estos 6 genes eran *FOS B*, *KLF6*, *NFKBIZ*, *ATP4A*, *GSG1* y *SIGLEC11*. Tres de estos genes

estaban sobreexpresados en los grupos de mal pronóstico (*SIGLEC11*, *KLF6*, *NFKBIZ*).

KLF6 es un factor de transcripción considerado un gen supresor tumoral que interviene en la carcinogénesis del cáncer de próstata, pulmón y ovario²⁸⁴. En su estudio demostraron que existía una mayor sobreexpresión en los ACDP comparados con el tejido normal además de estar relacionado con una menor supervivencia. Esta firma fue aplicada prospectivamente a una cohorte de pacientes para estratificar los pacientes según el riesgo de progresión. Con este estudio demostraron además que existía un cambio de expresión génica en los diferentes estadios evolutivos del ACDP, hecho que también había sido estudiado en otros trabajos sobre cáncer de mama en los que se demostraba que estos cambios de expresión pueden ser pronósticos y predictivos del desarrollo de metástasis²⁸⁵⁻²⁸⁷.

El grupo francés de Bournet *et al.*²⁸¹ también estudió en muestras obtenidas mediante EUS- PAAF la expresión génica del cáncer de páncreas avanzado mediante arrays de baja densidad. Ellos obtuvieron una firma de 8 genes (*S100P*, *PLAT*, *PLAU*, *MSLN*, *MMP11*, *MMP7*, *KRT7*, *KRT17*) que se encontraban sobreexpresados significativamente en las muestras tumorales frente a las pancreatitis crónicas pseudotumorales. Además proponían la determinación combinada de S100P y KRT7 como herramienta diagnóstica precoz, con una sensibilidad del 81% y especificidad del 77% en pacientes con masas sólidas pancreáticas.

3.10. Predicción de respuesta a la quimioterapia

El término factor predictivo define cualquier medida asociada con una respuesta o falta de ésta a una terapia en particular. Los perfiles de expresión y la información derivada de estos pueden proporcionar importante información pronóstica y, de alguna manera, ser empleados como marcadores predictivos en la respuesta a quimioterapia multifarmacológica.

Calcular el riesgo de recaída o metástasis de un paciente para determinar el régimen de tratamiento más efectivo para éste es de importancia primordial para evitar efectos secundarios innecesarios^{109,288}. La identificación de patrones de expresión génica que podrían correlacionarse con la respuesta a terapias diana y quimioterapia permitirían el desarrollo de predictores clínicamente útiles¹⁰⁹.

En el trabajo de Collisson *et al.*²⁸⁰ utilizaron 63 casos de ACDP microdisecados en los que identificaron una firma de 62 genes con la que podían subclasificar al ACD en 3 tipos diferentes denominados clásico, cuasi-mesenquimal (QM-PDA) y *exocrine-like*, los cuales presentan además de diferencias pronósticas, diferencia en la respuesta a la quimioterapia. El tipo clásico tenía una alta expresión de genes epiteliales y asociados con la adhesión celular mientras que el subtipo QM-PDA mostraba una alta expresión de genes asociados al mesénquima. El subtipo *exocrine-like* mostraba niveles altos relativos de genes de enzimas digestivas. Este último subtipo no pudo ser identificado en las líneas celulares de las que disponían el grupo investigador por lo que podía suponer un artefacto de contaminación del tejido

normal adyacente, a pesar de que las muestras originalmente utilizadas fueron microdisecadas.

Describieron 2 genes que se encontraban asociados a los subtipos, *GATA6* y *KRAS*, ambos implicados en aspectos del desarrollo normal y la fisiopatología tumoral. La familia GATA son unos factores de transcripción asociados a la diferenciación específica de un tejido y han sido descritos como marcador específico en otros cánceres. Por ejemplo, *GATA3* es requerido para la diferenciación luminal de la mama²⁸⁹ y su expresión aumentada caracteriza subtipos de cáncer de mama. Del mismo modo, *GATA6* es esencial para el desarrollo pancreático²⁹⁰ y se ha descrito su implicación en la carcinogénesis del ACDP^{291,292}. *GATA6* se sobreexpresa en la mayoría de los tumores del subtipo clásico y líneas celulares y su expresión es comparativamente baja en los tumores y líneas de tipo QM-PDA.

4. Identificación de genes

Si bien no hemos conseguido identificar patrones de expresión que se relacionen de forma estadísticamente significativa con la supervivencia, hemos identificado una serie de genes que pudieran estar relacionados con una mayor o menor supervivencia. Estos genes se muestran en el apartado de resultados en las Tablas 6-9. Entre ellos, nos parecen especialmente relevantes los siguientes: *Tenascin C*, *TFAP2A*, *Maspin*, *MTHFD2*, *OSBPL7*, *SYTL2*, *CCL24*, *CA 9*, *SHROOM2*, *KIAA0513*, *FAM134B*, *OPA3*, *PMP22*, *TUBB3*, *FOXD4*, *CEACAM1*, *GPR177*, *OSR1*, *USP47*, *ANKS4B*, *DCUN1D3* y *PPFIA2*.

4.1. *Tenascin C*

La Tenascina C (TNC) es una glicoproteína de la ECM compuesta de seis monómeros unidos por su extremo N-terminal con puentes disulfuro para formar un hexámero de 1080-1500 kDa²⁹³. La TNC interactúa con otras proteínas de la ECM como la fibronectina, anexina II, integrinas y receptores de superficie celular que afectan a la adhesión, la angiogénesis, la proliferación celular y la migración²⁹⁴⁻²⁹⁷.

Se expresa fundamentalmente durante el desarrollo fetal y sólo en determinadas localizaciones de tejidos adultos normales (membrana basal de la piel, en los ductos de las glándulas salivares, en la mucosa colónica y en las paredes vasculares de diferentes órganos) aunque los niveles de esta proteína pueden aumentar drásticamente en procesos fisiológicos y patológicos como la remodelación, neovascularización e inflamación^{298,299}.

También se ha visto una alta expresión en tumores sólidos ya que afecta a la adhesión y motilidad promoviendo la invasión y las metástasis^{299,300}.

La sobreexpresión de TNC se ha demostrado en diferentes tumores sólidos y también se ha correlacionado con mal pronóstico en cáncer de mama, colorrectal, pulmón y cerebro³⁰¹⁻³⁰⁶.

En el páncreas normal, la TNC se expresa en la pared muscular de los vasos y en el tejido estromal de alrededor de los ductos interlobulares²⁹³. Se sobreexpresa en pancreatitis crónica y aguda³⁰⁷ y aumenta paralelamente a la progresión de lesiones

precursoras de bajo grado (PanIN) hasta el ADC, exclusivamente en el estroma adyacente a las glándulas tumorales³⁰⁸. La PSC parecen ser la principal fuente de expresión de TNC *in vivo*, mientras que las células tumorales no muestran expresión de TNC ni por inmunohistoquímica (IHQ) ni por inmunoblot. Sin embargo, se han encontrado niveles bajos de TNC en líneas celulares de cáncer de páncreas mediante RT-PCR cuantitativa³⁰⁸.

El estudio de Linder *et al.*³⁰⁹ fue uno de los primeros que estudió la sobreexpresión de TNC en cáncer de páncreas. El grupo de Juuti *et al.*³⁰⁷ demostró 3 años después que la TNC estaba sobreexpresada en el cáncer de páncreas, fundamentalmente en el estroma que rodea las células ductales malignas, y aunque no demostraron relación con la supervivencia (excepto en el subgrupo de varones en los que la sobreexpresión se asociaba con una mayor supervivencia) sí la correlacionaron con la diferenciación histológica (aquellos tumores pobremente diferenciados tenían mayor sobreexpresión)³⁰⁷. El estudio de Gong y colaboradores³¹⁰ demostró que la TNC puede inducir resistencia a gemcitabina mediante un *splicing* alternativo (TNfnA-D) que actúa a través de la vía de señalización de tipo *canonical* de PI3K/AKT/NF- κ B. Paron y colaboradores²⁹³ han estudiado los mecanismos de actuación de la TNC mediante la activación de la vía de las integrinas. La TNC mantiene y promueve el crecimiento y migración de las líneas celulares de ACDP pobremente diferenciadas. Sin embargo, los datos muestran que el efecto sobre la motilidad, adhesión y crecimiento pueden ser divergentes dependiendo de la diferenciación celular y de la composición de la ECM²⁹³.

En nuestro estudio, el gen de la TNC es uno de los genes que hemos identificado en los estudios de perfiles de expresión y que parece estar relacionado con la supervivencia. Al igual que lo publicado en la literatura, su expresión está disminuida en las células ductales tumorales.

4.2. *TFAP2A*

TFAP2A codifica una proteína activadora del factor de transcripción 2α denominada AP2 α . Ésta pertenece a la familia de factores de transcripción AP2, constituida por 5 isoformas, todas ellas de 52kDa (AP2 α , AP2 β , AP2 γ , AP2 δ y AP2 ϵ) y codificadas por genes diferentes (TFAP2a, b, g, d, e)³¹¹. Todos los factores de transcripción AP2 comparten el dominio de unión que les permite unirse al ADN, pero lo que varía es el dominio de transactivación³¹².

Durante la embriogénesis murina, la familia AP2 manifiesta distintos patrones de expresión: AP2 α , AP2 β , AP2 γ se expresan esencialmente en células de la cresta neural, sistema nervioso periférico, facial y el mesénquima de las extremidades, AP2 δ en el corazón, sistema nervioso central y retina, y AP2 ϵ en el bulbo olfatorio. A pesar de su homología estructural y superposición en los patrones de expresión, estos factores tienen funciones diferentes³¹³⁻³¹⁵.

Existe un gran número de genes dianas que son regulados por AP2 α , generalmente en colaboración con otros factores de transcripción. Algunos de estos genes claves actúan en la proliferación celular (*HER2* y *MYC*), la regulación del ciclo celular (*P16*) o la adhesión e invasión celular (*MMP2*, *MMP9*, *PAR-1* y *MUC18*)³¹⁶.

Datos *in vitro* muestran que AP2 α podría activar directamente la transcripción de VEGF, paso crítico en la angiogénesis³¹⁷, por lo que AP2 α parece que está implicado en múltiples pasos de la progresión tumoral.

AP2 α actúa como gen supresor tumoral en ciertos tumores mientras que en otros parece actuar como oncogén y su relación con el cáncer parece depender del sistema y el contexto³¹⁷⁻³²⁹.

En las neoplasias de mama, AP2 induce la expresión del protooncogén *HER2* y *ERBB3* aumentando el potencial maligno de la célula tumoral y por tanto la capacidad de progresión y de metástasis^{318,322,325,330,331}. Además, la disminución de expresión IHQ nuclear de AP2 es un factor predictivo independiente de recurrencia³³². Sin embargo, datos recientes muestran que AP2 α parece que inhibe el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*³¹⁶.

AP2 α se encuentra sobreexpresado en células de cáncer ovárico y parece correlacionarse con la supervivencia^{319,333}.

En el caso del melanoma, la pérdida de expresión de AP2 provoca un cambio hacia un fenotipo metastásico³³⁴.

La disminución de expresión de AP2 α tiene un poder predictivo negativo para la supervivencia de pacientes con adenocarcinoma gástrico³²⁸.

En el epitelio normal prostático AP2 α se asocia con la diferenciación luminal y su pérdida es temprana en el desarrollo del adenocarcinoma de próstata³²⁰.

Existen pocos datos del papel de AP2 α en el ACDP. AP2 α se expresa durante el desarrollo pancreático. Fauquette *et al.*³³⁵ demostraron que la expresión IHQ de AP2 α en el páncreas humano se produce fundamentalmente en las células ductales no tumorales y las células endocrinas, mientras que sólo en un 5.5% de los ACDP la expresaba. También se ha demostrado su expresión en líneas celulares de cáncer de páncreas e incluso la especificidad de una nueva isoforma recientemente descrita por el grupo de Carrière *et al.*³²⁹, AP2 α variante 6, la cual muestra una falta de actividad transcriptional.

AP2 α actúa como gen supresor en el ACDP. Uno de los mecanismos propuestos es mediante la inhibición de la expresión de la mucina humana epitelial MUC4³³⁶. Además la expresión de AP2 α es mutuamente excluyente con la de MUC4, una proteína transmembrana que se expresa característicamente en las células tumorales del ACDP y no en el tejido sano y que también se considera como un factor de mal pronóstico independiente³³⁷. Por lo tanto AP2 α es un importante regulador negativo de la expresión de MUC4, ya que muestran una correlación negativa entre la expresión de AP2 α y MUC4 *in vivo* en el ACDP.

El grupo de Hirono *et al.*²⁷⁸ demostró la disminución de la expresión de AP2 α como factor pronóstico de la supervivencia en el ACDP. La expresión de AP2 α se asocia no sólo a la presencia de metástasis ganglionares sino a la supervivencia de ACDP²⁷⁸.

Parece que la pérdida de AP2 α ocurre durante la carcinogénesis pancreática de forma tardía^{331,335}.

En nuestro estudio es otro de los genes que hemos encontrado con disminución de su expresión al igual que los datos previos publicados en cáncer de páncreas.

Además del potencial oncogénico o de supresión tumoral, AP2 α también participa en el control de la sensibilidad a agentes quimioterápicos en células tumorales de colon y mama³³⁸.

El grupo de Jonckheere *et al.*³³¹ demostró que una sobreexpresión moderada de AP2 α en la línea celular de ACDP CAPAN-1 produjo un aumento de la quimiosensibilidad a bajas dosis de gemcitabina. Esto ya se había observado en células de cáncer de colon. Este efecto fue independiente de p53³³⁸ pero resultante de una disminución de la regulación de Bcl2 y de la inducción de apoptosis³³⁹. Además, el mismo grupo también demostró que AP2 α es inducida por un mecanismo post-transcripcional por varios agentes quimioterápicos como la adriamicina o el cisplatino.

4.3. Maspin

Maspin (SERPINB5) es un inhibidor de la proteinasa serina que fue identificado por primera vez como un potencial gen supresor tumoral basado en la diferencia de expresión entre las células epiteliales mamarias normales y las líneas tumorales de cáncer de mama³⁴⁰. Recientes estudios han mostrado que Maspin podría

ser un marcador pronóstico. La sobreexpresión en tumores escamosos orales, carcinomas de tiroides y adenocarcinomas de colon y próstata parece estar asociada a buen pronóstico, mientras que en el caso del carcinoma de mama ocurre lo contrario³⁴¹⁻³⁴⁵. Maspin se sobreexpresa en la mayoría de ACDP pero no en el epitelio ductal normal³⁴⁶⁻³⁴⁸. Su expresión se adquiere en el ACDP a través de la hipometilación de su promotor mientras que en otros tumores lo hace a través de hipermetilación³⁴⁸. La sobreexpresión de Maspin se asocia con la presencia de metástasis³⁴⁹ y una peor supervivencia post-cirugía incluso tras ajustar otros factores clínico-patológicos³⁴⁸. También se observan en lesiones precursoras de bajo y alto grado (PanINs), lo que sugiere que su alteración ocurre tempranamente en el modelo de progresión del ACDP³⁴⁸.

En nuestros resultados *MASPIN* aparece como uno de los genes sobreexpresados.

4.4. Genes identificados en otros tumores

El gen *MTHFD2* codifica una enzima mitocondrial con actividad metilendetrahidrofolato-deshidrogenasa. En tejidos normales se expresa sólo durante el desarrollo y participa en la iniciación de las síntesis de proteínas en la mitocondria³⁵⁰. Variaciones en este gen se han relacionado con un aumento de riesgo de cáncer de vejiga³⁵¹. Su sobreexpresión se relaciona con el cáncer de mama y se asocia con un mal pronóstico, ya que favorece la migración e invasión. Se asocia especialmente con tumores HER2 positivos, receptores negativos y otras

características de mal pronóstico (mutación de *TP53* y presencia de metástasis ganglionares)³⁵². También se han detectado niveles altos en metástasis de colon y renal aunque no en los tumores primarios, lo que apoya su función en las metástasis³⁵².

La proteína codificada por el gen *OSBPL7* corresponde a un receptor intracelular lipídico con afinidad por los oxisteroles (derivados oxigenados del colesterol). Existe sobreexpresión en muestras tisulares de colangiocarcinomas humanos ya que se han detectado niveles de ARNm mucho mayores que en muestras hepáticas no tumorales. Además se ha observado esta sobreexpresión mediante IHQ de esta proteína tanto en las células tumorales y en los hepatocitos pero no en las células biliares normales ni en las células inflamatorias. Pero sin duda lo más interesante fue que se han podido identificar también niveles altos de este ARNm en la sangre de pacientes con colangiocarcinoma comparado con sujetos sanos³⁵³.

El gen *SYTL2* codifica una proteína que ha sido descrita en el cáncer de vejiga. En estos tumores se encuentra disminuida su expresión y parece estar relacionada con marcadores de diferenciación³⁵⁴.

CCL24 codifica una quimiocina que se sobreexpresa en cáncer colorrectal primario y metastásico haciéndola una potencial diana inmunoterapéutica³⁵⁵.

CA 9 (anhidrasa carbónica IX) es 1 de las 14 isoformas descritas del grupo de metaloenzimas catalíticas con zinc que convierten el dióxido de carbono en bicarbonato, regulando el balance ácido-base y la respiración celular y también

interviene en otros procesos como la reabsorción ósea, gluconeogénesis y formación de ácido gástrico. Normalmente se expresa en órganos gastrointestinales y su producción es inducida por la acumulación de HIF-1 producida por la hipoxia^{356,357}. Ha sido relacionada con el desarrollo y progresión del cáncer³⁵⁸ y se encuentra sobreexpresada en tumores de células renales, ovárico y escamoso cervical aunque reducida en cáncer gástrico^{357,359-361}. La densidad microvascular refleja el grado de angiogénesis y contribuye significativamente a la progresión del cáncer. Es un factor pronóstico adverso independiente en el cáncer de páncreas entre otros. CA 9 se expresa normalmente en tumores con pobre vascularización ya que se induce en la hipoxia. De acuerdo con esta hipótesis, su expresión ha sido asociada con tumores con baja densidad microvascular, aunque también se ha encontrado en aquellos tumores con gran microvascularización³⁵⁷. Sin embargo, son varios los trabajos que no han demostrado relación entre la expresión de CA 9 y el estado avanzado, la expresión de p53 o la microvascularización. Su expresión se observa en un subgrupo de tumores, por lo que podría contribuir en las fases iniciales de carcinogénesis. Además, la inhibición del crecimiento celular de líneas celulares pancreáticas tumorales por inhibidores de CA indica que podría ser una interesante diana terapéutica.

4.5. Genes relacionados con la angiogénesis

El gen *SHROOM2* codifica la proteína homónima (Shrm2). Esta se sobreexpresa en el endotelio de la vascularización en desarrollo siendo por tanto necesaria para la angiogénesis^{362,363}.

4.6. Otros genes de interés

La proteína KIAA0513 codificada por el gen con el mismo nombre, ha sido identificada en sujetos con esquizofrenia y parece que interacciona con moduladores de la neuroplasticidad, la apoptosis y el citoesqueleto. Se expresa en todo el cerebro, fundamentalmente en cerebelo y su expresión está disminuida en sujetos esquizofrénicos³⁶⁴.

Otro de los genes identificados, *FAM134B*, codifica una proteína transmembrana necesaria para la supervivencia a largo plazo de las neuronas de los ganglios autonómicos y nociceptivos. Mutaciones de este gen causan la neuropatía autonómica y sensorial hereditaria de tipo IIB (HSAN IIB) y tiene un importante papel en la susceptibilidad para la demencia vascular^{365,366}.

El gen *OPA3* es el responsable de la catarata y atrofia óptica autosómica dominante (ADOAC).

PMP22 es una proteína estructural de las células de Schwann cuya disminución en su expresión fue identificada originalmente en estas células durante la regeneración neural. Además interfiere en la proliferación celular. Su mutación es

responsable de numerosos tipos de neuropatías periféricas, como el síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A caracterizado por la progresiva atrofia muscular distal. Se ha demostrado que existen niveles aumentados de ARNm en la PC y el ACDP comparado con tejido sano y mientras que en éste sólo se expresa en nervios, en la PC y el ACDP también se expresa en un porcentaje de células tumorales³⁶⁷.

TUBB3 es una beta-tubulina clase III. Los taxanos son un grupo de agentes quimioterápicos que actúan sobre la subunidad β -tubulina de los microtúbulos bloqueando la división celular e induciendo apoptosis. La sobreexpresión de esta isoforma confiere resistencia a los taxanos, lo que es de relevancia clínica en el cáncer de ovario, mama, próstata y pulmón. Su sobreexpresión en estos tumores se correlaciona con un peor pronóstico en aquellos pacientes tratados con quimioterapia basada en taxanos (paclitaxel y docetaxel)³⁶⁸. Esta tubulina ha sido estudiada en el ACDP y parece tener un papel importante en la resistencia no solo a los taxanos sino a la gemcitabina^{369,370}.

La familia del gen Human Forkhead-box (*FOX*) está constituida por 43 miembros entre los que se incluye *FOXD4*. Otros miembros de la familia son el gen *FOXAI* que se encuentra amplificado y sobreexpresado en el cáncer de esófago y pulmón o el gen *FOXMI* que tiene su expresión disminuida en el cáncer de páncreas y el carcinoma de células basales debido a la alteración de la vía de señalización de Sonic Hedgehog (SHH)³⁷¹. Estudios preliminares en cultivos de células madre embrionarias de ratón muestran que el gen *FOXD4* tienen un papel importante en

promover los precursores del ectodermo neural inmaduro y retrasar la diferenciación neural³⁷².

CEACAM1 es una molécula de adhesión celular y uno de los biomarcadores propuestos en los últimos años para diagnóstico del ACDP. Parece que su sensibilidad es superior al CA19.9, aunque su especificidad no es suficiente para diferenciar las neoplasias de otras entidades benignas como la PC, por lo que su uso como herramienta diagnóstica por si sola no está recomendada en la actualidad^{328,373,374}.

GPR177 (*WLS*) codifica una proteína transmembrana necesaria para la secreción de la proteína Wnt en tejidos adultos y embrionarios³⁷⁵. En muchos tumores la activación de la vía de señalización WNT/ β -catenina ocurre por una mutación, mientras que este hecho rara vez ocurre en melanomas. No obstante, la disminución de los niveles de β -catenina está relacionada con un peor pronóstico³⁷⁶. Uno de los pasos clave de la secreción del ligando de Wnt es la secreción de *GPR177* que se encuentra disminuida en líneas celulares de melanoma. Los resultados de algunos estudios sugieren que *GPR177* actúa como un regulador negativo de la proliferación del melanoma y la producción de metástasis mediante la activación de la vía WNT/ β -catenina³⁷⁷.

OSR1 es un gen que codifica un factor de transcripción que se expresa en el mesodermo y participa en el desarrollo del riñón. Las variantes disfuncionales de *OSR1* comprometen al grupo de células progenitoras renales, lo que puede limitar el

tamaño renal y su función en el recién nacido³⁷⁸. Se han estudiado los niveles de ARNm de OSR1 evidenciándose significativamente disminuidos en la línea celular de ACDP MIA PaCa-2 y de forma menos marcada en las líneas PANC-1, BxPC-3, AsPC-1, PSN-1 y Hs766T y otras líneas de cáncer gástrico y esofágico³⁷⁹.

El gen *USP47 (TRFP)* codifica una proteína que pertenece al sistema de las ubiquitinas-proteasomas, las cuales tienen un papel importante en varios procesos como el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis e incluso se han observado formas aberrantes en numerosos tumores humanos³⁸⁰. *USP47* está implicada en el control del crecimiento celular y la supervivencia³⁸¹. Además recientemente se le ha atribuido un papel importante en el control del crecimiento axonal durante el desarrollo neuronal³⁸².

ANKS4B es una molécula que controla la susceptibilidad de la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico, organela crítica para el funcionamiento de las células β pancreáticas. *ANKS4B* es también una diana de *HNF4 α* , un subtipo de factor nuclear hepatocitario (HNF). La mutación del gen *HNF4A* causa una forma particular de diabetes conocida como *MODY1 (maturity-onset diabetes of the young, tipo 1)*, cuya patogénesis primaria incluye la disfunción de las células β pancreáticas³⁸³.

DCUNID3 es un gen que se expresa de manera ubicua en tejidos tumorales humanos y líneas celulares. Cuando las células tumorales son expuestas a radiación UV, los niveles de expresión de *DCUNID3* aumentan significativamente. La

sobreexpresión de DCUN1D3 inhibe el crecimiento celular. Este gen parece por tanto estar relacionado con la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular bajo condiciones de daño del ADN³⁸⁴, por lo que podría ser un potencial gen supresor de tumores, ya que además comparte algunas similitudes con *TP53*, otro gen supresor tumoral³⁸⁵.

PPFIA2 es un gen que codifica una proteína homónima y se encuentra expresada a nivel ocular en la miopía de alto grado³⁸⁶.

5. Diferencias con otros estudios

Como ya hemos visto en la literatura publicada, sólo unos pocos genes se encuentran expresados diferencialmente en más de un estudio. La larga lista de factores responsables han sido señalados por varios autores y podrían dividirse en factores intrínsecos al tumor y las muestras, factores dependientes de la tecnología utilizada y factores dependientes del análisis bioinformático^{274,245,284}.

Con respecto a las muestras utilizadas, un punto muy importante es el número limitado de muestras utilizadas así como el tipo (líneas, tejido o xenotransplantes) y las histologías incluidas, además de su procesamiento o no con microdissección u otro método de purificación de celularidad tumoral. También se ha atribuido esta variación en la expresión de los genes detectados a la heterogeneidad genómica de esta enfermedad así como la compleja composición celular de las muestras tumorales²⁷⁴.

Otro punto importante es la gran variabilidad inter-plataforma con el uso de diferentes tecnologías de arrays que pueden dar resultados diferentes²⁴⁵. Como ya demostraron algunos autores²⁸⁴, existe poca correlación cuando se usan distintos tipos de tecnologías aplicadas a las mismas muestras.

Por último están las diferencias de métodos estadísticos de análisis de genes y/o el umbral usado en los diferentes estudios que hace que también los resultados obtenidos varíen entre sí²⁷⁴.

Esta variación inter-estudios pone de manifiesto la dificultad para determinar los genes diferencialmente expresados en ACDP y por ello la falta de perfiles de expresión que puedan relacionarse con la evolución clínica.

No obstante, 3 de los genes encontrados en nuestro estudio aunque no con significación estadística (*TNC*, *AP2α* y *Maspin*) habían sido descritos anteriormente en cáncer de páncreas así como otros 5 genes habían sido estudiados en otros tipos tumorales.

VIII. Conclusiones

VII. CONCLUSIONES

1. Objetivos concretos:

1.1. Caracterización del perfil o perfiles de expresión genética del adenocarcinoma ductal pancreático

Los hallazgos del presente estudio muestran que existe una gran variabilidad en los perfiles de expresión génica en el ACDP, a pesar de haberse seleccionado de forma estricta las muestras y haberse obtenido sólo material tumoral mediante microdissección.

Los genes identificados en nuestro estudio sólo coinciden parcialmente con los previamente identificados por otros grupos; esta falta de coincidencia es el resultado común en la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento que han tratado de identificar un perfil genético en el cáncer de páncreas. Incluso se ha llegado a describir una gran variabilidad genética dentro de un mismo tumor debido a la heterogeneidad celular de éste, como hemos visto en el apartado 3.8. de la discusión, lo cual complicaría aun más la obtención de ese perfil único aplicable a todos los pacientes con estos tumores.

Estos resultados poco alentadores podrían cuestionar la relevancia biológica de la búsqueda de perfiles de expresión en el ACDP como un método predictivo para la supervivencia de los pacientes debido a que el perfil de expresión de cada tumor en particular es muy específico. Sin embargo, podría ser un problema que tuviese más

relación en la forma de clasificar los tumores, de manera que podrían existir perfiles más claros seleccionando dentro de los ACDP aquellos con mutaciones de un gen determinado, un estadio concreto, un grado de extensión tumoral determinado, etc. al igual que habría que tener en cuenta esa expresión diferencial entre las diferentes regiones de un mismo tumor.

1.2. Clasificación de los diferentes patrones de expresión obtenidos.

Los patrones obtenidos en nuestro estudio no han permitido agrupar por completo los pacientes en subtipos que muestren diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

1.3. Correlación de los patrones con la supervivencia.

Los resultados obtenidos muestran que existe una gran diversidad entre los diferentes tumores a pesar de su homogeneidad histológica y la inclusión de un paso de selección exclusivamente de tejido tumoral para evitar el ruido que puedan producir otras células contenidas en el tumor, fundamentalmente el estroma que acompaña a este tipo de tumor. Pese a ello, la variabilidad de los tumores no ha permitido la detección de un perfil de expresión estadísticamente significativo asociado a la supervivencia en pacientes con ACDP.

2. Objetivo último:

2.1. Conocimiento de las alteraciones moleculares en el ACDP para la contribución al progreso de la investigación básica y clínica del cáncer de páncreas y la ayuda a mejorar su tratamiento y pronóstico.

A diferencia de los estudios previos de perfiles de expresión en los que se utilizaba material congelado, nosotros hemos utilizado tejido parafinado, lo que abre un nuevo camino a la investigación en este campo al permitir hacer estudios retrospectivos utilizando un material de uso cotidiano en los servicios de anatomía patológica y de fácil disponibilidad y amplio número.

Los resultados obtenidos muestran que no existe un perfil claro (altamente significativo) de genes cuyos niveles de ARNm en el tumor sean determinantes para poder predecir la supervivencia de los pacientes. No obstante, la identificación de genes relacionados con una mayor supervivencia aunque con valores de p inferiores a 10^{-4} , sugiere que pueden tener alguna implicación, extremo que debería ser verificado en una muestra más amplia.

Además se han identificado genes especialmente interesantes como la *Tenascina C*, *TFAP2A* o *Maspin* que parecen tener un papel importante en la carcinogénesis del ACDP y podrían constituir futuras dianas tanto diagnósticas como terapéuticas. También se han identificado genes que han sido identificados y estudiados en otros tipos tumorales como *MTHFD2*, *OSBPL7*, *SYTL2*, *CCL24* y *CA9*

CONCLUSIONES

pero no en cáncer de páncreas y que también podrían ser de gran utilidad clínica. Por último, hemos identificado genes relacionados con la angiogénesis, el desarrollo axonal, el ciclo celular o la diferenciación celular como *SHROOM2*, *KIAA0513*, *FAM134B*, *OPA3*, *PMP22*, *TUBB3*, *FOXD4*, *CEACAM1*, *GPR177*, *OSR1*, *USP47*, *ANKS4B*, *DCUN1D3* y *PPFIA2*.

IX. Referencias bibliográficas

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63:11-30.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49:1374-40.
3. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:792-800.
4. Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C, Zeegers MP, Boffetta P. Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol Carcinog* 2012; 51: 3–13.
5. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr/>
6. Partensky C. Toward a better understanding of pancreatic ductal adenocarcinoma: glimmers of hope? *Pancreas.* 2013;42:729-9.
7. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:220-41.
8. Le Scodan R, Mornex F, Girard N, Mercier C, Valette PJ, Ychou M, et al. Preoperative chemoradiation in potentially resectable pancreatic adenocarcinoma: feasibility, treatment effect evaluation and prognostic factors, analysis of the SFRO-FFCD 9704 trial and literature review. *Ann Oncol.* 2009;20:1387-96.
9. Iovanna J, Mallmann MC, Gonçalves A, Turrini O, Dagorn JC. Current knowledge on pancreatic cancer. *Front Oncol.* 2012;2:6-24.
10. Wörmann SM, Algül H. Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Front Oncol.* 2013;3:282
11. Talamini R, Polesel J, Gallus S, Dal Maso L, Zucchetto A, Negri E, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study in Italy. *Eur J Cancer.* 2010;46:370-6.
12. Olson SH. Selected medical conditions and risk of pancreatic cancer. *Mol Carcinog.* 2012;51:75–97.
13. Braat H, Bruno M, Kuipers EJ, Peppelenbosch MP. Pancreatic cancer: promise for personalised medicine?. *Cancer Lett.* 2012;318:1–8.
14. Bracci PM, Wang F, Hassan MM, Gupta S, Li D, Holly EA. Pancreatitis and pancreatic cancer in two large pooled case-control studies. *Cancer Causes Control.* 2009;20:1723–31.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

15. Balakrishnan V, Unnikrishnan AG, Thomas V, Choudhuri G, Veeraraju P, Singh SP, et al. Chronic pancreatitis. A prospective nationwide study of 1,086 subjects from India. *JOP*. 2008;9:593–600.
16. Turati F, Galeone C, Edefonti V, Ferraroni M, Lagiou P, La Vecchia C, et al. A meta-analysis of coffee consumption and pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2012;23:311–8.
17. Genkinger JM, Li R, Spiegelman D, Anderson KE, Albanes D, Bergkvist L, et al. Coffee, tea, and sugar-sweetened carbonated soft drink intake and pancreatic cancer risk: apooled analysis of 14 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:305–18.
18. Petersen GM, de Andrade M, Goggins M, Hruban RH, Bondy M, Korczak JF, et al. Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:704-10.
19. Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:365-74.
20. Yamaguchi K. How to define patients at high risk for pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2011;11:3–6.
21. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am*. 2000;84:565-73.
22. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Férec C, Maire F, Hammel P, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:111-9.
23. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24:349–58.
24. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000;119:1447-53.
25. van Lier MG, Wagner A, Mathus-Vliegen EM, Kuipers EJ, Steyerberg EW, van Leerdam ME. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1258-64.
26. Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer* 2000;87:809–11.
27. Lynch HT, Fusaro RM, Lynch JF, Brand R. Pancreatic cancer and the FAMMM syndrome. *Fam Cancer*. 2008;7:103-12.

28. de Snoo FA, Bishop DT, Bergman W, van Leeuwen I, van der Drift C, van Nieuwpoort FA, et al. Increased risk of cancer other than melanoma in CDKN2A founder mutation (p16-Leiden)-positive melanoma families. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7151-7.
29. Lal G, Liu G, Schmocker B, Kaurah P, Ozcelik H, Narod SA, et al. Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germ-line p16, BRCA1, and BRCA2 mutations. *Cancer Res* 2000;60:409–16.
30. Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, Brune K, de Andrade M, Goggins M, et al. The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:342-6.
31. Rogers CD, van der Heijden MS, Brune K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE, Goggins M. The genetics of FANCC and FANCG in familial pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004;3:167–9.
32. Vandenberg CJ, Gergely F, Ong CY, Pace P, Mallery DL, Hiom K, Patel KJ. BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol Cell.* 2003;12:247-54.
33. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science.* 2002;297:606-9.
34. van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003;63:2585-8.
35. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48:5358-62.
36. Ruijs MW, Verhoef S, Rookus MA, Pruntel R, van der Hout AH, Hogervorst FB, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet.* 2010;47:421-8.
37. McWilliams R, Highsmith WE, Rabe KG, de Andrade M, Tordsen LA, Holtegaard LM, Petersen GM. Cystic fibrosis transmembrane regulator gene carrier status is a risk factor for young onset pancreatic adenocarcinoma. *Gut.* 2005;54:1661–2.
38. Maisonneuve P, Marshall BC, Lowenfels AB. Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. *Gut.* 2007;56:1327-8.
39. Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, Penfornis A, Sauvanet A, Correas JM, et al. Pancreatic involvement in von Hippel- Lindau disease. The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. *Gastroenterology* 2000;119:1087–95.
40. Charlesworth M, Verbeke CS, Falk GA, Walsh M, Smith AM, Morris-Stiff G. Pancreatic lesions in von Hippel-Lindau disease? A systematic review and meta-synthesis of the literature. *Gastrointest Surg.* 2012;16:1422-8.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

41. Lynch HT, Voorhees GJ, Lanspa SJ, McGreevy PS, Lynch JF. Pancreatic carcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a family study. *Br J Cancer*. 1985;52:271-3.
42. Banville N, Geraghty R, Fox E, Leahy DT, Green A, Keegan D, et al. Medullary carcinoma of the pancreas in a man with hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to a mutation of the MSH2 mismatch repair gene. *Hum Pathol*. 2006;37:1498-502.
43. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res*. 2002;62:3789-93.
44. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, et al. BRCA2 germ line mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:214-21.
45. Slater EP, Langer P, Fendrich V, Habbe N, Chaloupka B, Matthäi E, et al. Prevalence of BRCA2 and CDKN2a mutations in German familial pancreatic cancer families. *Fam Cancer*. 2010;9:335-43.
46. Schneider R, Slater EP, Sina M, Habbe N, Fendrich V, Matthäi E, et al. German national case collection for familial pancreatic cancer (FaPaCa): ten years experience. *Fam Cancer*. 2011;10:323-30.
47. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons DW, et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*. 2009;324:217.
48. Schneider R, Slater EP, Sina M, Habbe N, Fendrich V, Matthäi E, et al. German national case collection for familial pancreatic cancer(FaPaCa): ten years experience. *Fam Cancer*. 2011;10:323-30.
49. Slater EP, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, Habbe N, et al. PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet*. 2010;78:490-4.
50. Harinck F, Kluijdt I, van Mil SE, Waisfisz Q, van Os TA, Aalfs CM, et al. Routine testing for PALB2 mutations in familial pancreatic cancer families and breast cancer families with pancreatic cancer is not indicated. *Eur J Hum Genet*. 2012;20:577-9.
51. Pogue-Geile KL, Chen R, Bronner MP, Crnogorac-Jurcevic T, Moyes KW, Downen S, et al. Palladin mutation causes familial pancreatic cancer and suggests a new cancer mechanism. *PLoS Med*. 2006;3:e516.
52. Vitone LJ, Greenhalf W, McFaul CD, Ghaneh P, Neoptolemos JP. The inherited genetics of pancreatic cancer and prospects for secondary screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20:253-83.

53. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:297–306.
54. Bartsch H, Malaveille C, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Hautefeuille A, Boyle P. Genetic polymorphism of N-acetyltransferases, glutathione S-transferase M1 and NAD. *Eur J Cancer Prev.* 1998;7:215–23.
55. Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP. UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2003;124:1802–8.
56. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut.* 2007;56:1134-52.
57. Catalano C, Laghi A, Fraioli F, Pediconi F, Napoli A, Danti M, et al. Pancreatic carcinoma: the role of high-resolution multislice spiral CT in the diagnosis and assessment of resectability. *Eur Radiol.* 2003;13:149-56.
58. Raut CP, Grau AM, Staerckel GA, Kaw M, Tamm EP, Wolff RA, et al. Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in patients with presumed pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2003;7:118–26.
59. Wittmann J, Kocjan G, Sgouros SN, Deheragoda M, Pereira SP. Endoscopic ultrasound-guided tissue sampling by combined fine needle aspiration and trucut needle biopsy: a prospective study. *Cytopathology.* 2006;17:27–33.
60. Micames C, Jowell PS, White R. Lower frequency of peritoneal carcinomatosis in patients with pancreatic cancer diagnosed by EUS-guided FNA vs. percutaneous FNA. *Gastrointest Endosc.* 2003;58:690–5.
61. Hruban RH, Boffeta P, Hiraoka N, Iacobuzio-Donahue C, Kato Y, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Maitra A, Offerhaus GJA, Pitman MB. Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In: Bosman FT, Carnairo F, Hruban RH, Theise ND, eds. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*, 4th Edn. IARC: Lyon; 2010. pp. 281-291.
62. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007; 36:831–849.
63. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25:579–586.
64. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, et al. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2003;3:565–576.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

65. Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, Konieczny SF. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* 2007;171:263–273.
66. McCleary-Wheeler AL, McWilliams R, Fernandez-Zapico ME. Aberrant signaling pathways in pancreatic cancer: a two compartment view. *Mol Carcinog.* 2012;51:25-39.
67. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: A star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest.* 2007;117:50–59.
68. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:S44–S47.
69. Westgaard A, Tafjord S, Farstad IN, Cvancarova M, Eide TJ, Mathisen O, et al. Resectable adenocarcinomas in the pancreatic head: the retroperitoneal resection margin is an independent prognostic factor. *BMC Cancer.* 2008;8:5.
70. Garcea G, Dennison AR, Ong SL, Pattenden CJ, Neal CP, Sutton CD, et al. Tumour characteristics predictive of survival following resection for ductal adenocarcinoma of the head of pancreas. *Eur J Surg Onco.* 2007;33:892-897.
71. Berger AC, Watson J, Ross EA, Hoffman JP. The metastatic/examined lymph node ratio is an important prognostic factor after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am Surg.* 2004;70:235–40.
72. Hellan M, Sun CI, Artinyan A, Mojica-Manosa P, Bhatia S, Ellenhorn JD, et al. The impact of lymph node number on survival in patients with lymph node-negative pancreatic cancer. *Pancreas.* 2008;37:19–24.
73. Slidell MB, Chang DC, Cameron JL, Wolfgang C, Herman JM, Schulick RD, et al. Impact of total lymph node count and lymph node ratio on staging and survival after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma: a large, population-based analysis. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:165–74.
74. Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:163-9.
75. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000;60:2002–6.
76. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol.* 2000;156:1821–25.
77. Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol.* 2005;12:81–91.

78. Berman JJ, Albores-Saavedra J, Bostwick D, Delellis R, Eble J, Hamilton SR, et al. Precancer: a conceptual working definition -- results of a Consensus Conference. *Cancer Detect Prev.* 2006;30:387–94.
79. Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS. Tumors of the pancreas. Atlas of tumor pathology, 4th series, Fascicle 6 edn. Editor Stephen G. Silverberg. American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 2007.
80. Yoshizawa K, Nagai H, Sakurai S, Hironaka M, Morinaga S, Saitoh K, et al. Clonality and K-ras mutation analyses of epithelia in intraductal papillary mucinous tumor and mucinous cystic tumor of the pancreas. *Virchows Arch.* 2002;441:437–43.
81. Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, et al. Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:1544–48.
82. Kim SG, Wu TT, Lee JH, Yun YK, Issa JP, Hamilton SR, et al. Comparison of epigenetic and genetic alterations in mucinous cystic neoplasm and serous microcystic adenoma of pancreas. *Mod Pathol.* 2003;16:1086–94.
83. Iacobuzio-Donahue CA, Klimstra DS, Adsay NV, Wilentz RE, Argani P, Sohn TA, et al. Dpc-4 protein is expressed in virtually all human intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: comparison with conventional ductal carcinomas. *Am J Pathol.* 2000;157:755–61.
84. Schonleben F, Qiu W, Ciau NT, Ho DJ, Li X, Allendorf JD, et al. PIK3CA mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3851–55.
85. Hulst SPL. Zur kenntnis der Genese des Adenokarzinoms und Karzinoms des Pankreas. *Virchows Arch.* 1905;180:288–316.
86. Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008;1:306-16.
87. Halsted WS. Contributions to the surgery of the bile passages, especially of the common bile duct. *Boston Med Surg J.* 1899;141:645-54.
88. Kausch W. Das carcinoma der papilla duodeni und seine radikale Entfeinung. *Beitr Z Clin Chir.* 1912;78:439-86.
89. Whipple AO, Parsons WB, Mullins CR. Treatment of carcinoma of the ampulla of Vater. *Ann Surg* 1935; 102: 763-79.
90. Whipple AO. Present-day surgery of the pancreas. *N Eng J Med.* 1942;226:515.
91. Whipple AO. A reminiscence: pancreaticoduodenectomy. *Rev Surg.* 1963;20:221-25.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

92. Trimble IR, Parsons JW, Sherman CP. A one-stage operation for the cure of carcinoma of the ampulla of Vater and head of the pancreas. *Surg Gynecol Obstet.* 1941;73:711-22.
93. Hunt VC. Surgical management of carcinoma of the ampulla of Vater and periampullary portion of duodenum. *Ann Surg* 1941;114:570-602.
94. Watson K. Carcinoma of ampulla of Vater: successful radical resection. *Br J Surg.* 1944;31:368-73.
95. Traverso LW, Longmire WP Jr. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surg Gynecol Obstet.* 1978;146:959-62.
96. Sastre B, Ouassi M, Pirro N, Cosentino B, Sielezneff I. La duodenopancreatectomie céphalique à l'ère de la médecine factuelle. *Ann Chir.* 2005;130:295-302.
97. Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg.* 2006;244:10-15.
98. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sohn TA, Campbell KA, Sauter PK, et al. Pancreaticoduodenectomy with or without distal gastrectomy and extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma, part 2: randomized controlled trial evaluating survival, morbidity, and mortality. *Ann Surg.* 2002;236:355-66.
99. Herman JM, Swartz MJ, Hsu CC, Winter J, Pawlik TM, Sugar E, et al. Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital. *J Clin Oncol.* 2008;26:3503-10.
100. Merkow RP, Bilimoria KY, Tomlinson JS, Paruch JL, Fleming JB, Talamonti MS, et al. Postoperative Complications Reduce Adjuvant Chemotherapy Use in Resectable Pancreatic Cancer. *Ann Surg.* 2013. Epub ahead of print.
101. Fernández-Cruz L, Sabater-Ortiz-L, Fabregat J, Boggi U. Complicaciones después de una pancreaticoduodenectomía. *Cir Esp.* 2012;90:222-32.
102. Kalser MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg.* 1985;120:899-903.
103. Bosset J, Pavy JJ, Gillet M, Manton G, Pelissier E, Schraub S. Conventional external irradiation alone as adjuvant treatment in resectable pancreatic cancer: Results of a prospective study. *Radiother Oncol.* 1992;24:191-4.
104. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997;15:2403-13.

105. Oettle, H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*. 2007;297:267-77.
106. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364:1817-25.
107. Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. *Br j Surg*. 2007;94:261-62.
108. Greer SE, Pipas JM, Sutton JE, Zaki BI, Tsapakos M, Colachio TA, et al. Effect of neoadjuvant therapy on local recurrence after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg*. 2008;206:451-57.
109. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010;220:263-80.
110. Winter C, Kristiansen G, Kersting S, Roy J, Aust D, Knösel T, et al. Google goes cancer: improving outcome prediction for cancer patients by network-based ranking of marker genes. *PLoS Comput Biol*. 2012;8:e1002511.
111. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-7.
112. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10869-74.
113. Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest*. 2008;26:1-10.
114. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530-6.
115. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:2817-2826.
116. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8:R25.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

117. Goldstein LJ, Gray R, Badve S, Childs BH, Yoshizawa C, Rowley S, et al. Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor-positive operable breast cancer compared with classical clinicopathologic features. *J Clin Oncol*. 2008;26:4063–4071.
118. Barrier A, Roser F, Boelle PY, Franc B, Tse C, Brault D, et al. Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling. *Oncogene*. 2007;26:2642-8.
119. Lin YH, Friederichs J, Black MA, Mages J, Rosenberg R, Guilford PJ, et al. Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:498-507.
120. Vendrell E, Ribas M, Valls J, Solé X, Grau M, Moreno V, et al. Genomic and transcriptomic prognostic factors in R0 Dukes B and C colorectal cancer patients. *Int J Oncol*. 2007;30:1099-107.
121. Navarro S, Pérez-Segura P, Ramón y Cajal S, Salazar R, García-Foncillas J, Musulén Palet E, et al. Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica *Rev Esp Patol*. 2012;45:130-144.
122. Kelley RK, Venook AP. Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: is there a role for gene expression profiling? *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10:73-80.
123. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, Paik S, Clark-Langone KM, Lopatin M, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol*. 2010;28:3937-44.
124. Gray RG, Quirke P, Handley K, Paik S, Clark-Langone KM, Lopatin M, et al. Validation Study of a Quantitative Multigene Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for Assessment of Recurrence Risk in Patients With Stage II Colon Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:4611-9.
125. Glas AM, Roepman P, Salazar R, Capella G, Moreno V, Westerga J, et al. Development and validation of a robust prognostic and predictive signature for colorectal cancer (CRC) patients. *ASCO Meeting Abstracts*. 2009;27:4036.
126. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:17-24.
127. Rosenberg R, Maak M, Simon I, Nitsche U, Schuster T, Kuenzli B, et al. Independent validation of a prognostic genomic profile (ColoPrint) for stage II colon cancer (CC) patients. *ASCO Meeting Abstracts*. 2009;29:358.

128. Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, Davison T, Black JM, Kay EW, et al. Development and Independent Validation of a Prognostic Assay for Stage II Colon Cancer Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. *J Clin Oncol*. 2011;29:4620-6.
129. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487,330–7.
130. Gómez JJ, de Castro J, Concha A, Felip E, Isla D, López-Ríos F, et al. Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Rev Esp Patol*. 2012;45:14-28.
131. Beer DG, Kardia SLR, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002;8:816–24.
132. Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, Pintilie M, Rossant J, Liu N, et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res*. 2002;62:3005–8.
133. Sun Z, Yang P, Aubry MC, Kosari F, Endo C, Molina J, et al. Can gene expression profiling predict survival for patients with squamous cell carcinoma of the lung? *Mol Cancer*. 2004;3: 35.
134. Borczuk AC, Shah L, Pearson GD, Walter KL, Wang L, Austin JH, et al. Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:167–74.
135. Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, et al. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med*. 2006;3:e467.
136. Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Nielsen T, Loader J, Terris B, Stamp G, et al. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. *Oncogene*. 2002;21:4587-94.
137. Ryu B, Jones J, Hollingsworth MA, Hruban RH and Kern SE. Invasion specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res*. 2001;61,1833–8.
138. Iacobuzio-Donahue CA, Ryu B, Hruban RH and Kern SE. Exploring the host desmoplastic response to pancreatic carcinoma: gene expression of stromal and neoplastic cells at the site of primary invasion. *Am J Pathol*. 2002;160,91–9.
139. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. 2000;24,227–35.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

140. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*. 1997;278:1481-3.
141. Sirivatanauksorn Y, Drury R, Crnogorac-Jurcević T, Sirivatanauksorn V, Lemoine NR. Laser-assisted microdissection: applications in molecular pathology. *J Pathol*. 1999;189:150-4.
142. Ryu B, Jones J, Hollingsworth MA, Hruban RH and Kern SE. Relationships and identification of differentially expressed genes among pancreatic cancers examined by large-scale serial analysis of gene expression. *Cancer Res*. 2002;62:5351-7.
143. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995;270:484-7.
144. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*. 1997;276:1268-72.
145. Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SD, Leach SD, et al. Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: Prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2001; 61:4320-4.
146. Hustinx SR, Cao D, Maitra A, Sato N, Martin ST, Sudhir D, et al. Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther*. 2004;3:1254-61
147. Zhou W, Sokoll LJ, Bruzek DJ, Zhang L, Velculescu VE, Goldin SB, et al. Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7:109-12.
148. Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, et al. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene*. 2001;20:7437-46.
149. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, et al. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol*. 2003;162:1151-62.
150. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, et al. Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol*. 2002;160:1239-49.
151. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*. 2010;32:524-36.
152. Mardis ER. Next-generation, DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402.

153. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 2008;5:16–8.
154. Shendure J, Ji H. Next-generation, DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1135–45.
155. Ansorge WJ. Next-generation, DNA sequencing techniques. *Nat Biotechnol.* 2009;25:195–203.
156. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31-46.
157. Wold B, Myers RM. Sequence census methods for functional genomics. *Nature Methods.* 2008;5:19–21.
158. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev Genet.* 2009;10:57–63.
159. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map05212
160. Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E. Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: potential clinical implications. *Med Sci Monit.* 2006;12:186-93.
161. Remmers N, Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Molecular pathology of early pancreatic cancer. *Cancer Biomark.* 2010;9:421-40.
162. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988;53:549-54.
163. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2009;283:125-34.
164. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008;321:1801-6.
165. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galbán S, Galbán CJ, et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest.* 2012;122:639-53.
166. Dutta PR, Maity A. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett.* 2007;254:165-77.
167. Court H, Amoyel M, Hackman M, Lee KE, Xu R, Miller G, et al. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase deficiency exacerbates KRAS-driven pancreatic neoplasia via Notch suppression. *J Clin Invest.* 2013;123:4681-94.
168. Hanlon L, Avila JL, Demarest RM, Troutman S, Allen M, Ratti F, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2010;70:4280-6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

169. Mazur PK, Einwächter H, Lee M, Sipos B, Nakhai H, Rad R, et al. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13438-43.
170. Hu H, Zhou L, Awadallah A, Xin W. Significance of Notch1-signaling pathway in human pancreatic development and carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21:242-7.
171. Sjölund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT, Axelson H. The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *Eur J Cancer*. 2005;41:2620-9.
172. Alison MR, Lin WR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:589-98.
173. Hruban RH, Wilentz RE, Goggins M, Offerhaus GJ, Yeo CJ, Kern SE. Pathology of incipient pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 1999;10,9-11.
174. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 1999;400:877-81.
175. Sierra JR, Tsao MS. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3:S21-35.
176. Tan XG, Yang ZL. Expression of Ezrin, HGF, C-met in pancreatic cancer and non-cancerous pancreatic tissues of rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010;9:639-44.
177. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:41-59.
178. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:504-16.
179. Furukawa T, Duguid WP, Kobari M, Matsuno S, Tsao MS. Hepatocyte growth factor and Met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol*. 1995;147:889-95.
180. Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1995;55:1129-38.
181. Liu N, Furukawa T, Kobari M, Tsao MS. Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol*. 1998;153:263-9.
182. Liu X, Newton RC, Scherle PA. Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends Mol Med*. 2010;16:37-45.

183. Bo H, Zhang S, Gao L, Chen Y, Zhang J, Chang X, Zhu M. Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. 2013;13:496.
184. Davis LA, Zur Nieden NI. Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:2658-74.
185. Pasca di Magliano M, Biankin AV, Heiser PW, Cano DA, Gutierrez PJ, Deramaudt T, et al. Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. 2007; 2(11):e1155.
186. Zeng G, Germinaro M, Micsenyi A, Monga NK, Bell A, Sood A, et al. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2006;8:279-89.
187. Ren D, Minami Y, Nishita M. Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genes Cells*. 2011;16:304–315.
188. Jin Z, Zhao C, Han X, Han Y. Wnt5a promotes ewing sarcoma cell migration through upregulating CXCR4 expression. *BMC Cancer*. 2012;12:480.
189. Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress T, Michl P: WNT5A–target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2007, 28(6):1178–87.
190. Romero D, Iglesias M, Vary CP, Quintanilla M. Functional blockade of Smad4 leads to a decrease in beta-catenin levels and signaling activity in human pancreatic carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2008;29:1070-6.
191. Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U. c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol*. 2002;15:462-9.
192. Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2010.15;16:1094-9.
193. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 1997;57:3126-30.
194. Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Adv Cancer Res*. 2011;110:107–139.
195. Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, et al. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2007;13:3714-20.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

196. Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Smolarz B, Romanowicz-Makowski H, Strzelczyk J, Janiak A, Malecka-Panas E. Comparative evaluation of p53 mutation in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Hepatogastroenterology*. 2006;53:608-12.
197. Li Y, Bhuiyan M, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Molecular analysis of the p53 gene in pancreatic adenocarcinoma. *Diagn Mol Pathol*. 1998;7:4-9.
198. <http://p53.free.fr/index.html>
199. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004;116:235-46.
200. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1998;58:5329-32.
201. Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg*. 2003;186:279-86.
202. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, Parmigiani G, Jones S, Zhang X, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(14):4674–4679.
203. Levy L, Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Molecular and cellular biology*. 2005;25:8108-25.
204. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer*. 2005;41:2213-36.
205. Zafonte BT, Hult J, Amanatullah DF, Albanese C, Wang C, Rosen E, et al. Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. *Front Biosci*. 2000;5:938-61.
206. Cebola I, Peinado MA. Epigenetic deregulation of the COX pathway in cancer. *Prog Lipid Res*. 2012;51:301-13.
207. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer*. 2001;91:333-8.
208. Bao B, Wang Z, Li Y, Kong D, Ali S, Banerjee S, et al. The complexities of obesity and diabetes with the development and progression of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815:135-46.
209. Hakam A, Fang Q, Karl R, Coppola D. Coexpression of IGF-1R and c-Src proteins in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 2003;48:1972-8.

210. Vu HA, Beppu Y, Chi HT, Sasaki K, Yamamoto H, Xinh PT, et al. Green tea epigallocatechin gallate exhibits anticancer effect in human pancreatic carcinoma cells via the inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:290516.
211. Michl P, Downward J. Mechanisms of disease: PI3K/AKT signaling in gastrointestinal cancers. *Z Gastroenterol.* 2005;43:1133-9.
212. Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:2110-5.
213. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Morooka T, Nagano H, Dono K, et al. Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2846-50.
214. Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:2110-5.
215. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2004;23:8571-80.
216. Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Uchimura H, et al. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y)proteins. *Cancer Res.* 2000;60:3117-22.
217. Liau SS, Whang E. HMGA1 is a molecular determinant of chemoresistance to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1470-7.
218. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441:431-6.
219. Agou F, Courtois G, Chiaravalli J, Baleux F, Coïc YM, Traincard F, et al. Inhibition of NF-kappa B activation by peptides targeting NF-kappa B essential modulator (nemo) oligomerization. *J Biol Chem.* 2004;279:54248-57.
220. Liptay S, Weber CK, Ludwig L, Wagner M, Adler G, Schmid RM. Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2003;105:735-46.
221. Rhim AD, Stanger BZ. Molecular biology of pancreatic ductal adenocarcinoma progression: aberrant activation of developmental pathways. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010;97:41-78.
222. Hidalgo M, Maitra A. The hedgehog pathway and pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2094-2096.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

223. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003;425:851-6.
224. Kim EJ, Simeone DM. Advances in pancreatic cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27(5):460-466.
225. Kelleher FC. Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(4):445-451.
226. Li X, Ma Q, Xu Q, Liu H, Lei J, Duan W, et al. SDF-1/CXCR4 signaling induces pancreatic cancer cell invasion and epithelial-mesenchymal transition in vitro through non-canonical activation of Hedgehog pathway. *Cancer Lett*. 2012;322:169-76.
227. Furuyama K, Doi R, Mori T, Toyoda E, Ito D, Kami K, et al. Clinical significance of focal adhesion kinase in resectable pancreatic cancer. *World J Surg*. 2006;30:219-26.
228. Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2000;87:1035-40.
229. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:276-85.
230. Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2011;19:728-39.
231. Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, et al. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res*. 2011;71:5020-9.
232. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:904-10.
233. Torrisani J, Bournet B, Cordelier P, Buscail L. Nouvelles cibles moléculaires dans le cancer du pancréas. *Bull Cancer*. 2008;95:503-12.
234. Benckert C, Thelen A, Cramer T, Weichert W, Gaebelein G, Gessner R, Jonas S. Impact of microvessel density on lymph node metastasis and survival after curative resection of pancreatic cancer. *Surg Today*. 2012;42:169-76.
235. Yan C, Wang C, Dong M, Liu S, Qi C, Zhao Y. RNA interference-mediated silencing of VEGF and bFGF suppresses endostatin secretion in pancreatic carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2013;5:1031-35.
236. Matsubara S, Ding Q, Miyazaki Y, Kuwahata T, Tsukasa K, Takao S. mTOR plays critical roles in pancreatic cancer stem cells through specific and stemness-related functions. *Sci Rep*. 2013;3:3230.

237. Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol.* 2000;18:457–9.
238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
239. Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, Ryu B, Rosty C, Goggins M, Wilentz RE, et al. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res* 2001;7:3862-8.
240. Friess H, Ding J, Kleeff J, Liao Q, Berberat PO, Hammer J, Büchler MW. Identification of disease-specific genes in chronic pancreatitis using DNA array technology. *Ann Surg.* 2001;234:769-78.
241. Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluce R, Nagle RB, Von Hoff DD. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res.* 2002;62:2890-6.
242. Crnogorac-Jurcevic T, Missiaglia E, Blaveri E, Gangeswaran R, Jones M, Terris B, et al. Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. *J Pathol.* 2003;201:63–74.
243. Friess H, Ding J, Kleeff J, Fenkell L, Rosinski JA, Guweidhi A, Reidhaar-Olson JF, Korc M, Hammer J, Büchler MW. Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1180-99.
244. Grützmann R, Foerder M, Alldinger I, Staub E, Brümmendorf T, Röpcke S, et al. Gene expression profiles of microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Virchows Arch.* 2003;443:508-17.
245. Grützmann R, Pilarsky C, Staub E, Schmitt AO, Foerder M, Specht T, et al. Systematic isolation of genes differentially expressed in normal and cancerous tissue of the pancreas. *Pancreatology.* 2003;3:169–78
246. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, et al. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res.* 2003;63:8614-22.
247. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenon JK, Giodarno TJ, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003;63:2649–57.
248. Tan ZJ, Hu XG, Cao GS, Tang Y. Analysis of gene expression profile of pancreatic carcinoma using cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:818-23.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

249. Yoshida K, Ueno S, Iwao T, Yamasaki S, Tsuchida A, Ohmine K, et al. Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Sci.* 2003;94:263-70.
250. Cao D, Hustinx SR, Sui G, Bala P, Sato N, Martin S, et al. Identification of novel highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas through a bioinformatics analysis of expressed sequence tags. *Cancer Biol Ther.* 2004;3:1081-9.
251. Binkley CE, Zhang L, Greenson JK, Giordano TJ, Kuick R, Misek D, et al. The molecular basis of pancreatic fibrosis. *Pancreas.* 2004;29:254–63.
252. Brandt R, Grützmann R, Bauer A, Jesnowski R, Ringel J, Lohr M, et al. DNA microarray analysis of pancreatic malignancies. *Pancreatology* 2004;4:587-97.
253. Grützmann R, Pilarsky C, Ammerpohl O, Lüttges J, Böhme A, Sipos B, et al. Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia.* 2004;6:611-22.
254. Grützmann R, Saeger HD, Lüttges J, Schackert HK, Kalthoff H, Klöppel G, Pilarsky C. Microarray-based gene expression profiling in pancreatic ductal carcinoma: status quo and perspectives. *Int J Colorectal Dis.* 2004;19:401-13.
255. Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, Shen Y. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics.* 2004;4:3975-88.
256. Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, Wang YH, Costello E, Neoptolemos JP, et al. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer.* 2004;112:100–12.
257. Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, et al. Genomewide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene.* 2004;23:2385-400.
258. Buchholz M, Braun M, Heidenblut A, Kestler HA, Klöppel G, Schmiegel W, et al. Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene.* 2005;24:6626-36.
259. Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bhakta V, Capurso G, Lattimore S, Akada M, et al. Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 2005;129:1454-63.
260. Fukushima N, Koopmann J, Sato N, Prasad N, Carvalho R, Leach SD, et al. Gene expression alterations in the non-neoplastic parenchyma adjacent to infiltrating pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2005;18:779-87.
261. Grützmann R, Boriss H, Ammerpohl O, Lüttges J, Kalthoff H, Schackert HK, et al. Meta-analysis of microarray data on pancreatic cancer defines a set of commonly dysregulated genes. *Oncogene.* 2005;24:5079-88.

262. Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, et al. Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. *Cancer Sci.* 2005;96:387–93.
263. Jin G, Hu XG, Ying K, Tang Y, Liu R, Zhang YJ, et al. Discovery and analysis of pancreatic adenocarcinoma genes using cDNA microarrays. *World J Gastroenterol.* 2005;11:6543-8.
264. Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N, Maitra A, Dhara S, Elkahloun AG, et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* 2005; 65:1619-26.
265. Segara D, Biankin AV, Kench JG, Langusch CC, Dawson AC, Skalicky DA, et al. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3587-96.
266. Johnson SK, Dennis RA, Barone GW, Lamps LW, Haun RS. Differential expression of insulin-like growth factor binding protein-5 in pancreatic adenocarcinomas: identification using DNA microarray. *Mol Carcinog.* 2006;45:814-27.
267. Laurell H, Bouisson M, Berthelemy P, Rochaix P, Dejean S, Besse P, et al. Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol.* 2006;12:3344-51.
268. Rogers CD, Fukushima N, Sato N, Shi C, Prasad N, Hustinx SR, et al. Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:1383-9.
269. Nakamura T, Fidler IJ, Coombes KR. Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment. *Cancer Res.* 2007;67:139-48.
270. Nakamura T, Kuwai T, Kitadai Y, Sasaki T, Fan D, Coombes KR, et al. Zonal heterogeneity for gene expression in human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 2007;67:7597-604.
271. Niedergethmann M, Alves F, Neff JK, Heidrich B, Aramin N, Li L, et al. Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model. *Br J Cancer.* 2007;97:1432-40.
272. Kim HN, Choi DW, Lee KT, Lee JK, Heo JS, Choi SH, et al. Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative pancreatic cancer. *Pancreas.* 2007;34:325-34.
273. Lowe AW, Olsen M, Hao Y, Lee SP, Taek Lee K, et al. Gene expression patterns in pancreatic tumors, cells and tissues. *PLoS ONE.* 2007;2:e323.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

274. Badea L, Herlea V, Dima SO, Dumitrascu T, Popescu I. Combined gene expression analysis of whole-tissue and microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma identifies genes specifically overexpressed in tumor epithelia. *Hepatogastroenterology*. 2008;55:2016-27.
275. Balagurunathan Y, Morse DL, Hostetter G, Shanmugam V, Stafford P, Shack S, et al. Gene expression profiling-based identification of cell-surface targets for developing multimeric ligands in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:3071-80.
276. Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R, Infante JR, Murphy K, Pandey A, et al. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:188–96.
277. Pilarsky C, Ammerpohl O, Sipos B, Dahl E, Hartmann A, Wellmann A. Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling. *J Cell Mol Med*. 2008;12:2823-35.
278. Hirono S, Yamaue H, Hoshikawa Y, Ina S, Tani M, Kawai M, et al. Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling. *Cancer Sci*. 2010;101:259-66.
279. Stratford JK, Bentrem DJ, Anderson JM, Fan C, Volmar KA, Marron JS, et al. A six-gene signature predicts survival of patients with localized pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS Med*. 2010;7:e1000307.
280. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*. 2011;17:500-3.
281. Bournet B, Pointreau A, Souque A, Oumouhou N, Muscari F, Lepage B, et al. Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low density array on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *Pancreatology*. 2012;12:27-34.
282. Kuo WP, Jenssen TK, Butte AJ, Ohno-Machado L, Kohane IS. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics*. 2002;18:405–12.
283. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003;33:49-54.
284. DiFeo A, Martignetti JA, Narla G. The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2009;12:1–7.
285. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436:518-24.

286. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*. 2005;115:44-55.
287. Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, et al. Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:6740-5.
288. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006;59:225-31.
289. Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*. 2006;127,1041-55.
290. Decker K, Goldman DC, Grash CL, Sussel L. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Dev Biol*. 2006;298,415–29.
291. Kwei KA, Bashyam MD, Kao J, Ratheesh R, Reddy EC, Kim YH, et al. Genomic profiling identifies GATA6 as a candidate oncogene amplified in pancreaticobiliary cancer. *PLoS Genet*. 2008;4,e1000081.
292. Fu B, Luo M, Lakkur S, Lucito R, Iacobuzio-Donahue CA. Frequent genomic copy number gain and overexpression of GATA-6 in pancreatic carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2008;7,1593–601.
293. Paron I, Berchtold S, Vörös J, Shamarla M, Erkan M, Höfler H, Esposito I. Tenascin-C enhances pancreatic cancer cell growth and motility and affects cell adhesion through activation of the integrin pathway. *PLoS One*. 2011;6:e21684.
294. Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S, Chan W, Greco MA, et al. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res*. 1996;56:182–9.
295. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*. 1997;150:1349–60.
296. Mackie EJ, Tucker RP, Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Epperlein HH. The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development*. 1988;102:237–50.
297. Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, Orend G. Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:3175-99.
298. Erickson HP, Bourdon MA. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:71–92.
299. Koukoulis GK, Gould VE, Bhattacharyya A, Gould JE, Howedy AA, Virtanen I. Tenascin in normal, reactive, hyperplastic, and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum Pathol*. 1991;22:636-43.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

300. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 2004;18:1016-8.
301. Jahkola T, Toivonen T, Virtanen I, von Smitten K, Nordling S, von Boguslawski K, et al. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *Br J Cancer* 1998;78:1507–13.
302. Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 1995;1:1035–41.
303. Kressner U, Lindmark G, Tomasini-Johansson B, Bergström R, Gerdin B, Pålman L, Glimelius B. Stromal tenascin distribution as a prognostic marker in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997;76:526–30.
304. Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, et al. Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001;92:1419–26.
305. Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer.* 2003;98:2430-9.
306. Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F, et al. Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2005;25:489-95.
307. Juuti A, Nordling S, Louhimo J, Lundin J, Haglund C. Tenascin C expression is upregulated in pancreatic cancer and correlates with differentiation *J Clin Pathol.* 2004;57:1151–5.
308. Esposito I, Penzel R, Chaib-Harriche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, et al. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol.* 2006;208:673-85.
309. Linder S, Castaños-Velez E, von Rosen A, Biberfeld P. Immunohistochemical expression of extracellular matrix proteins and adhesion molecules in pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2001;48:1321-7.
310. Gong DY, Fu HX, Peng Y, You YQ, Li ZP. Diagnostic value of serum CEACAM1 in patients with pancreatic cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011;31:164-6.
311. Williams T, Admon A, Luscher B, Tjian R. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Gene Dev.* 1988;2:1557–69.
312. Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 2005;6:246.

313. Werling U, Schorle H. Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:3149–56.
314. Moser M, Dahmen S, Kluge R, Gröne H, Dahmen J, Kunz D, et al. Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2 beta. *Lab Invest.* 2003; 83:571–8.
315. Brewer S, Williams T. Loss of AP-2alpha impacts multiple aspects of ventral body wall development and closure. *Dev Biol.* 2004;267:399–417.
316. Orso F, Penna E, Cimino D, Astanina E, Maione F, Valdembri D, et al. AP-2a and AP-2g regulate tumor progression via specific programs. *FASEB J.* 2008;22:2704–14
317. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, Hurst HC. Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J Pathol.* 1999;189:514–20.
318. Anttila MA, Kellokoski JK, Moisio KI, Mitchell PJ, Saarikoski S, Syrjänen K, Kosma VM. Expression of transcription factor AP-2alpha predicts survival in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2000;82:1974–83.
319. Ruiz M, Troncoso P, Bruns C, Bar-Eli M. AP-2a transcription factor expression is associated with luminal differentiation and is lost in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4086-95.
320. Ropponen KM, Kellokoski JK, Pirinen RT, Moisio KI, Eskelinen MJ, Alhava EM, Kosma VM. Expression of transcription factor AP-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas; comparison of immunohistochemistry and in situ hybridisation. *J Clin Pathol.* 2001;54:533–8.
321. Zhu CH, Domann FE. Dominant negative interference of transcription factor AP-2 causes inhibition of ErbB-3 expression and suppresses malignant cell growth. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;71:47–57.
322. Tellez C, Bar-Eli M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene.* 2003;22,3130–7.
323. Ruiz M, Pettaway C, Song R, Stoeltzing O, Ellis L, Bar-Eli M. Activator protein 2alpha inhibits tumorigenicity and represses vascular endothelial growth factor transcription in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:631–8.
324. Douglas DB, Akiyama Y, Carraway H, Belinsky SA, Esteller M, Gabrielson E, et al. Hypermethylation of a small CpGuanine-rich region correlates with loss of activator protein-2alpha expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64:1611-20.
325. Leslie MC, Bar-Eli M. Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *J Cell Biochem.* 2005;94:25–38.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

326. Heimberger AB, McGary EC, Suki D, Ruiz M, Wang H, Fuller GN, Bar-Eli M. Loss of the AP-2alpha transcription factor is associated with the grade of human gliomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11:267–72.
327. Schwartz B, Melnikova VO, Tellez C, Mourad-Zeidan A, Blehm K, Zhao YJ, et al. Loss of AP-2a results in deregulation of E-cadherin and MMP-9 and an increase of tumorigenicity of colon cancer cells in vivo. *Oncogene.* 2007;14:4049–58.
328. Wang W, Lv L, Pan K, Zhang Y, Zhao JJ, Chen JG, et al. Reduced expression of transcription factor AP-2 α is associated with gastric adenocarcinoma prognosis. *PLoS One.* 2011;6:e24897.
329. Carrière C, Mirocha S, Deharvengt S, Gunn JR, Korc M. Aberrant expressions of AP-2 α splice variants in pancreatic cancer. *Pancreas.* 2011;40:695-700.
330. Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grooteclaes M, Winkler R. Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem. J.* 2003;370,323–9.
331. Jonckheere N, Fauquette V, Stechly L, Saint-Laurent N, Aubert S, Susini C, et al. Tumour growth and resistance to gemcitabine of pancreatic cancer cells are decreased by AP-2alpha overexpression. *Br J Cancer.* 2009;101:637-44.
332. Pellikainen J, Kataja V, Ropponen K, Kellokoski J, Pietilainen T, Böhm J, et al. Reduced nuclear expression of transcription factor AP-2 associates with aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3487–95.
333. Sumigama S, Ito T, Kajiyama H, Shibata K, Tamakoshi K, Kikkawa F, et al. Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cells by overexpression of AP-2alpha. *Oncogene.* 2004;23,5496–504.
334. Bar-Eli M. Role of AP-2 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18:377–85.
335. Fauquette V, Aubert S, Groux-Degroote S, Hemon B, Porchet N, Van Seuning I, Pigny P. Transcription factor AP-2alpha represses both the mucin MUC4 expression and pancreatic cancer cell proliferation. *Carcinogenesis.* 2007;28:2305-12.
336. Fauquette V, Perrais M, Cerulis S, Jonckheere N, Ducourouble MP, Aubert JP, et al. The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells. *Biochem J.* 2005;386:35-45.
337. Saitou M, Goto M, Horinouchi M, Tamada S, Nagata K, Hamada T, et al. MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *J Clin Pathol.* 2005;58:845-52.

338. Wajapeyee N, Ganpat Raut C, Somasundaram K. AP-2a status determines the chemosensitivity of cancer cells: implications in cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2005;65:8628–34.
339. Wajapeyee N, Britto R, Ravishankar HM, Somasundaram K. Apoptosis induction by AP-2a involves transcriptional repression of Bcl-2. *J Biol Chem.* 2006;281:16207–19
340. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science.* 1994;263:526–9.
341. Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, Komiyama S. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2001;23:962–6.
342. Boltze C, Schneider-Stock R, Meyer F, Peters B, Quednow C, Hoang-Vu C, Roessner A. Maspin in thyroid cancer: its relationship with p53 and clinical outcome. *Oncol Rep.* 2003;10:1783–7.
343. Boltze C. Loss of maspin is a helpful prognosticator in colorectal cancer: a tissue microarray analysis. *Pathol Res Pract.* 2005;200:783–90.
344. Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, Bathke W, Minssen A, Kollmannsberger C, et al. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Int J Cancer.* 2001; 95:337–42.
345. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer* 2002;100:452–5.
346. Ohike N, Maass N, Mundhenke C, Biallek M, Zhang M, Jonat W, et al. Clinicopathological significance and molecular regulation of maspin expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Lett.* 2003;199:193–200.
347. Maass N, Ueding M, Lüttges J, Lüttges J, Klöppel G, Jonat W, Nagasaki K. Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers. *Clin Cancer Res.* 2001;7:812–7.
348. Cao D, Zhang Q, Wu LS, Salaria SN, Winter JW, Hruban RH, et al. Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases. *Mod Pathol.* 2007;20:570-8.
349. Mardin WA, Petrov KO, Enns A, Senninger N, Haier J, Mees ST. SERPINB5 and AKAP12 - expression and promoter methylation of metastasis suppressor genes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:549.
350. Yang XM, MacKenzie RE. NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase is the mammalian homolog of the mitochondrial enzyme encoded by the yeast MIS1 gene. *Biochemistry.* 1993;32:11118-23.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

351. Andrew AS, Gui J, Sanderson AC, Mason RA, Morlock EV, Schned AR, et al. Bladder cancer SNP panel predicts susceptibility and survival. *Hum Genet.* 2009;125:527-39.
352. Lehtinen L, Ketola K, Mäkelä R, Mpindi JP, Viitala M, Kallioniemi O, Iljin K. High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget.* 2013;4:48-63.
353. Loilome W, Wechagama P, Namwat N, Jusakul A, Sripa B, Miwa M, et al. Expression of oxysterol binding protein isoforms in opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma: a potential molecular marker for tumor metastasis. *Parasitol Int.* 2012;61:136-9.
354. Ho JR, Chapeaublanc E, Kirkwood L, Nicolle R, Benhamou S, Leuret T, et al. Dereglulation of Rab and Rab effector genes in bladder cancer. *PLoS One.* 2012;7:e39469.
355. Cheadle EJ, Riyad K, Subar D, Rothwell DG, Ashton G, Batha H, et al. Eotaxin-2 and colorectal cancer: a potential target for immune therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13:5719-28.
356. Rana S, Nissen F, Marr A, Markert A, Altmann A, Mier W, et al. Optimization of a Novel Peptide Ligand Targeting Human Carbonic Anhydrase IX. *PLoS ONE.* 2012;7: e38279.
357. Juhász M, Chen J, Lendeckel U, Kellner U, Kasper HU, Tulassay Z, et al. Expression of carbonic anhydrase IX in human pancreatic cancer *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:837–46.
358. Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, Scaloni A, Matulis D, Innocenti A, et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem.* 2008;283:27799–809.
359. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000;60(24):7075-83.
360. Potter CP, Harris AL. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer.* 2003;89:2-7.
361. Choschzick M, Oosterwijk E, Müller V, Woelber L, Simon R, Moch H, Tennstedt P. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer. *Virchows Arch.* 2011;459:193-200.
362. Dietz ML, Bernaciak TM, Vendetti F, Kielec JM, Hildebrand JD. Differential actin-dependent localization modulates the evolutionarily conserved activity of Shroom family proteins. *J Biol Chem.* 2006;281:20542-54.

363. Farber MJ, Rizaldy R, Hildebrand JD. Shroom2 regulates contractility to control endothelial morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 2011;22:795-805.
364. Lauriat TL, Dracheva S, Kremerskothen J, Duning K, Haroutunian V, Buxbaum JD, et al. Characterization of KIAA0513, a novel signaling molecule that interacts with modulators of neuroplasticity, apoptosis, and the cytoskeleton. *Brain Res*. 2006;1121:1-11.
365. Kong M, Kim Y, Lee C. A strong synergistic epistasis between FAM134B and TNFRSF19 on the susceptibility to vascular dementia. *Psychiatr Genet*. 2011;21:37-41.
366. Murphy SM, Davidson GL, Brandner S, Houlden H, Reilly MM. Mutation in FAM134B causing severe hereditary sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:119-20.
367. Li J, Kleeff J, Esposito I, Kayed H, Felix K, Giese T, et al. Expression analysis of PMP22/Gas3 in premalignant and malignant pancreatic lesions. *J Histochem Cytochem*. 2005;53:885-93.
368. Ploussard G, Terry S, Maillé P, Allory Y, Sirab N, Kheuang L, et al. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Res*. 2010;70:9253-64.
369. Lee KM, Cao D, Itami A, Pour PM, Hruban RH, Maitra A, Ouellette MM. Class III beta-tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraepithelial neoplasia. *Histopathology*. 2007;51:539-46.
370. Singh S, Chitkara D, Kumar V, Behrman SW, Mahato RI. miRNA profiling in pancreatic cancer and restoration of chemosensitivity. *Cancer Lett*. 2013;334:211-20.
371. Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family. *Int J Oncol*. 2004;25:1495-500.
372. Moody SA, Klein SL, Karpinski BA, Maynard TM, Lamantia AS. On becoming neural: what the embryo can tell us about differentiating neural stem cells. *Am J Stem Cells*. 2013;2:74-94.
373. Grote T, Logsdon CD. Progress on molecular markers of pancreatic cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23:508-14.
374. Simeone DM, Ji B, Banerjee M, Arumugam T, Li D, Anderson MA, et al. CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas*. 2007;34:436-43.
375. Jin J, Morse M, Frey C, Petko J, Levenson R. Expression of GPR177 (Wntless/Evi/Sprinter), a highly conserved Wnt-transport protein, in rat tissues, zebrafish embryos, and cultured human cells. *Dev Dyn*. 2010;239:2426-34.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

376. Chien AJ, Moore EC, Lonsdorf AS, Kulikauskas RM, Rothberg BG, Berger AJ, et al. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:1193-8.
377. Yang PT, Lorenowicz MJ, Silhankova M, Coudreuse DY, Betist MC, Korswagen HC. Wnt signaling requires retromer-dependent recycling of MIG-14/Wntless in Wnt-producing cells. *Dev Cell*. 2008;14:140-7.
378. Zhang Z, Iglesias D, Eliopoulos N, El Kares R, Chu L, Romagnani P, Goodyer P. A variant OSR1 allele which disturbs OSR1 mRNA expression in renal progenitor cells is associated with reduction of newborn kidney size and function. *Hum Mol Genet*. 2011;20:4167-74.
379. Katoh M. Molecular cloning and characterization of OSR1 on human chromosome 2p24. *Int J Mol Med*. 2002;10:221-5.
380. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:369-81.
381. Peschiaroli A, Skaar JR, Pagano M, Melino G. The ubiquitin-specific protease USP47 is a novel beta-TRCP interactor regulating cell survival. *Oncogene*. 2010;29:1384-93.
382. Yang SW, Oh KH, Park E, Chang HM, Park JM, Seong MW, et al. USP47 and C terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) antagonistically regulate katanin-p60-mediated axonal growth. *J Neurosci*. 2013;33:12728-38.
383. Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, Wei FY, Sato S, et al. Anks4b, a novel target of HNF4 α protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 2012;287:23236-45.
384. Ma T, Shi T, Huang J, Wu L, Hu F, He P, et al. DCUN1D3, a novel UVC-responsive gene that is involved in cell cycle progression and cell growth. *Cancer Sci*. 2008;99:2128-35.
385. Liu YG, Molly K-M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific. *DNA Binding Carcinogenesis*. 2001;22:851-60.
386. Hawthorne F, Feng S, Metlapally R, Li YJ, Tran-Viet KN, Guggenheim JA, et al. Association mapping of the high-grade myopia MYP3 locus reveals novel candidates UHRF1BP1L, PTPRR, and PPFIA2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:2076-86.

