

TESIS
DOCTORAL

ANÁLISIS MOLECULAR
EN TUMORES DE PÁNCREAS
AVANZADOS PARA IDENTIFICAR
BIOMARCADORES PREDICTIVOS
DE RESPUESTA A NUEVAS
DROGAS BIOLÓGICAS

Teresa Macarulla Mercadé

ANÁLISIS MOLECULAR EN TUMORES DE PÁNCREAS AVANZADOS
PARA IDENTIFICAR BIOMARCADORES PREDICTIVOS
DE RESPUESTA A NUEVAS DROGAS BIOLÓGICAS

Tesis para optar al grado de doctor
Teresa Macarulla Mercadé

Director de la tesis:
Dr. Josep Tabernero Caturla



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado de Medicina Interna
Facultad de Medicina

Barcelona, Diciembre 2015

*A todos aquellos que luchan
contra esta enfermedad*

Agradecimientos

A mis padres, por los valores transmitidos que guían mi vida día a día.

A mis tres hijos, por hacerme mejor persona.

A mi hermana, por estar incondicionalmente a mi lado.

A Toni, por acompañarme en la aventura de formar una familia y darme soporte en el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Josep Tabernero, por todo el apoyo que siempre he recibido de él, por todos los conocimientos transmitidos en el aprendizaje de la investigación clínica. Él ha sido para mí un ejemplo del esfuerzo en el trabajo, y de la calidad en el mismo. Y finalmente, ha permitido que me impregnara de su humanismo en el trato con los pacientes.

Al Dr. Rodrigo Dienstmann por todo el apoyo en la elaboración de la tesis.

A todos aquellos con los que me he ido encontrando a lo largo de mi vida profesional y me han acompañado en una parte de este camino. Destaco a Javier Ramos, por la huella que en su día dejó, que aun me acompaña.

A todos los pacientes que confían en nosotros, y sin los cuales no sería posible la investigación que desarrollamos ni este trabajo.

Índice

1	Introducción	8
2	Generalidades del cáncer de páncreas	10
2.1	Etiología del cáncer de páncreas	10
2.2	Presentación clínica, diagnóstico, y estadiaje del cáncer de páncreas	12
2.2.1	Presentación clínica	12
2.2.2	Diagnóstico	12
2.2.3	Estadificación	14
3	Biología del cáncer de páncreas	15
3.1	Lesiones pre-malignas	15
3.2	Biología molecular del adenocarcinoma de páncreas	18
3.2.1	Las células tumorales	19
3.2.1.1	Alteraciones genéticas	19
3.2.1.2	Vías básicas de señalización en el cáncer de páncreas	22
3.2.1.3	Clasificación molecular del cáncer de páncreas	24
3.2.2	<i>Stem cells</i> o células madre	27
3.2.3	Estroma	28
4	Tratamiento sistémico del cáncer de páncreas metastásico	31
4.1	Generalidades del tratamiento del cáncer de páncreas	31
4.2	Biomarcadores en cáncer de páncreas	41
4.3	Nuevas drogas en el horizonte del cáncer de páncreas metastásico	42
4.3.1	Agentes citotóxicos	42
4.3.2	Estrategias terapéuticas dirigidas contra el estroma	43
4.3.3	Estrategias terapéuticas dirigidas contra la inflamación	46
4.3.4	Estrategias contra las células madre o stem cells	47
4.3.5	Inmunoterapia	48
5	Justificación	51
6	Hipótesis	53
6.1	Principales	53
6.2	Secundarias	53
7	Objetivos	54
7.1	Primarios	54
7.2	Secundarios	54

8	Métodos	55
8.1	Tipo de estudio	55
8.2	Selección de la muestra	55
8.3	Análisis molecular aplicado a la muestra	55
8.4	Variables clínico-patológicas recogidas	57
8.5	Análisis estadístico	57
9	Resultados	58
9.1	Características basales de la población del estudio	58
9.2	Incidencia de la mutación de <i>KRAS</i> en la muestra analizada	59
9.3	Factor pronóstico de la mutación de <i>KRAS</i>	62
9.4	Frecuencia de la fracción del alelo de <i>KRAS</i>	63
9.5	Incidencia de otras alteraciones moleculares en la muestra analizada	64
9.6	Impacto de la muestra utilizada para el análisis y descripción del momento en la historia oncológica en el que se realiza el estudio molecular	64
9.7	Descripción de la población que participó en un estudio fase I como parte de su tratamiento	65
9.8	Supervivencia de los pacientes incluidos en la muestra	66
9.9	Supervivencia de los pacientes de la muestra incluidos en estudios fase I	67
9.10	Supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento	67
10	Discusión	69
10.1	<i>KRAS</i> y cáncer de páncreas	69
10.2	Otras alteraciones moleculares en cáncer de páncreas	71
10.3	Muestra tumoral para estudio molecular en cáncer de páncreas	72
10.4	Inclusión de pacientes con cáncer de páncreas en estudios fase I	73
11	Conclusiones	75
12	Bibliografía	76

1. Introducción

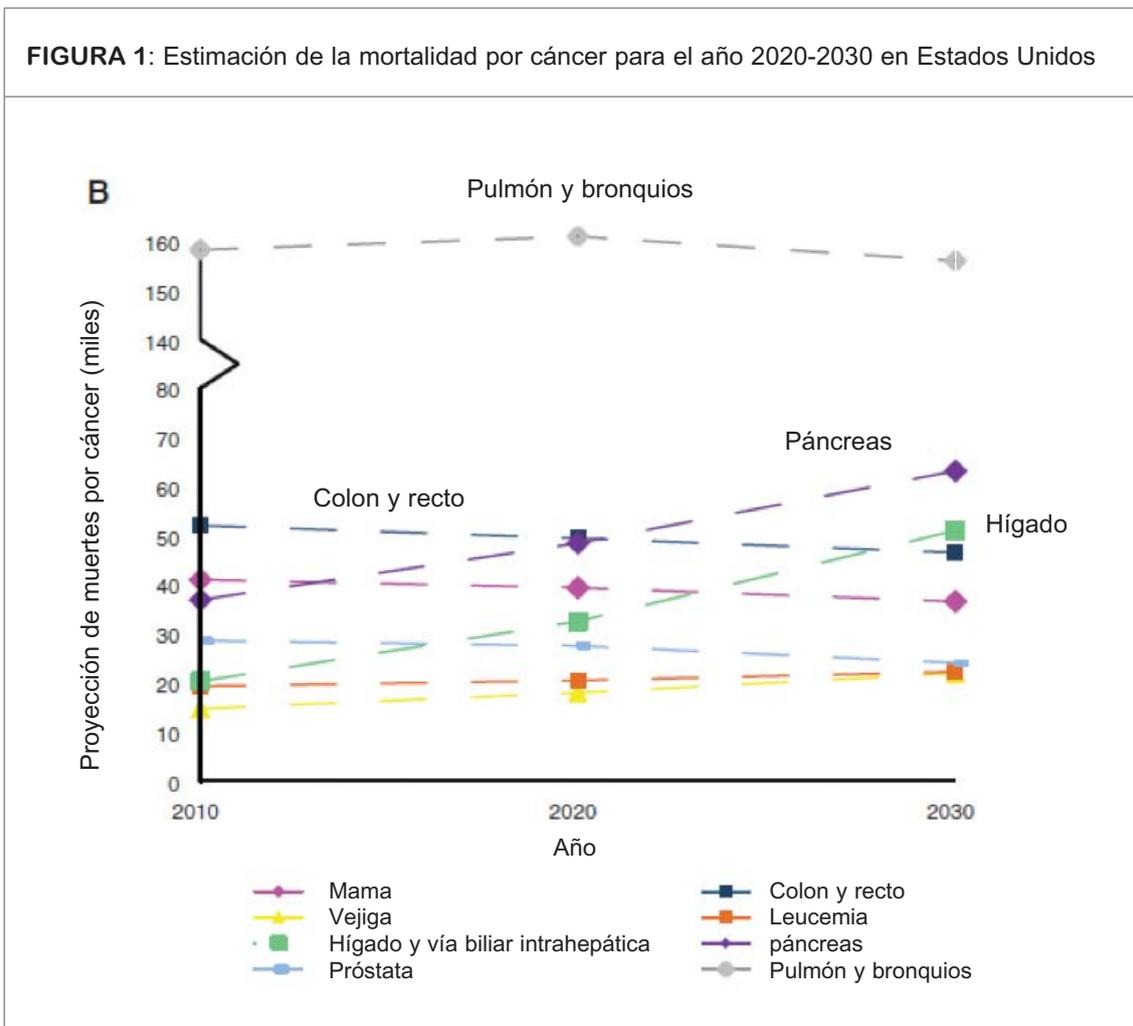
El cáncer de páncreas representa un problema de salud importante a nivel mundial. A pesar de su moderada incidencia, presenta una alta mortalidad, siendo la sexta causa de muerte por cáncer en Europa, y la cuarta en Estados Unidos (1, 2). En Europa se diagnosticaron en el año 2012 103.800 nuevos casos de cáncer de páncreas, y 100.500 personas murieron por esta enfermedad en el mismo año (1).

La tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes diagnosticados de un cáncer de páncreas es menor del 5% (3). Las causas de estas cifras tan desalentadoras son múltiples, destacando, en primer lugar, el hecho de que la enfermedad es asintomática en las fases iniciales y curables, y por ello solo un 20% de los pacientes se diagnosticarán en estadios potencialmente quirúrgicos. Así mismo, esta enfermedad no dispone de programas de cribado que permitan el diagnóstico en fases tempranas. La tercera causa sería la agresividad del tumor y la rapidez en metastatizar hacia los órganos vecinos, y finalmente la falta de tratamientos sistémicos oncológicamente activos.

Las estadísticas demuestran que un 15-20% de los pacientes con un cáncer de páncreas se diagnosticarán en forma de estadios localizados con una supervivencia media de 20-22 meses. Un 30% se diagnosticará cuando la enfermedad se considera localmente avanzada, y como tal irreseccable quirúrgicamente pero sin metástasis aparentes. La supervivencia media en este grupo se estima en 10-12 meses. Un 50-55% de la población se diagnosticará en forma de enfermedad metastásica, siendo la supervivencia media de 6-8 meses a pesar del tratamiento con quimioterapia (4).

Desafortunadamente, las previsiones para el año 2020-2030 son desalentadoras para el cáncer de páncreas. Según un artículo publicado en la revista *Cancer Research* por Rahib *et al*, la previsión en la próxima década en Estados Unidos es que el cáncer de páncreas sea la segunda causa de muerte por cáncer, por delante de tumores con una alta prevalencia como el cáncer de mama, de pró-

tata o de colon (Figura 1)(5). Las causas de dicho aumento son básicamente tres: la falta de programas de cribado poblacional que permitan detectar las lesiones pre-malignas o el tumor en estadios tempranos y por tanto candidato a ser resecado, la falta de conocimiento de los agentes causales que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad, y la falta de tratamientos oncológicamente activos. Frente a la alarma de dichas previsiones los autores apuntan a la necesidad de invertir en la investigación para la detección precoz de esta enfermedad, y en el profundizar en el conocimiento de la biología de este tumor, con el objetivo de encontrar nuevas terapias moleculares que puedan ser testadas en estudios clínicos y mejorar así las armas con las que luchar con esta enfermedad.



Con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos en el tratamiento oncológico del cáncer de páncreas, en los últimos años muchos han sido los esfuerzos para mejorar el diseño de estudios clínicos en esta enfermedad (6, 7).

2. Generalidades del cáncer de páncreas

2.1. Etiología del cáncer de páncreas

Las causas del cáncer de páncreas permanecen desconocidas. Muchos factores ambientales se han relacionado con el desarrollo de esta enfermedad, sin embargo factores que hayan demostrado su efecto causal claro son pocos.

La edad es un factor de riesgo para el cáncer de páncreas, raramente se diagnostica esta enfermedad por debajo de los 40 años, y la edad media de presentación está en los 71 años.

El nivel socioeconómico del país también es un factor de riesgo, dado que es un tumor con mayor incidencia en países desarrollados.

El tabaco ha demostrado ser un factor etiológico en el cáncer de páncreas, aquellos pacientes con antecedentes tabáquicos presentan entre 2,5 y 3,6 veces más de riesgo para desarrollar un cáncer de páncreas. El riesgo aumenta con la intensidad del hábito y los años de exposición (8). Los datos son limitados acerca de otros factores como la ingestión de alcohol o de café (9).

Algunos estudios han identificado como posible etiología del cáncer de páncreas la diabetes mellitus de larga evolución y la pancreatitis crónica (10, 11).

Los pacientes con una pancreatitis crónica pueden tener un riesgo aumentado de cáncer de páncreas hasta de 27 veces superior a la población general. Las causas de pancreatitis crónica suelen ser genéticas y/o ambientales. EL 70% de las pancreatitis crónicas son causadas por el alcohol, un 10% son de causa obstructiva, o genética, y en el resto no se identifica un agente causal. En caso de pancreatitis hereditaria el riesgo de padecer cáncer de páncreas puede llegar a ser de 53 veces superior a la población general. En la pancreatitis crónica se ha encontrado mutación de *KRAS* en aproximadamente un 30% de los casos y también es común encontrar alteraciones en la vía de Hedgehog. Estas dos alteraciones moleculares son muy frecuentes en el adenocarcinoma de páncreas como se describirá más adelante. En la pancreatitis crónica también se ha encontrado parte de componente de estroma con características similares al tumor invasivo.

De forma menos concluyente algunos estudios han relacionado la cirrosis, la dieta rica en grasas, y el antecedente de colecistectomía como posibles factores causantes de esta enfermedad (12).

Se estima que entre un 5 y un 10% de los pacientes afectados de un cáncer de páncreas tienen historia familiar de esta enfermedad. Algunas veces estas familias desarrollan un cáncer de páncreas formando parte de síndromes bien definidos, como sería el caso de la melanosis familiar con mutación en el gen *p16/CDKN2A*, la pancreatitis familiar con alteración en el gen *PRSS1*, el síndrome de Peutz-Jeghers con alteración en *STK11*, o el síndrome de Von Hippel-Lindau con alteración en el gen *VHL*. Otras veces forman parte de familias con antecedentes de cáncer de páncreas, donde se sospecha una causa genética más que ambiental en la formación del tumor, pero sin poderse identificar una causa genética conocida (13).

En ocasiones la causa del cáncer de páncreas es una alteración germinal en la familia de los genes reparadores del DNA. Los portadores de mutaciones en *BRCA2* tienen entre 3,5 y 7 veces más de riesgo de desarrollar cáncer de páncreas que la población sana. Los portadores de mutaciones en *BRCA1* tienen un aumento estimado del riesgo de 2,2 veces (14-16). Alrededor de un 5% de los pacientes con cáncer de páncreas van a presentar mutaciones en dichos genes. Es importante invertir esfuerzos en identificar a esta población, dado que tiene implicaciones terapéuticas, aparte de preventivas para el resto de la familia. Según series publicadas estos serían pacientes especialmente sensibles a tratamiento con quimioterapia basada en platinos y posiblemente candidatos a ser tratados con inhibidores de PARP (también llamados inhibidores de la poli ADP-ribosa polimerasa) dentro de estudios clínicos (17, 18). Este tema se desarrollará más adelante en otro apartado.

En el momento actual la dificultad está en poder identificar a estos pacientes, la comunidad científica desconocemos los signos que deben hacernos pensar en esta población. En una publicación reciente de un grupo canadiense se intentó determinar de forma prospectiva la prevalencia de las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con cáncer de páncreas, así como describir las características clínicas y familiares de estos pacientes (19). La mayoría de series retrospectivas publicadas hasta este artículo incluían solo *BRCA2* y pocos pacientes (entre 26-151) (20-23). Los datos de la prevalencia de mutación en *BRCA1* y cáncer de páncreas eran escasos.

De forma no seleccionada 306 pacientes fueron elegidos para el estudio en un solo centro canadiense durante un periodo de 2 años. Se detectaron 14 pacientes con mutaciones germinales del *BRCA* (4.6%), incluyendo 11 pacientes (3.6%) con *BRCA2* mutado y 3 pacientes (1%) con *BRCA1* mutado. La mayoría de pacientes con mutación identificada no tenían una historia familiar que hiciera sospechar una mutación en *BRCA*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad al diagnóstico, sexo, historia de tabaquismo, y estadiaje al diagnóstico entre los pacientes con *BRCA* mutados y los que no. Los autores concluyen que una vez disminuya el precio de la determinación del gen

de *BRCA* se podrá plantear realizar el test en todo paciente diagnosticado de un cáncer de páncreas. Pero en el momento actual los autores recomiendan remitir al paciente a una Unidad de Consejo genético en toda la población Ashkenazi con un cáncer de páncreas, y en los pacientes con uno o más antecedentes en la familia (primer o segundo grado) de cáncer de mama o ovario. Idealmente dicha determinación se debería realizar en el momento del diagnóstico.

La población judía Ashkenazi tiene descrita una mayor prevalencia de mutaciones en *BRCA* (entre un 1.7% y un 10%) (24-26). En la población del estudio canadiense, 4 de 33 pacientes judíos Ashkenazis presentaron una mutación en *BRCA* (12.1%). En una población previa que reportaba la experiencia en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, de 145 judíos Ashkenazis con un cáncer de páncreas, un 5.5% presentaban mutaciones fundadoras de *BRCA* (1.3% en *BRCA1* y 4.1% en *BRCA2*). No detectaron diferencias en la edad, o características clínicas. No obstante, un 24% habían padecido un cáncer previo, siendo el más frecuente el cáncer de mama (74%) y el de próstata (23%)(26).

2.2. Presentación clínica, diagnóstico y estadiaje del cáncer de páncreas

2.2.1. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La presentación clínica del cáncer de páncreas va a depender de la localización del tumor en la glándula y del estadio tumoral en el momento del diagnóstico. La mayoría de los tumores se van a desarrollar en la cabeza de la glándula (alrededor del 60% de los casos), siendo el síntoma más frecuente de presentación la ictericia obstructiva.

Otros síntomas frecuentes pero poco específicos pueden ser dolor abdominal alto, plenitud postprandial, y náuseas.

Más raramente se puede diagnosticar a partir de una obstrucción duodenal causada por el tumor o a partir de un sangrado digestivo alto.

En casos de estadios avanzados, el síntoma al diagnóstico puede ser un síndrome tóxico con astenia, anorexia y pérdida de peso.

El cáncer de páncreas debe figurar entre los diagnósticos diferenciales de la pancreatitis aguda y la diabetes mellitus de debut (4).

2.2.2. DIAGNÓSTICO

Ante la sospecha clínica de un cáncer de páncreas deberemos realizar las siguientes exploraciones:

Exploración física: Generalmente va a resultar inespecífica. En casos de enfermedad avanzada destacará la caquecisia, posible hepatomegalia, ictericia y distensión abdominal con posibilidad de ascitis.

Análisis de sangre: Los resultados analíticos son generalmente inespecíficos. Puede destacar un patrón de colestasis, hiperglicemia y anemia como rasgos más frecuentes (3).

Marcador tumoral (CA 19.9): Es el único marcador que tiene utilidad en el cáncer de páncreas. Tiene una sensibilidad del 79-21% y una especificidad del 82-90% para diagnosticar un cáncer de páncreas en un paciente asintomático (27). En aquellos casos en que está elevado al diagnóstico puede ser de utilidad para monitorizar la enfermedad (un descenso del 25-30% está relacionado con una respuesta al tratamiento de quimioterapia). También puede ser útil como marcador precoz de recidiva de la enfermedad tras una cirugía radical (28). Se ha descrito en la literatura una correlación entre los niveles de CA 19.9 y la extensión de la enfermedad (29).

El papel del marcador CA 19.9 como valor pronóstico y por tanto posible valor de estratificación de los pacientes ha sido largamente estudiado a lo largo de la literatura (27). Claramente se puede concluir que los pacientes con negativización del marcador CA 19.9 tras la cirugía tienen mejor supervivencia que aquellos que no consiguen negativizar el mismo (30).

No obstante, el marcador CA 19.9 tiene algunas limitaciones. En primer lugar, se puede elevar en otras condiciones que no son el cáncer de páncreas, como por ejemplo en caso de la colestasis. En segundo lugar, aproximadamente un 10% de los cánceres de páncreas no elevan el marcador CA 19.9 a pesar de estar en estadios avanzados. Y finalmente es un marcador con una baja sensibilidad.

No se debe utilizar este marcador en la población general si no hay una sospecha clara de cáncer de páncreas (4) dada su baja sensibilidad, su bajo poder predictivo, y la baja prevalencia del cáncer de páncreas en la población general. Su papel como cribado poblacional no ha sido demostrado.

TAC abdominal con contraste endovenoso: Es la exploración radiológica de elección frente a la sospecha de un cáncer de páncreas (31). Nos va a permitir establecer el diagnóstico, la reseccabilidad del tumor y la extensión a otros órganos en caso de que sea metastásico. La exploración puede predecir la reseccabilidad del tumor en un 80-90% de los casos (32). Idealmente debería ser un TAC con cortes milimétricos axiales, con reconstrucción multiplanar para valorar de forma adecuada la relación del tumor y la vasculatura mesentérica, así como la enfermedad metastásica a distancia. Es aconsejable completar el estudio abdominal, con el torácico y el pélvico (33).

RMN abdominal: La RMN con contraste es equivalente al TAC en el diagnóstico y estudio de un cáncer de páncreas, con las limitaciones de coste y acceso. Se suele indicar para completar y caracterizar lesiones hepáticas inespecíficas o cuando se sospecha una tumoración pancreática, no claramente visualizada en el TAC (34).

Ecoendoscopia: Es la exploración de elección para la obtención de tejido tumoral. En los casos en que el paciente será sometido a una cirugía como tratamiento inicial, está discutido en las guías la necesidad de obtener tejido tumoral, no obstante en aquellos pacientes en que el primer tratamiento va a ser la quimioterapia es obligado el disponer de un diagnóstico anatomopatológico (35, 36). La exploración también puede ser de utilidad en aquellos casos en que se sospecha un cáncer de páncreas pero no se visualiza una masa pancreática en el TAC abdominal.

Colangiopancreatectomía retrógrada endoscópica (ERCP): La exploración va a tener especial utilidad en aquellos pacientes afectados de una obstrucción de la vía biliar secundaria a la compresión tumoral, existiendo la posibilidad de colocar una prótesis biliar mediante esta técnica (37).

PET/TAC: El papel del PET/TAC en el estudio del paciente diagnosticado de un adenocarcinoma de páncreas candidato a cirugía o tras cirugía no está definido.

La sensibilidad y especificidad del PET/TAC en el diagnóstico del tumor primario son de un 89% y 88% respectivamente. El PET/TAC es más sensible en el diagnóstico del tumor primario que la RMN (38). Se ha demostrado mucho más sensible en la detección de metástasis a distancia que el TAC o la RMN. El PET/TAC, a su vez, supera la sensibilidad de la PET convencional en la detección de metástasis e incluso del tumor primario. Se debería considerar su realización en pacientes con alto riesgo o con sospecha de recaída local o a distancia, no objetivada en el TAC.

No existe en el momento actual un programa de cribado del cáncer de páncreas dadas las herramientas disponibles y su rendimiento en el diagnóstico de esta enfermedad en estadios pre-malignos (39).

2.2.3 ESTADIFICACIÓN

El cáncer de páncreas se clasifica según la clasificación americana de la AJCC (40) basada en el TNM, y será en la mayoría de casos el TAC abdominal con contraste el que permitirá establecer el diagnóstico y la reseabilidad del tumor. T1, T2, T3 son tumores potencialmente reseables, mientras que T4 es un tumor irresecable por afectación de la arteria mesentérica superior o el tronco celíaco (Tabla 1). Los tumores que invaden la vena mesentérica superior, la vena porta o los vasos esplénicos, se consideran T3, dado que existe la posibilidad de resección y reconstrucción en los casos en que sea necesario (4).

TABLA 1: Estadificación del cáncer de páncreas: TNM

Estadificación	Tumor	Ganglios	Metástasis	Supervivencia (meses)(41)	Características
IA	T1	N0	M0	24.1	Tumor limitado al páncreas, ≤2 cm
IB	T2	N0	M0	20.6	Tumor limitado al páncreas, >2 cm
IIA	T3	N0	M0	15.4	Tumor extendido más allá del páncreas, no afecta AMS, TC
IIB	T1-3	N1	M0	12.7	Metástasis a ganglios regionales
III	T4	N0 o N1	M0	10.6	El tumor afecta a AMS o TC
IV	T1-4	N0-1	M1	4.5	Metástasis a distancia

AMS: arteria mesentérica superior, TC: tronco celíaco.

En la práctica clínica y para la toma de decisiones, los tumores de páncreas también se clasifican como localizados y reseables, *borderline* o potencialmente reseables, localmente avanzados y metastásicos.

3. Biología del cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas se origina a partir de la acumulación de mutaciones genéticas (42).

Las características más relevantes del cáncer de páncreas son su alto porcentaje de mutaciones en el gen *KRAS* (descrito hasta en más del 90% de los casos), la progresión a partir de lesiones pre-malignas bien establecidas, la capacidad de invasión local y a distancia, la alta carga estromal que da lugar a un ambiente hipovasculare e hipóxico, una reprogramación del metabolismo celular y la capacidad para evadir al sistema inmune del huésped (43).

3.1. Lesiones pre-malignas

Las lesiones pre-malignas para el cáncer de páncreas cumplen los cinco criterios obligados para ser definidas como lesiones pre-malignas (44):

- La lesión pre-maligna debe aumentar el riesgo de padecer un cáncer de páncreas.
- Cuando la lesión pre-maligna progresa a cáncer, éste se origina a partir de las células de la lesión pre-maligna.
- La lesión pre-maligna debe diferir del tejido sano del cual procede.
- La lesión pre-maligna difiere de la lesión cancerígena en la invasión del parénquima sano vecino.
- La lesión pre-maligna debe disponer de un método diagnóstico.

Existen tres lesiones pre-malignas bien establecidas y caracterizadas en el cáncer de páncreas:

Neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN):

La lesión que recibe el nombre de neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) es reconocida como la lesión microscópica que se origina a partir del epitelio de los ductos pancreáticos de pequeño calibre (menos de 5 mm de diámetro) y que con mayor frecuencia da lugar a la aparición de la lesión invasora. Existen tres tipos de lesiones PanIN según el grado de atipia celular que contienen: son conocidos como el tipo 1, 2, y 3 (45). La lesión PanIN 1 se caracteriza por contener una diferenciación mucinosa de las células ductales, con mínima atipia. Sin embargo, la lesión PanIN 2 contiene moderada atipia y la lesión PanIN 3 corresponde a un carcinoma *in situ*.

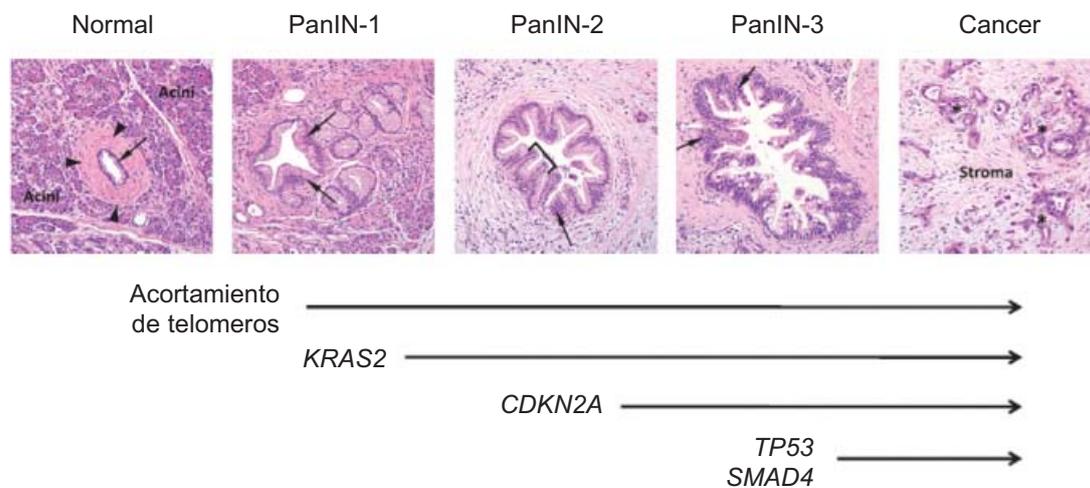
No está claro el riesgo de malignización de estas lesiones pre-malignas.

Estas diferentes lesiones van asociadas a un acumulo de mutaciones genéticas que son superponibles a las que encontraremos en el adenocarcinoma de páncreas (figura 2).

Más de un 90% de casos de PanIN presentan mutación en *KRAS*, de forma independiente al grado, encontrándose ya en PanIN 1 (46). La inactivación de los genes supresores *CDKN2A*, *TP53*, y *SMAD4* son detectados con una frecuencia creciente en el subtipo de PanIN 2 y 3 (47).

Podríamos caracterizar los eventos mutacionales en precoces (anormalidades en la longitud de los telómeros, y activación del gen *KRAS*), intermedios (inactivación de *CDKN2A*), y eventos tardíos (inactivación de *TP53*, y *SMAD4*). Más allá de estas mutaciones, estas lesiones se caracterizan por tener una gran variedad de alteraciones cromosomales en forma de amplificaciones, deleciones o reordenamientos.

FIGURA 2: Modelo de progresión morfológica y genética en la formación del adenocarcinoma de páncreas a partir de las lesiones pre-malignas PanIN



Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMNs):

Los IPMNs son lesiones pre-malignas caracterizadas por ser lesiones císticas macroscópicamente visibles que se originan en los principales ductos productores de mucina o en las ramas del mismo. Las lesiones originadas de los ductos principales tienen mayor grado de displasia y se asocian con mayor frecuencia a carcinoma invasivo que los IPMNs originados de las ramas de los mismos. Son lesiones relativamente frecuentes en la población general, con una incidencia del 2% de la población adulta y del 10% en la población mayor de 70 años. Presentan una gran variedad clínica e histológica. Está descrito un riesgo de malignización hacia adenocarcinoma de páncreas del 30%.

Las neoplasias de páncreas originadas a partir de una lesión quística, siendo la más frecuente IPMNs, tienen mejor pronóstico que las lesiones invasivas que no se asocian a dichas lesiones, estando descrita una supervivencia a 5 años del 45 % en esta población (48).

El perfil mutacional de las lesiones IPMNs difiere ligeramente del adenocarcinoma de páncreas no originado sobre un IPMNs. Se han descrito alrededor de un 40-65% de mutaciones de *KRAS* en estas lesiones pre-malignas. *SMAD4* está raramente mutado en esta lesión. Sin embargo, el gen *LKB* está inactivado en un 25% de los IPMNs. El gen *PIK3CA* está mutado en un 10% de los IPMNs. Se han descrito entre 40-80% de mutaciones en *GNAS* y más del 50% de mutaciones en *RNF43* (43).

Se ha publicado un análisis de 169 genes en lesiones quísticas tipo IPMNs, encontrándose 66% de mutaciones en *GNAS*, más del 96% de mutaciones en *KRAS* o *GNAS*, y más de la mitad con ambas mutaciones. En esta serie, 7 de 8 casos de adenocarcinoma invasivo presentaba mutación en *GNAS*. No obstante, aquellas lesiones quísticas que no eran IPMNs o aquellos adenocarcinomas no originados a partir de IPMNs no presentaban mutación de *GNAS*. Con ello, los autores dan soporte a la hipótesis de que los adenocarcinomas de páncreas originados sobre un IPMN podrían tener un perfil mutacional y clínico distinto a los que no se originan a partir de dicha lesión pre-maligna (49).

El tratamiento de los IPMNs mayores de 3 centímetros, con engrosamientos murales o que tengan asociada una dilatación del ducto principal pancreático es la cirugía, sin embargo, cuando no existen estas condiciones la actitud terapéutica queda menos clara. En caso de resección quirúrgica se debe llevar a cabo un seguimiento estrecho de estas lesiones, dado que existe la posibilidad de que las lesiones sean multicéntricas.

Cistoadenoma mucinoso (MCNs):

Son las lesiones pre-malignas menos frecuentes, macroscópicamente visibles y de características quísticas. No se comunican con el sistema de conductos pancreáticos. Están formados por epitelio columnar productor de mucina con distintos grados de displasia.

Los MCNs tienen menos capacidad de progresar a carcinoma invasivo que los IPMNs, solo un 10% de los MCNs reseccionados tienen componente invasivo (50).

Se ha propuesto un modelo de progresión similar a las lesiones PanIN pero menos bien caracterizado. La mutación de *KRAS* se ha definido como un evento temprano en el desarrollo del MCNs, mientras que mutaciones en el gen de *TP53* y *SMAD4* son eventos tardíos. Metilaciones aberrantes del gen *p16/CDKN2A* son muy poco frecuentes en esta lesión.

El tratamiento de las lesiones tipo MCNs será la resección completa.

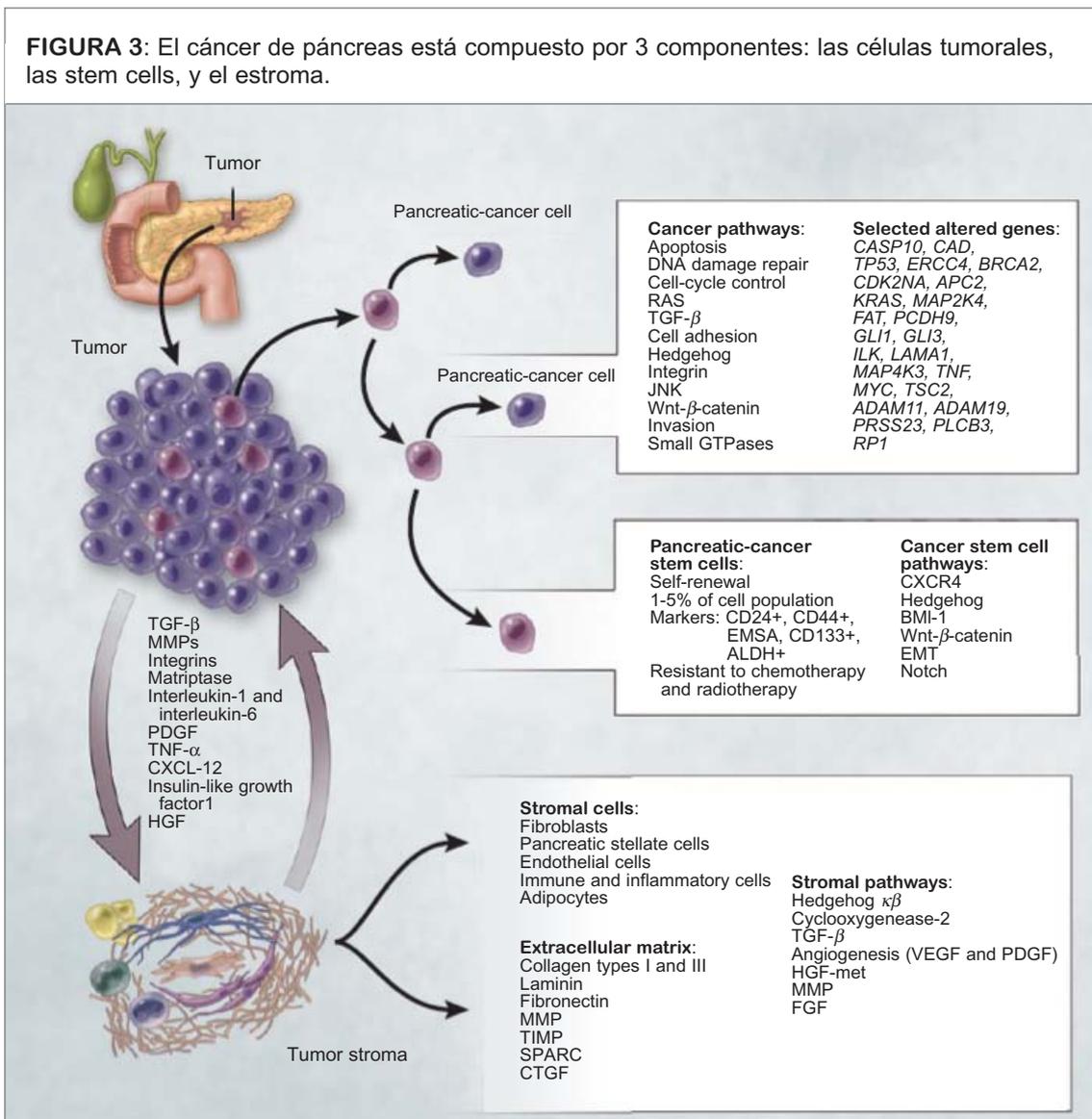
La resección de dicha lesión sin componente invasivo comporta una supervivencia del 100% a los 5 años. No obstante, cuando ya presenta componente invasivo la supervivencia está alrededor del 50%-60% a los 5 años.

3.2. Biología molecular del adenocarcinoma de páncreas

Prácticamente la totalidad de los pacientes con un adenocarcinoma de páncreas bien establecido van a presentar al menos una de las cuatro mutaciones genéticas más frecuentes descritas en este tumor: *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, y *SMAD4* (4).

Estas alteraciones van acompañadas de un compendio de alteraciones genéticas que dan lugar a la alteración del ciclo celular, aumento de la supervivencia celular, la invasión y la metástasis.

El cáncer de páncreas está básicamente formado por tres componentes: Las células tumorales, las *stem cells* o células madre, y un importante componente estromal (figura 3).



3.2.1 LAS CÉLULAS TUMORALES

3.2.1.1 Alteraciones genéticas

KRAS:

La mutación en *KRAS* es la alteración genética más frecuente en el cáncer de páncreas, estando presente en más del 90% de los casos (51). *KRAS* codifica a una proteína de la familia de *RAS* (guanosa trifosfato -GTP-binding protein) que estará constitutivamente activada en caso de mutación del gen. Dicha activación será independiente de las señales extra o intracelulares (52). La activación de esta proteína implica una estimulación de toda la vía de la familia de *RAS* que está implicada en procesos básicos del cáncer como la proliferación y la supervivencia celular.

A parte de su efecto en la iniciación del cáncer de páncreas, la activación de *KRAS* sería requerida para el mantenimiento del tumor (53), y se considera uno de los eventos críticos para el desarrollo del mismo (51).

La mutación del gen *KRAS* es uno de los eventos más precoces en el desarrollo del cáncer de páncreas (54). Es un evento ya presente en las lesiones pre-malignas PanIN 1 (44).

En un artículo publicado por el equipo de Mariano Barbacid (55), se demostró en modelos pre-clínicos que la activación del EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) es esencial para la formación de las lesiones pre-malignas PanIN y para el posterior desarrollo del adenocarcinoma en presencia de mutación del gen *KRAS*. Los autores también demuestran en este trabajo que los tumores con mutación en *KRAS* y pérdida de p53 son independientes de la activación de EGFR para el desarrollo de lesiones pre-malignas y del tumor invasivo.

Previamente Hingorani había publicado un trabajo con modelos murinos donde se demostraba la cooperación entre la mutación de *KRAS* y *TP53* para promover la inestabilidad cromosómica en el adenocarcinoma de páncreas (56), concluyendo que los tumores con mutación en *KRAS* y pérdida de p53 tendrían un peor pronóstico.

La mutación más frecuentemente descrita de *KRAS* es la situada en el codón 12, constituyendo el 98% de las mutaciones de *KRAS* en cáncer de páncreas (57). La mutación más frecuente es pG12D (GAT GCC).

La activación de *KRAS* conlleva la estimulación de varias vías efectoras, fundamentalmente la vía de ERK/MAPK (*mitogen activated protein kinase*) mediada por Ras/Raf/MEK/ERK, y la vía de PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), mediada por PI3K/PTEN/Akt/mTOR/GSK-3.

La mutación en *PI3K* se ha reportado en cáncer de páncreas en una baja frecuencia, al igual que la pérdida de PTEN.

A pesar de tener datos pre-clínicos favorables a los tratamientos con inhibidores de mTOR en cáncer de páncreas, se han publicado dos estudios fase II que han

fallado en demostrar la eficacia de los inhibidores de mTOR en este tumor (58, 59). Sin embargo, se ha reportado una respuesta parcial de un paciente afecto de un cáncer de páncreas con un Síndrome de Peutz-Jeghers tratado con un inhibidor de mTOR (60), portador de mutación en *STK11/LKB1* (codifica una proteína que inhibe mTOR). Los pacientes con mayores probabilidades de responder a un inhibidor de mTOR serían los pacientes con síndrome de Peutz-Jeghers, con mutación en *PIK3CA*, pérdida de PTEN o mutaciones activadores de mTOR.

Todos los intentos realizados hasta la actualidad para bloquear la señalización de Ras en cáncer de páncreas han sido infructuosos.

p16/CDKN2A:

El gen supresor p16, también llamado *CDKN2A* o *INK4A*, se encuentra inactivado en un 90% de los adenocarcinomas de páncreas (61).

Dicho gen está localizado en el cromosoma 9p21 y codifica una proteína de 16KDa que actúa como inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4/6. Con la unión de p16 a CDK4 o CDK6 se impide la interacción de las mismas con la ciclina D1, y con ello se regula negativamente la progresión del ciclo celular bloqueando el paso de la fase G1 a la fase S (62). En consecuencia, la pérdida de la proteína p16 implica un aumento de la proliferación celular.

La inactivación genética de p16 está presente en una fase un poco más tardía de la carcinogénesis del cáncer de páncreas, concretamente a partir de PanIN 2 (44).

Los mecanismos descritos mediante los cuales se silencia el gen son varios: deleción (40%), mutación (40%) o metilación (10-15%) (63).

TP53:

La inactivación del gen supresor *TP53* está presente en un 50-75% de los cánceres de páncreas (44). El gen está localizado en el cromosoma 17p.

El mecanismo mediante el cual se inactiva es la presencia de una mutación del gen en combinación con la pérdida del segundo alelo (64).

La proteína p53 tiene importantes funciones en la célula; la regulación del ciclo celular mediante el control del paso de G1 a S, el mantenimiento de la fase del ciclo celular en G2-M, y la inducción de la apoptosis en situación de stress de la célula (65).

Frente a la pérdida de p53 la célula puede sobrevivir y dividirse a pesar del daño en el DNA, dando lugar a un acumulo de anomalías genéticas y por lo tanto a la inestabilidad genética.

La mutación del gen TP53 ya está presente en las lesiones pre-malignas PanIN 3 (44).

Algunos trabajos apuntan a que los adenocarcinomas de páncreas con pérdida de p53 tendrían un peor pronóstico que los que tienen la función mantenida del gen (66).

SMAD4:

El gen llamado *SMAD4* o *DPC4* está inactivado en un 55% de los tumores de páncreas. Los mecanismos de inactivación descritos son dos: delección homocigota (30%) o mutación intragénica con pérdida del segundo alelo (25%) (67). El gen está localizado en el cromosoma 18q21.

La proteína Smad4 es crítica en la vía de TGF-beta, una vía que se encuentra alterada en los tres compartimentos del cáncer de páncreas: las células tumorales, el estroma y las células madre (68). La función principal de la vía de TGF-beta es inhibir la proliferación celular, provocando un arresto del ciclo celular en G1 (69).

La activación de la vía del TGF-beta sucede cuando los ligandos se unen a los receptores celulares, activando así la cascada intracelular que llevará a la fosforilización de los factores de transcripción de Smad, Smad 2/3, los cuales se unirán a Smad4 para ir al núcleo a estimular el proceso de transcripción. La pérdida de función de Smad4 en el cáncer de páncreas implica una disregulación de la vía del TGF-beta, y ello conlleva a la promoción del crecimiento tumoral, la invasión, la evasión del sistema inmune, la diseminación celular y la formación de metástasis (70).

La inactivación de *SMAD4* se ha correlacionado en distintos trabajos con la supervivencia de los pacientes con un cáncer de páncreas resecaado y con la capacidad de metastatización del mismo. Tascilar publicó en el año 2001 el valor pronóstico de la pérdida de Smad4 en 249 neoplasias de páncreas resecaadas (71). Los pacientes con pérdida de Smad4 presentaban una supervivencia más corta que aquellos con expresión de Smad4, y las diferencias fueron estadísticamente significativas (19.2 meses *versus* 14.7 meses, $p=0.03$).

Blackford publicó años más tarde el estado mutacional de distintos genes en 89 pacientes con una neoplasia de páncreas resecaada. Únicamente la mutación de *SMAD4* se correlacionó con una peor supervivencia (11.5 meses *versus* 14.2 meses, $p=0.006$). Los datos fueron ajustados por otros factores pronósticos (72).

En el mismo año se publicó la experiencia del grupo liderado por Lacobuzio-Donahue, los cuales realizaron autopsias a pacientes afectados de un cáncer de páncreas, y correlacionaron el patrón de diseminación local o metastásico en función del estado mutacional de *SMAD4* (73).

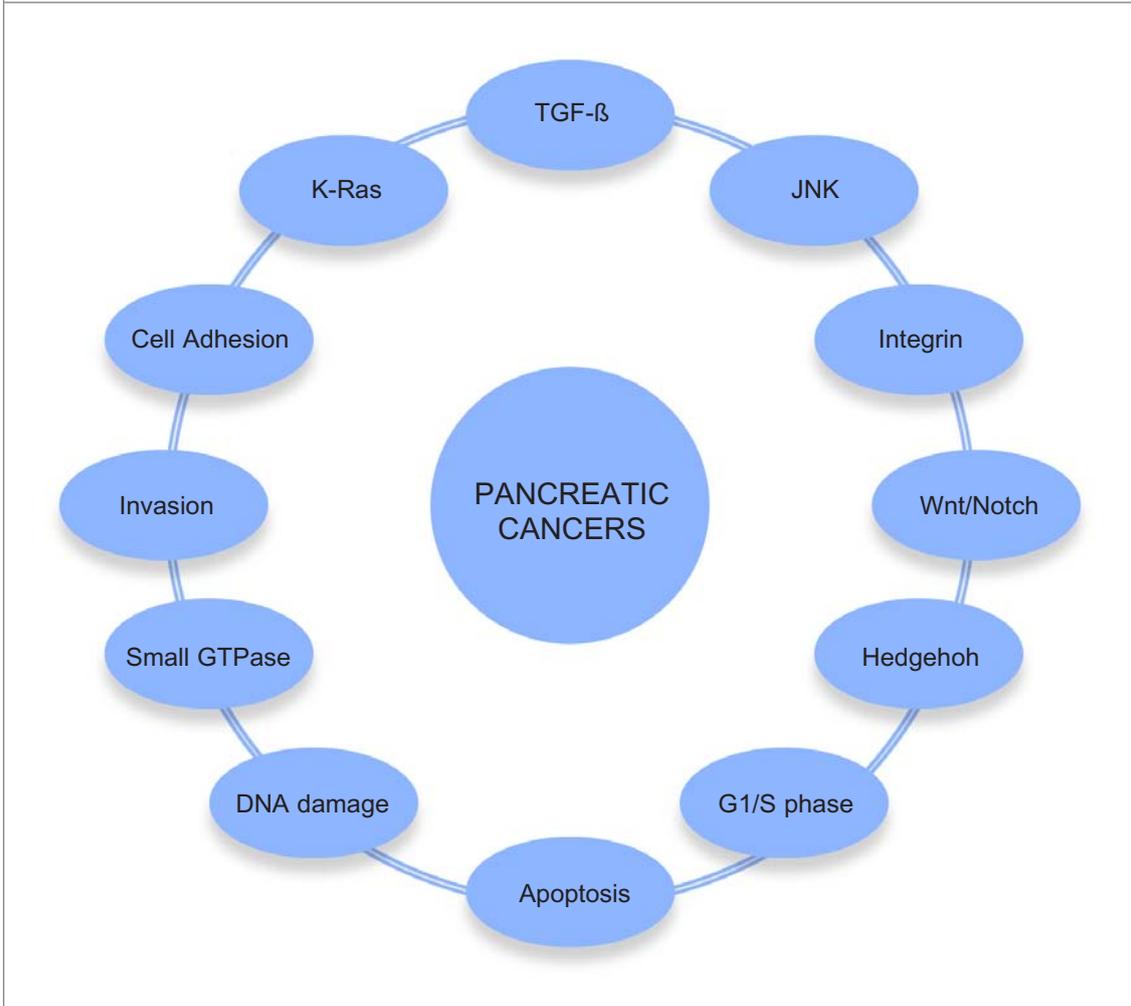
Los autores de estos trabajos apuntan a la importancia de poder disponer de un factor pronóstico como la expresión de Smad4 en la toma de decisiones terapéuticas en los pacientes afectados de un cáncer de páncreas potencialmente resecaable. No obstante, Smad4 no se ha validado prospectivamente como factor pronóstico hasta el momento actual.

La inactivación por mutación de *SMAD4* está presente en las lesiones PanIN3 (44).

3.2.1.2-Vías básicas de señalización en el cáncer de páncreas

Un análisis genético integral de 24 tumores de páncreas apuntó que dicha enfermedad es genéticamente compleja y heterogénea. En este estudio se describieron una media de 63 anomalías genéticas por tumor. Estas alteraciones genéticas fueron organizadas por los autores en 12 vías o procesos, los cuales se encuentran genéticamente alterados en la mayoría de los adenocarcinomas de páncreas (figura 4).

FIGURA 4: Vías básicas de señalización en el cáncer de páncreas



Estas vías presentan alteraciones en distintos genes. Algunas de ellas presentan un gen predominante y mutado con alta frecuencia (por ejemplo el *KRAS*), otras vías presentan pocos genes alterados (por ejemplo la vía del TGF-beta) y otras vías tienen muchos genes alterados (por ejemplo la vía de la invasión o de las integrinas) (tabla 2) (74). Con ello simplificamos a 12 vías la clave para entender la biología del cáncer de páncreas.

TABLA 2: Vías de señalización y procesos genéticamente alterados en la mayoría de los adenocarcinomas de páncreas.

Vía de señalización	Número de genes alterados	Fracción de tumores con al menos una alteración genética	Genes alterados representativos
Apoptosis	9	100%	<i>CASP10, VCP, CAD, HIP1</i>
Control daño DNA	9	83%	<i>ERCC4, ERCC6, EP300, RANBP2, TP53</i>
Regulación G1/S	19	100%	<i>CDKN2A, FBXW7, CHD1, APC2</i>
Hedgehog	19	100%	<i>TBX5, SOX3, LRP2, GLI1, GLI3, BOC, BMPR2, CREBBP</i>
Adhesión celular	30	79%	<i>CDH1, CDH10, CDH2, CDH7, FAT, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH9, PCDHB16, PCDHB2, PCDHGA1, PCDHGA11, PCDHGC4</i>
Integrinas	24	67%	<i>ITGA4, ITGA9, ITGA11, LAMA1, LAMA4, LAMA5, FN1, ILK</i>
JNK	9	96%	<i>MAP4K3, TNF, ATF2, NFATC3</i>
<i>KRAS</i>	5	100%	<i>KRAS, MAP2K4, RASGRP3</i>
Regulación invasión	46	92%	<i>ADAM11, ADAM12, ADAM19, ADAM5220, ADAMTS15, DPP6, MEP1A, PCSK6, APG4A, PRSS23</i>
Señal dependiente de GTPasa	33	79%	<i>AGHGEF7, ARHGEF9, CDC42BPA, DEPDC2, PLCB3, PLCB4, RP1, PLXNB1, PRKCG</i>
TGF-beta	37	100%	<i>TGFBR2, BMPR2, SMAD4, SMAD3</i>
Wnt/Notch	29	100%	<i>MYC, PPP2R3A, WNT9A, MAP2, TSC2, GATA6, TCF4</i>

Sin embargo, no todos los tumores de páncreas presentan alteraciones en todas las vías, y las mutaciones clave de cada vía difieren de un tumor a otro.

Utilizar terapéuticamente una o más de estas vías parece la mejor aproximación terapéutica en el cáncer de páncreas, más que usar como diana terapéutica a genes específicos que se encuentren alterados (75).

3.2.1.3-Clasificación molecular del cáncer de páncreas

Siguiendo el ejemplo de otros tumores como el tumor de colon (76) o el de mama (77), en los que se ha demostrado que la heterogeneidad en las respuestas a fármacos oncológicos puede ser debida a las diferencias moleculares entre los distintos tumores, en los últimos años en el cáncer de páncreas empiezan a aparecer clasificaciones moleculares que diferencian grupos molecularmente distintos con las implicaciones terapéuticas que conlleva.

Nuevamente, aprendiendo de otros tumores, deberemos hacer un esfuerzo para unificar al máximo las diferentes clasificaciones, como es el caso del cáncer de colon (76).

Existen tres clasificaciones en el momento actual publicadas, a la espera de los datos analizados con tumores de páncreas en el contexto del TCGA (The Cancer Genome Atlas):

A- El primer grupo que publicó una clasificación molecular en el cáncer de páncreas fue el grupo de Collison et al (78).

Ellos identificaron 3 subtipos:

-Clásico: Este grupo presentaba alta expresión de genes asociados con la adhesión y genes epiteliales.

-Casi-mesenquimal: Este grupo tenía una alta expresión de genes mesenquimales.

-Tipo exocrino o *exocrine-like*: Este grupo se caracterizaba por una relativa alta expresión de genes de enzimas digestivos derivados de células tumorales.

Los tres grupos presentaban una supervivencia diferente tras la resección quirúrgica. Los pacientes pertenecientes al subgrupo clásico presentaban mejor pronóstico que los que pertenecían al casi-mesenquimal ($p=0.038$). En el mismo grupo de pacientes, el estadio no se asoció con el subtipo tumoral ($p=0.40$), mientras que el grado sí se relacionó ($p=0.041$) en un análisis univariado. En un análisis multivariado el subtipo tumoral resultó ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia ($p=0.024$).

Cuando evaluaron líneas celulares procedentes de tumores de pacientes o de ratones no identificaron el subtipo *exocrine-like*.

Los autores demuestran las diferencias entre el grupo clásico y casi-mesenquimal en referencia a dos genes: *GATA6* y *KRAS*. *GATA6* es esencial para el desarrollo del cáncer de páncreas, y ha estado largamente implicado en el cáncer de páncreas (79-81). *GATA6* resultó estar altamente expresado en la mayoría de las células pertenecientes al subtipo clásico, y comparativamente resultó tener una expresión baja en las células del grupo casi-mesenquimal. Los niveles de mRNA de *KRAS* fueron altos en el subgrupo clásico en comparación con los otros subtipos. La línea celular del subtipo clásico parecía ser más dependiente de *KRAS* que la línea celular del subtipo casi-mesenquimal. La firma de adicción a *KRAS* previamente descrita (82) era especialmente rica en el subgrupo clásico. Los autores destacan la importancia de estos hallazgos en la actitud terapéu-

tica. En el momento actual *KRAS* se considera un gen que no es diana de fármacos y nuevas drogas, por sus características estructurales. Si en un futuro se consigue cambiar este hecho, el subtipo clásico sería el mejor nicho para evaluar estas nuevas terapias.

Finalmente los autores evalúan la eficacia de gemcitabina y erlotinib en los diferentes modelos clásico y casi-mesenquimal. El subtipo clásico fue especialmente sensible al erlotinib, mientras que el subgrupo casi-mesenquimal era más sensible a gemcitabina.

B- El grupo australiano, formando parte del *International Cancer Genome Consortium* (ICGC), realizaron un estudio molecular completo mediante una secuenciación del genoma (*whole-genome sequencing*) de 100 tumores de páncreas resecados en los que el contenido de las células epiteliales era \geq al 40% (83). Ellos demostraron que la alteración de la estructura cromosomal es un importante El análisis reafirmó *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* y *CDKN2A* como genes comúnmente mutados en el cáncer de páncreas. Describieron otras mutaciones presentes en el cáncer de páncreas en menor frecuencia: *KDM6A* (18%), *PREX2* (10%), y *RNF43* (10%).

Este análisis permitió realizar una clasificación del cáncer de páncreas en 4 subtipos según las variaciones estructurales encontradas (variaciones en la estructura cromosómica) con potencial utilidad clínica:

-Subtipo estable: Representaba el 20% de las muestras tumorales analizadas. El genoma de este grupo de tumores contenía \leq 50% de variaciones estructurales y estaba caracterizado por una aneuploidía generalizada, sugiriendo defectos en el ciclo celular/mitosis. Las tasas de las principales mutaciones descritas en el cáncer de páncreas (*KRAS* y *SMAD4*) eran similares al resto de grupos. *TP53* se encontró mutado en un porcentaje ligeramente menor que el resto de grupos (61% versus 70%). La longitud de los telómeros fue similar al resto de los grupos.

-Subtipo de reordenamiento localizado: Representaba el 30% de las muestras analizadas. Este subtipo presentaba un evento focal en uno o dos cromosomas. El grupo fue dividido en aquellos tumores que presentaban regiones focales de amplificación o ganancia (*KRAS*, *SOX9*, *GATA6*, y algunos genes potencialmente diana de fármacos tales como *ERBB2*, *MET*, *CDK6*, *PIK3CA*, *PIK3R3* con una baja frecuencia, entre 1-2%) y el grupo que contenía reordenamientos genómicos complejos.

-Subtipo disperso: Representaba un 36% de las muestras analizadas. Este grupo presentaba un moderado rango de daño cromosómico, y menos de 200 variaciones estructurales.

-Subtipo inestable: Representaba el 14% de las muestras analizadas. Este subgrupo presenta un alto número de eventos estructurales (entre 200 y 558). La escala de inestabilidad genómica de estos tumores sugiere defecto en el mantenimiento del DNA, lo cual definiría un grupo de pacientes especialmente sensibles a agentes que dañen el DNA.

Este trabajo es uno de los más completos estudios moleculares del cáncer de páncreas. Los autores hacen relevancia a la heterogeneidad existente en este tumor. Describe mutaciones en un bajo porcentaje que pueden ser dianas terapéuticas y define un subgrupo con alteraciones en los genes encargados de la reparación del DNA potencialmente sensibles a la quimioterapia basada en platino. Con todo ello concluyen la necesidad de personalizar los tratamientos con el desarrollo de nuevas moléculas.

C- Moffitt ha publicado recientemente otro trabajo que intenta mejorar los datos moleculares de los que disponemos hasta el momento. Los autores destacan la dificultad de tener una adecuada muestra de células epiteliales en el tumor analizado, que a menudo son un componente minoritario de este tejido. Así mismo, destacan la posible interferencia del estroma y de las células exocrinas y endocrinas normales del páncreas en el análisis molecular de las muestras tumorales. Además, en el caso de analizar muestras de metástasis, destaca la contaminación de la muestra por las células del huésped (84).

Este grupo utiliza una técnica de microdissección para separar el componente estromal del tumoral. También correlacionan los hallazgos entre tumor primario y metástasis, encontrando una heterogeneidad menor de la esperada. En el análisis se incluyen 145 tumores primarios de páncreas y 61 metástasis. Al estudiar las metástasis los autores concluyen que el factor de confusión del tejido sano es inversamente proporcional al contenido de tumor en la muestra.

Al realizar un estudio del estroma, identifican una expresión génica propia del estroma, que permite al mismo tiempo diferenciar dos subtipos de estroma:

-*Normal*: Este subtipo iba asociado a un mejor pronóstico, con una supervivencia mediana en los pacientes pertenecientes a este grupo de 24 meses, con una supervivencia al año del 82%.

-*Activado*: Este grupo presentaba un peor pronóstico, con una supervivencia mediana de 15 meses y una supervivencia al año del 60%. Se caracterizaba por tener alterados genes relacionados con los macrófagos (por ejemplo la integrina *ITGAM*) y ligandos de citoquinas como *CCL13* y *CCL18*. También encontraron alteración en genes implicados en la proteína SPARC (proteína secretada rica en ácido y cisteínico), en la vía de Wnt (*WNT2*, *WNT5A*), *MMP9* y *MMP11*, alteraciones en los genes que codifican a FAP (proteína de activación de los fibroblastos), destacando su posible implicación en el mal pronóstico de este subgrupo.

En el estudio genético del estroma encontraron un patrón de firmas de expresión ausente en las células malignas tumorales.

También describe dos subtipos de células tumorales:

-*Subtipo clásico*: Este grupo presentaba un mejor pronóstico, con una supervivencia mediana de 19 meses y una supervivencia al año del 70%. Estos pacientes se beneficiaban menos del tratamiento adyuvante (HR=0.76).

-Subtipo “*basal-like*”: Presentaban un peor pronóstico, con una supervivencia mediana de 11 meses y una supervivencia al año del 44%. La mayoría de células metastásicas pertenecen a este grupo. Estos pacientes se beneficiaban más del tratamiento adyuvante (HR=0.38). Los autores destacan la similitud entre este subtipo y el mismo subtipo descrito por el TCGA en el cáncer de mama o de vejiga (85).

Ambos tipos tumorales se encuentran en el estroma normal o activado. En un modelo multivariado donde se incluía variables clínicas (sexo, T, N, estado de los márgenes tras la cirugía, tratamiento realizado, grado histológico, sexo y edad), ambas clasificaciones fueron asociadas de forma independiente a la supervivencia.

Los autores compararon sus subtipos tumorales con los publicados previamente por Collison (78). El subtipo *exocrine-like* de la clasificación de Collison se solapaba con el factor de confusión de páncreas exocrino, sugiriendo que podría ser fruto de la contaminación por el tejido exocrino sano de páncreas. Los genes del subtipo clásico de Collison se solaparon con el subtipo clásico de esta clasificación. El subtipo casi-mesenquimal se solapaba con el subtipo *basal-like* y con el estroma.

Los autores destacaron la importancia de los nuevos datos sobre la biología del cáncer de páncreas en la toma de decisiones terapéutica, así como en el desarrollo de nuevas terapias moleculares dirigidas.

3.2.2. STEM CELLS O CÉLULAS MADRE

Entre un 1 y un 5% de las células que componen el cáncer de páncreas tienen características de células madre. Este pequeño grupo de células podría ser el responsable de la iniciación, el mantenimiento y la progresión del cáncer de páncreas.

Estas células tienen capacidad de dividirse de forma simétrica (su división solo da lugar a células de las mismas características que ella) o asimétrica, dando lugar a células progenitoras maduras o bien a nuevas células madre (4). Son células con alta capacidad de formar tumores, de hecho cuando se inoculan células madre de un cáncer de páncreas a ratones con la inmunidad comprometida, se reproduce el tumor por completo. Estas células tienen la capacidad de auto-renovarse. Dentro de este grupo de células se llevarían a cabo distintas funciones tumorales, entre ellas la transformación epitelio-mesequimal que da lugar a la formación de metástasis (86, 87).

Estas células se pueden identificar por la presencia de determinados marcadores en su membrana (88).

Son células resistentes a la quimioterapia y radioterapia. No obstante, tienen vías de señalización alteradas que regulan su crecimiento y supervivencia, como la de Notch, Hedgehog o la de Wnt-beta-catenina. Estas vías activadas proporcionan una oportunidad terapéutica para el cáncer de páncreas (89-90).

En el momento actual existen estudios clínicos en desarrollo con moléculas inhibitoras de las *stem cells*. Este tema se desarrollará en detalle más adelante.

3.2.3. ESTROMA

Un hecho característico del cáncer de páncreas es la formación de un estroma denso y poco vascularizado que se llama reacción desmoplásica (4). La reacción desmoplásica está caracterizada por una compleja interacción entre las células tumorales, los fibroblastos estromales, las células inflamatorias, la matriz extracelular, las células endoteliales y las vías compuestas por factores de crecimiento activadas por vía endocrina y paracrina (91).

Cuando analizamos histopatológicamente el estroma nos encontramos con grandes cantidades de colágeno tipo I y III, asociado con fibroblastos que han perdido la integridad de su membrana basal (fibroblastos “mutados”), y células tumorales malignas. Todo ello asociado a una vascularización alterada formada por pequeños vasos tortuosos y frágiles (92). El estroma puede llegar a constituir el 90% del volumen del tumor de páncreas (93).

Dentro del estroma tumoral vamos a dividir sus componentes en tres grupos:

-*Células estromales*: Fibroblastos, células estrelladas pancreáticas, células endoteliales, células del sistema inmune o inflamatorias, y adipocitos.

-*Matriz extracelular*: Colágeno tipo I y III, laminina, fibronectina, SPARC, metaloproteinasas-MMP-.

-*Vías del estroma*: Hedgehog, factor nuclear $\kappa\beta$, ciclooxigenasa-2, TGF- β , factores de la angiogenesis como factor de crecimiento vascular-VEGF-, y factor de crecimiento derivado de plaquetas-PDGF-, factor de crecimiento derivado del hepatocito -HGF-met-, MMP, factores de crecimiento de los fibroblastos-FGF-.

El estroma tumoral no se considera una barrera mecánica, a través de la activación de sus componentes (células estrelladas, colágeno, laminina, fibronectina, MMP, TGF- β , HGF, y PDGF), el estroma participa activamente en la formación tumoral, progresión, invasión y metástasis (91)(94). El componente estromal del tumor mantiene una relación activa con las células tumorales de forma bidireccional y ello facilita el crecimiento tumoral y la formación de metástasis.

Las células estromales expresan múltiples proteínas, como por ejemplo, la ciclooxigenasa-2, el receptor de PDGF, o VEGF, elementos de la vía de Hedgehog, entre otros. La expresión de estas proteínas se ha asociado a un mal pronóstico y a una resistencia a los tratamientos convencionales. Además la barrera física que conlleva el denso estroma se ha asociado con la dificultad de llegada de agentes quimioterápicos a las células tumorales (95). Sin embargo, en la actualidad se están ensayando nuevos tratamientos dirigidos contra estas proteínas, que pueden ser útiles como dianas terapéuticas en el cáncer de páncreas (96-98). Este apartado se desarrollará en detalle más adelante.

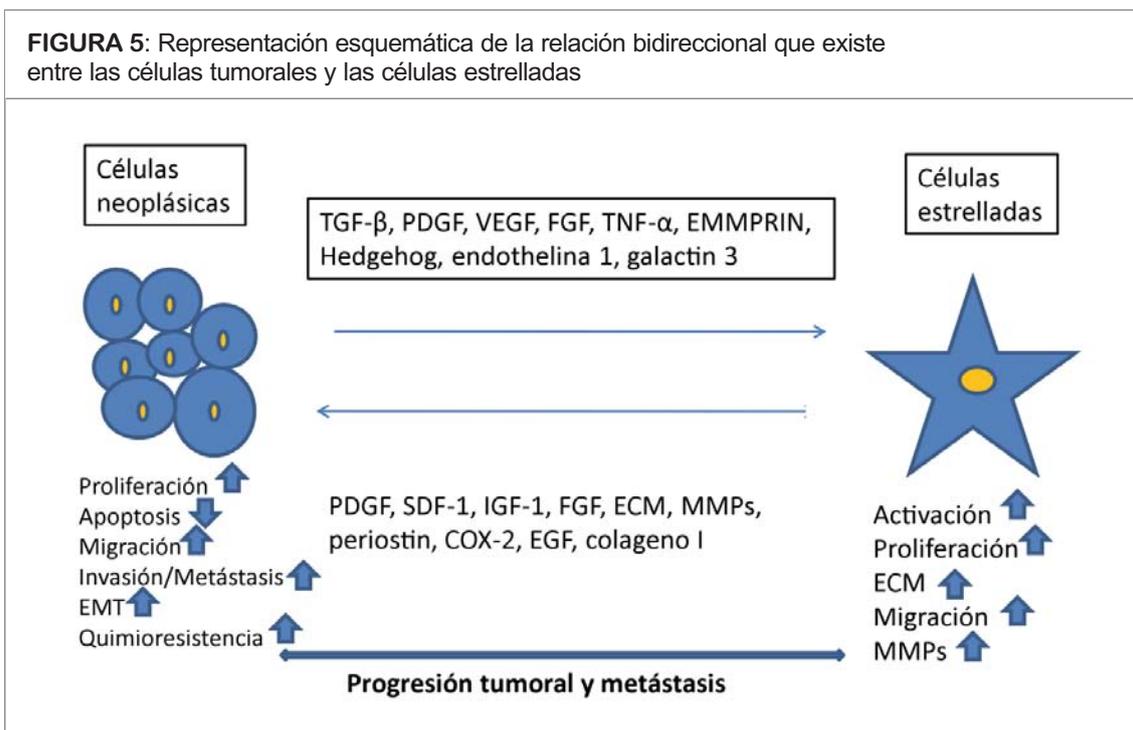
Células estrelladas *stellate cells*:

Los miofibroblastos o también llamadas células estrelladas tienen un rol importante en el mantenimiento y renovación del estroma (99-101).

Las células estrelladas constituyen un 4-7% de las células del páncreas normal, y están en su forma quiescente, expresando marcadores específicos como desmina y GFAP (100). Estas células juegan un importante rol en el mantenimiento de la estructura del páncreas formando la formación de matriz extracelular mediante las MMP y los inhibidores de las MMP (TIMPs).

Frente a un insulto en el páncreas estas células se transforman a su forma activada, con mayor expresión de la proteína α -SMA. Estas células activadas tienen las siguientes acciones:

- Aumento de la capacidad de proliferación y migración (102).
- Síntesis excesiva de elementos de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina) a través de factores de crecimiento como TGF-beta, PDGF o FGF.
- Síntesis excesiva de MMP y sus inhibidores (TIMPs) (103). Dichas células son las responsable de la renovación del estroma a través de las MMP y sus factores inhibidores (TIMPs) (104).
- Secreción de factores de crecimiento y de citoquinas que ejercen su función de forma autocrina y paracrina, estimulando la proliferación celular y la migración (105).



Se han identificado diferentes vías y moléculas asociadas a la transformación de las células estrelladas de quiescentes a activas (106). Destacaremos MAPK, PI3K, proteína quinasa C (PKC), la vía de JAK/STAT, y el factor de transcripción nuclear -Kappa B (NF- κ B).

Dichas células también son las responsables de la escasa vascularización del estroma (107). A pesar de que las células estrelladas liberan factores pro-angiogénicos como VEGF, y FGF, el abundante componente fibrótico distorsiona los finos vasos sanguíneos existentes en el tumor, alterando su arquitectura y provocando una compresión vascular que ocasiona un ambiente de hipoxia. El ambiente de hipoxia induce al mismo tiempo la activación de las células estrelladas. La hipoxia contribuye a la dificultad en la liberación de los agentes quimioterápicos a las células tumorales.

El ambiente de alta fibrosis y pobre vascularización ha demostrado provocar los siguientes efectos en la liberación de la quimioterapia al tumor:

- Reduce la liberación de quimioterapia a las células tumorales.
- La quimioterapia queda secuestrada en el estroma peritumoral
- Existe una disminución de la concentración intracelular de la quimioterapia.

Diferentes estrategias se están testando para poder mejorar la hipoxia y falta de difusión tumoral. Este aspecto se desarrollara ampliamente en apartados próximos.

El estroma, componente esencial en el cáncer de páncreas, está siendo objeto de desarrollo de nuevos fármacos para luchar contra el cáncer de páncreas. Estas potenciales terapias se desarrollaran más adelante.

4. Tratamiento sistémico del cáncer de páncreas metastásico

4.1. Generalidades del tratamiento del cáncer de páncreas

En el momento actual la quimioterapia sigue siendo el pilar en el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico, habiendo demostrado aumentar la supervivencia de forma significativa a aquellos pacientes tratados con ella.

No obstante, la supervivencia en el cáncer de páncreas sigue siendo pobre, alcanzando casi el año en el mejor de los esquemas. Por tanto, a pesar de los avances registrados en los últimos años con la publicación de dos estudios randomizados fase III en los que claramente se demostraba el beneficio de FOLFI-RINOX (oxaliplatino, irinotecan , 5-fluorouracilo en bolo, y 5-fluorouracilo en infusión continua) (108), y de gemcitabina en combinación con *nab*-paclitaxel (109) comparado con gemcitabina, no debemos conformarnos con estos resultados, dado que tal y como se ha argumentado en los primeros párrafos de este trabajo, se prevé que el cáncer de páncreas va a ser la segunda causa de muerte por cáncer en la próxima década.

Previamente a la publicación de estos dos trabajos positivos, a pesar de que la combinación de gemcitabina con algún otro agente quimioterápico era un estándar en el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico, los estudios no habían alcanzado la significación estadística. Se necesitó realizar un meta análisis para demostrar el beneficio de la gemcitabina en combinación con quimioterapia basada en platino o en fluoropirimidinas, y dicho beneficio solo se demostraba en aquellos pacientes con buen estado general (ECOG *performance status* 0-1) (110).

Revisaremos a continuación los esquemas de quimioterapia testados hasta llegar al estándar actual:

A- Gemcitabina comparado con 5-fluorouracilo:

5-fluorouracilo fue considerado el único tratamiento para el cáncer de páncreas durante 20 años hasta la aparición de gemcitabina (111). En 1997 Burris publicó un estudio fase II en el que comparaba gemcitabina con 5-fluorouracilo en bolo. El objetivo del mismo fue la mejoría clínica y la supervivencia. El estudio permitía la inclusión de pacientes con PS 0-2 (índice de Karnofsky 50-90%). Tras incluir un total de 126 enfermos, se demostró un aumento de la supervivencia en el grupo tratado con gemcitabina (5.65 meses vs 4.41 meses, $p=0.0025$), así como un aumento del beneficio clínico en el mismo grupo (23.8% vs 4.8%) (112). Este fue un estudio pionero introduciendo el concepto de beneficio clínico como objetivo del mismo.

Tras este trabajo, gemcitabina fue considerado el tratamiento estándar del cáncer de páncreas metastásico hasta la publicación de los dos estudios fase III positivos previamente mencionados (108, 109).

En el momento actual gemcitabina en monoterapia sigue considerándose como una opción de tratamiento para pacientes frágiles (113).

B- Gemcitabina en combinación con otros agentes quimioterápicos:

Durante muchos años se ha hecho el esfuerzo de testar la combinación de gemcitabina con otros agentes quimioterápicos, con resultados globalmente negativos.

Podríamos agrupar estos estudios en dos grupos; aquellos en que la combinación demostraba una superioridad respecto a la gemcitabina pero el beneficio no alcanzaba la significación estadística (por ejemplo fluoropirimidinas y derivados de platinos), y el grupo en que el fármaco combinado con la gemcitabina no aportaba nada en cuanto a eficacia respecto a la gemcitabina (por ejemplo marmastat o irinotecan).

Gemcitabina y fluoropirimidinas

Dos estudios fase III evaluaron la eficacia de la combinación de gemcitabina con 5-fluorouracilo comparado con gemcitabina en monoterapia. El brazo experimental no demostró una mejoría en supervivencia o en tasa de respuestas (114, 115).

Capecitabina ha sido testada en combinación con gemcitabina. Herrmann y Cunningham (116, 117) publicaron dos estudios fase III con gemcitabina +/- capecitabina (dosis de 650 mg/m² o 830 mg/m² dos veces al día) en pacientes con cáncer de páncreas metastásico. No se demostró una mejoría en la supervivencia con la combinación (8.4 vs 7.2 meses y 7.4 vs 6 meses, $p=0.23$ y $p=0.08$). Al realizar un análisis de subgrupos, los pacientes con índice de Karnofsky de 90-100, se beneficiaban del tratamiento combinado (10.1 vs 7.4 meses, $p=0.014$). El estudio de Cunningham demostró un aumento de la supervivencia libre de progresión (HR=0.78, $p=0.004$) y de la tasa de respuestas (19.1 vs 12.4%, $p=0.034$) comparado con gemcitabina.

Se realizó un análisis conjunto de los dos estudios fase III y los pacientes de un estudio fase II publicado por Schreithauer, alcanzando la significación estadística, con una HR para supervivencia de 0.86 (IC 95%: 0.75-0.98, $p=0.02$). Debemos ser críticos con este análisis conjunto que incluía 935 pacientes de tres estudios y con la interpretación de sus resultados.

Basados en estos resultados, la combinación de gemcitabina con capecitabina es utilizado para el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico, especialmente en determinados países como Inglaterra.

Gemcitabina y quimioterapia basada en platino

La combinación de gemcitabina con quimioterapia basada en platino ha sido evaluada en 11 estudios clínicos y en más de 2000 pacientes (118). Uno de los estudios más representativos fue el realizado por los grupos cooperativos GER-COR/GISCAD, en el cual la combinación de gemcitabina y oxaliplatino demostró un aumento de la supervivencia libre de progresión (5.8 meses vs 3.7 meses, $p=0.04$), así como de tasa de respuesta (26.8% vs 17.3%, $p=0.04$). Sin embargo, la diferencia en supervivencia no alcanzó la significación estadística (9 meses *versus* 7.1 meses, $p=0.13$) (119). Estudios posteriores no confirmaron estos esperanzadores resultados (120-122).

Un meta análisis demostró beneficio en la supervivencia con la combinación de gemcitabina y platino (odds ratio 1.33, 95% IC: 1.05-1.69, $p=0.019$)(110).

Gemcitabina y otras combinaciones

Muchas otras combinaciones han fracasado en intentar mejorar los datos de gemcitabina en monoterapia.

TABLA 3: Estudios en donde se evaluó la combinación de gemcitabina con otros agentes quimioterápicos, con resultados negativos. Resultados del brazo experimental.

Régimen en el estudio	N	Supervivencia libre de enfermedad	Supervivencia
Gem +/- marimastat (123)	239	NA	5.5 m
Gemc +/-tipifarnib (124)	688	3.7 m	6.4 m
Gemc +/-exatecan (125)	349	3.7 m	6.7 m
Gemc +/- irinotecan (126)	360	3.4 m	6.3 m
Gemc +/- pemetrexed (127)	565	3.3 m	6.2 m

N: número de pacientes, gem: gemcitabina, m: meses

Destacamos el caso de los inhibidores de la topoisomerasa (irinotecan y exatecan), aunque con una actividad preclínica prometedora, no demostraron ninguna actividad en cuatro estudios randomizados (125, 126, 128, 129).

También se combinó gemcitabina con taxanos, con resultados poco alentadores (130).

C- Gemcitabina en combinación con tratamientos dirigidos

Gemcitabina en combinación con antiangiogénicos:

Desafortunadamente todos los intentos realizados con el objetivo de utilizar la angiogénesis como diana terapéutica han fracasado en el cáncer de páncreas.

TABLA 4: Fármacos antiangiogénicos evaluados en el contexto de estudios clínicos fase III en el cáncer de páncreas. Resultados del brazo experimental.

Régimen en el estudio	N	Tasa respuesta	Supervivencia
Gem +/- beva (131)	590	13%	5.8 meses
Gem + erlotinib +/- beva (132)	607	13.5%	7.1 meses
Gem +/- axitinib (133)	593	NR	8.3 meses
Gem +/- aflibercept (134)	594	NR	7.7 meses
Gem +/- sorafenib (135)	104	23%	8 meses

Gemc: Gemcitabina, beva: Bevacizumab, N: Número pacientes, NR: No reportada

No existe en el momento actual un desarrollo para los fármacos anti-angiogénicos en el tratamiento del cáncer de páncreas.

Gemcitabina en combinación con fármacos dirigidos a la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGF):

El fármaco inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR, erlotinib, en combinación con gemcitabina demostró en un estudio fase III un beneficio estadísticamente significativo de 15 días en la supervivencia (6.2 meses vs 5.9 meses, HR: 0.82)(136). Con estos resultados consiguió la aprobación de las autoridades regulatorias americana y europea, pero su modesta actividad tuvo poca aceptación entre la comunidad científica. Este mínimo beneficio iba acompañado de un aumento de la toxicidad, especialmente en forma de rash y de neumonitis intersticial (7 de los 8 casos del estudio fueron en pacientes tratados con erlotinib).

Otros intentos de mejorar estos resultados fueron completamente fallidos. Gemcitabina en combinación con erlotinib +/- bevacizumab (estudio AVITA) fue un estudio completamente negativo (132).

En otros esfuerzos de utilizar esta vía como diana terapéutica, cetuximab (un anticuerpo monoclonal dirigido con el receptor del EGF) fue evaluado en combi-

nación con gemcitabina en un estudio fase III. El resultado fue completamente negativo (137).

La comunidad científica argumenta el hecho que en un tumor que presenta un alto porcentaje de pacientes con mutación en *KRAS*, podría ser una difícil población para estos tratamientos, como hemos evidenciado en otros tumores como el de pulmón (138). Los datos de biomarcadores existentes en los estudios anteriores son pobres. No se encontró en ninguno de los estudios desarrollados en este apartado una asociación entre mutación de *KRAS* y eficacia de erlotinib. No obstante la falta de asociación podría deberse a una falta de poder estadístico (139).

En la mayoría de estudios la cantidad de tejido tumoral recogido de los pacientes es escaso. Como veremos más adelante en la discusión de este trabajo, este es un problema común en el cáncer de páncreas, y es necesario realizar un esfuerzo con el objetivo de mejorar los datos de biomarcadores predictivos de respuesta, inexistentes en estos momentos en esta enfermedad.

El único marcador de respuesta encontrado en el tratamiento con erlotinib es la aparición de *rash*. Tanto en el estudio AVITA como en el estudio de Moore (PA.3) reportaron una mejor supervivencia aquellos enfermos que desarrollaban *rash* grado 2 o superior, llegando a 10 meses de supervivencia aquellos pacientes incluidos en el estudio PA.3 que desarrollaron *rash* grado 2 o superior. No obstante, en un estudio fase II randomizado en que se aumentaba la dosis de erlotinib en pacientes con cáncer de páncreas en función de la aparición de *rash*, no se encontraron diferencias en los pacientes tratados a altas dosis *versus* dosis estándares de erlotinib (7 meses vs 8.4 meses), a pesar que se desarrolló *rash* en 41% respecto 9% del grupo tratado a dosis estándares (140). En el momento actual necesitamos de más investigación para poder saber que enfermos se podrían beneficiar de utilizar EGFR como diana terapéutica en esta enfermedad.

Como se mencionó previamente en este trabajo, el grupo de Mariano Barbacid realizó un estudio pre-clínico donde inhibiendo la señal de EGFR se abolía el desarrollo de cáncer de páncreas en modelos murinos. Sin embargo, esta inhibición no se veía en pacientes con tumores deficientes en p53 (55). Reforzando esta idea se publicó un subanálisis del estudio AIO-PK0104, en el cual los pacientes con un cáncer de páncreas metastásico habían sido tratados con erlotinib. Este análisis apuntó a una superior supervivencia libre de progresión en aquellos pacientes con TP53 nativo que aquellos con TP53 mutado (141). De forma interesante, los pacientes con TP53 nativo presentaron mayor incidencia de *rash* en este análisis. No obstante, en el momento actual el papel de p53 como marcador pronóstico o predictivo de respuesta a fármacos dirigidos contra el EGFR no está claro, y precisa de más investigación.

Finalmente en los últimos años hemos asistido a la publicación y presentación en congresos de estudios que evaluaban inhibidores de MEK en cáncer de páncreas. Existe la evidencia en estudios pre-clínicos, así como lo experiencia en otros tumores, de la posible eficacia de estos fármacos en los tumores con mutación de *KRAS*.

Desgraciadamente los estudios clínicos randomizados desarrollados hasta la actualidad no han podido demostrar un beneficio clínico al añadir inhibidores de la vía de ERK al tratamiento convencional.

En el congreso americano del año 2014 se presentaron los resultados de refametinib (BAY-86-9766) con gemcitabina en pacientes en primera línea de cáncer de páncreas. Este era un estudio fase II de brazo único, con las limitaciones que ello comporta a la hora de valorar la eficacia. Se incluyeron 60 enfermos, se detectaron un 35% de tasa de respuestas parciales, una supervivencia libre de progresión de 7.4 meses y una supervivencia de 8.9 meses. De forma interesante se realizó un subestudio molecular, permitiendo detectar *KRAS* como la mutación más frecuente (en el 65% de los pacientes). De forma interesante, los paciente sin mutación de *KRAS* respondían mejor al tratamiento (mutado/nativo: tasa de respuestas: 28%/48%, supervivencia libre de progresión: 4.6 m/9 m, y supervivencia global: 6.6 m/18.2 m). Destacamos de este subestudio el concepto que introducen los autores de frecuencia alélica en la mutación de *KRAS*, tema que también discutiremos más adelante en nuestro trabajo. Ellos encontraron una tendencia con la correlación de la frecuencia alélica y la respuesta al fármaco, dándole importancia no solo a la presencia de la mutación o no, sino también al concepto de la frecuencia alélica (142, 143).

Gemcitabina también fue combinada con pimasertib (MSD 1936369B) en un estudio fase II randomizado con 88 pacientes. El objetivo primario del estudio, supervivencia libre de progresión, no se alcanzó (2.83 meses en el grupo tratado con placebo y 3.75 meses en el grupo experimental, HR=0.89) (144). El estado mutacional de *KRAS* no influyó en los resultados de supervivencia libre de progresión.

En primera línea y en combinación con gemcitabina también ha demostrado su falta de eficacia la combinación de gemcitabina con trametinib en un estudio fase II randomizado (HR para supervivencia 0.98) (145). Trametinib (GSK 1120212) es un inhibidor de la función quinasa de MEK1/2, que ha demostrado una actividad prometedora en tumores con mutaciones en *RAS*. La incidencia de *KRAS* en los pacientes incluidos en el estudio fue del 81.7%, y no se encontraron diferencias de eficacia entre los pacientes *KRAS* nativo o mutado. En este estudio se analizó *KRAS* en DNA circulante y en tejido tumoral, y la concordancia en el hallazgo de mutaciones fue del 84.5%. Es importante el concepto introducido en este estudio de detección de la mutación de *KRAS* en el DNA circulante, dada la dificultad que existe en este tumor de obtener tejido tumoral. El avance en las técnicas no invasivas para poder profundizar en el estudio molecular son las armas que podrían ayudar en el encuentro de biomarcadores predictivos de respuesta a tratamientos dirigidos en el cáncer de páncreas.

Selumetinib (AZD6244), un potente y selectivo inhibidor de MEK, fue testado en combinación con capecitabina/placebo en pacientes con cáncer de páncreas que habían progresado a un tratamiento basado en gemcitabina. El objetivo del estudio, supervivencia, no se alcanzó (5.4 meses vs 5 meses en el grupo placebo, HR=1.03) (146). Nuevamente, no disponemos de un estudio de biomarcadores que nos oriente sobre la posible población que se pudiera beneficiar de esta combinación.

Con los resultados de estos estudios, y a falta de un marcador que nos permita identificar una población que se pueda beneficiar del tratamiento con los inhibidores de MEK, en el momento actual no se está desarrollando esta línea de investigación en la clínica.

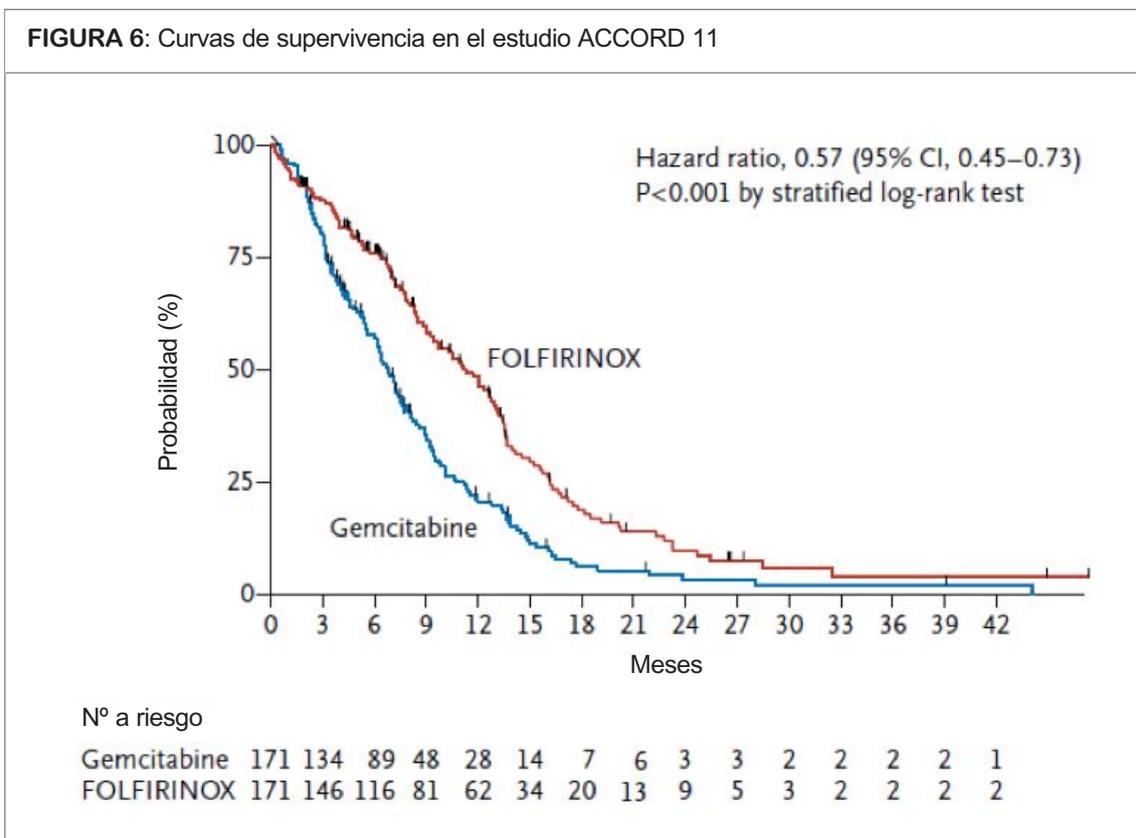
D- Estudios fase III positivos:

Estudio ACCORD:

En el año 2010 se presentó en el congreso americano el primer estudio claramente positivo tras el estudio publicado por Burris que había establecido la gemcitabina como tratamiento estándar en el cáncer de páncreas (108, 112).

En este estudio fase III desarrollado por completo en Francia, se randomizaron un total de 342 pacientes afectados de un cáncer de páncreas metastásico con PS de 0-1 y edad inferior a 75 años. El brazo experimental era FOLFIRINOX (oxaliplatino 85 mg/m², irinotecán 180 mg/m², leucovorin 400 mg/m², 5-fluorouracilo en bolo 400 mg/m² y en infusión continua 2400 mg/m², cada dos semanas) y el brazo control gemcitabina según el esquema de Burris.

Se alcanzó el objetivo del estudio que era supervivencia global. De hecho es el estudio con mejores cifras de supervivencia en la historia del tratamiento del cáncer de páncreas: 11.1 meses en el brazo experimental y 6.8 meses en el brazo control (HR=0.57, IC 95%: 0.45-0.73, p<0.001) (figura 6). El estudio también demostró un aumento significativo de la supervivencia libre de progresión (6.4 meses *versus* 3.3 meses, HR=0.47, IC 95%: 0.37-0.59, p<0.001) y de la tasa de respuestas (31.6% vs 9.4%, p<0.001).



A pesar de estos resultados positivos, el régimen experimental resultó ser más tóxico que el brazo control (Tabla 5). No obstante, en el análisis de calidad de vida, a los 6 meses, un 31.6% de los pacientes en el grupo experimental y un 66% en el grupo control habían experimentado un deterioro en su calidad de vida (HR=0.47, $p<0.001$).

TABLA 5: Efectos adversos grado 3, y 4 que ocurrieron en el estudio ACCORD 11.

Evento	FOLFIRINOX (N 171)	Gemcitabina (N 171)	P value
E. Hematológico	N pacientes/N total (%)		
Neutropenia	75/164(45.7)	35/167(21)	<0.001
Fiebre neutropenica	9/166(5.4)	2/169(1.2)	0.03
Trombocitopenia	15/165(9.1)	6/168(3.6)	0.04
Anemia	13/166(7.8)	10/168(6.0)	NS
E. No-hematológico			
Astenia	39/165(23.6)	30/169(17.8)	NS
Vomitos	24/166(14.5)	14/169(8.3)	NS
Diarrea	21/165(12.7)	3/169(1.8)	<0.001
D/P	15/166 (9)	0/169	<0.001
Elevación ALT	12/165(7.3)	35/168(20.8)	<0.001
Tromboembolismo	11/166(6.6)	7/169(4.1)	NS

E: evento, D/P: neuropatía periférica, ALT: alanina aminotransferasa, N: número de pacientes.

La comunidad científica ha aceptado este nuevo tratamiento como una nueva opción terapéutica en el cáncer de páncreas metastásico, pero con prudencia. Su utilización en la práctica clínica habitual queda limitada a aquellos pacientes con un buen estado general, que puedan hacer frente a los efectos secundarios que provoca este esquema de tratamiento (147).

Estudio MPACT:

El estudio MPACT es un estudio fase III, internacional, que randomizó a 861 enfermos a ser tratados con gemcitabina en combinación con *nab*-paclitaxel versus gemcitabina en monoterapia según el esquema de Burris (109).

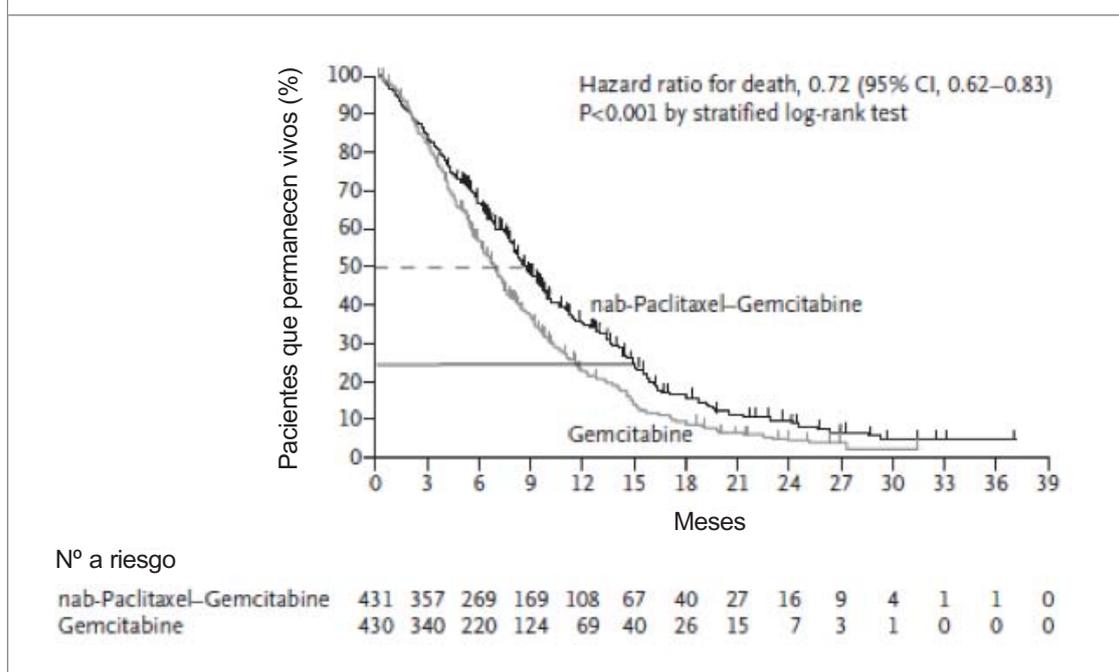
El grupo americano liderado por Daniel Von Hoff publicó en el año 2011 los datos pre-clínicos de esta combinación, así como el estudio fase I/II que permitió establecer la dosis recomendada de gemcitabina y *nab*-paclitaxel, y la preliminar eficacia de la combinación que favoreció el desarrollo del estudio fase III (148). En los modelos murinos se demostró que *nab*-paclitaxel en combinación

con gemcitabina alteraba la composición del estroma, haciéndolo menos denso y permitiendo aumentar la vascularización del mismo. Estos cambios en el estroma permitieron que la concentración de gemcitabina intratumoral fuera 2.8 veces superior en los ratones tratados con gemcitabina y *nab*-paclitaxel que los modelos tratados con gemcitabina. Todo ello se traducía con un efecto antitumoral superior (24% *versus* 55% de reducción tumoral).

El estudio fase I/II incluyó 67 enfermos, que fueron tratados en tres niveles de dosis de *nab*-paclitaxel (100, 125 y 150). La dosis recomendada fue gemcitabina 1000 mg/m² y *nab*-paclitaxel 125 mg/m² días 1, 8, 15/28 días. La toxicidad limitante de dosis fue en forma de sepsis y neutropenia. La actividad en este estudio fue prometedora, encontrándose a la dosis recomendada una tasa de respuestas del 48%, una supervivencia de 12.2 meses y una supervivencia al año del 48%. En este estudio la expresión de SPARC en el estroma (pero no en el tumor) se correlacionó con una mejor supervivencia (17.8 meses *versus* 8.1 meses, $p=0.043$). El descenso de CA 19.9 durante el tratamiento se correlacionó con una mejor supervivencia (13.5 meses si descendía más del 50% respecto 6.5 meses si descendía menos del 50%). Así, en este estudio se apuntaron dos posibles biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento.

El estudio MPACT alcanzó su objetivo primario, supervivencia, así como también los otros objetivos secundarios de eficacia: supervivencia 8.5 meses vs 6.7 meses, HR=0.72 (IC 95%: 0.62-0.83, $p<0.001$) (figura 7), supervivencia libre de progresión 5.5 meses vs 3.7 meses, HR=0.69 (IC 95%: 0.58-0.82, $p<0.001$) y tasa de respuesta (23% vs 7%, $p<0.001$).

FIGURA 7: Curvas de supervivencia en el estudio MPACT



El grupo experimental presentó mayor incidencia de efectos adversos, destacando la neutropenia, la fatiga y la neuropatía periférica, que a diferencia de la producida por el oxaliplatino, era de rápida recuperación (mediana de 29 días para pasar de grado 3 a grado 1).

TABLA 6: Efectos adversos grado 3 o superiores reportados en el estudio MPACT.

Evento	<i>Nab</i> -paclitaxel y gemcitabina N 421	Gemcitabina N 402
E. Hematológico	N pacientes/N total (%)	
Neutropenia	153/405 (38)	103/388 (27)
Leucopenia	124/405(31)	63/388(16)
Trombocitopenia	52/405(13)	36/388(9)
Anemia	53/405(13)	48/388(12)
Fiebre neutropenica		
E. No hematológicos	14/405(3)	6/388(1)
Astenia	70/405(17)	27/388(7)
D/P	70/405(17)	3/388(1)
Diarrea	24/405(6)	3/388(1)

E: evento, N: número de pacientes, D/P: neuropatía periférica

A diferencia del estudio ACCORD 11, no existía límite de edad en la inclusión de pacientes, de hecho 352 pacientes tenían una edad superior a 65 años, y en este grupo se reportó la misma incidencia de reducciones de dosis que en la población menor de 65 años (149).

Sin embargo, cuando se analizó SPARC como marcador predictivo o pronóstico, el resultado fue completamente negativo, de modo que en el momento actual no podemos utilizar este marcador para intentar seleccionar el tratamiento de nuestros pacientes (150).

Existen publicaciones con la valoración económica de estos nuevos fármacos (151).

Recomendaciones guías ESMO para el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico (147):

Actualmente las últimas recomendaciones de la ESMO son las siguientes:

- En caso que el paciente presente un performance status de 0-1, y la bilirrubina este por debajo de 1,5 veces la normalidad, se puede considerar tratar al paciente con FOLFIRINOX o gemcitabina en combinación con *nab*-paclitaxel (nivel evidencia IA).
- Pacientes con performance status de 2 y/o bilirrubina por encima de 1,5 veces la normalidad, se considera un tratamiento válido el administrar gemcitabina en monoterapia (nivel de evidencia IA).
- En pacientes con un performance status de 2 pero con bilirrubina que no supere 1,5 veces la normalidad, se puede considerar la opción de tratar con *nab*-paclitaxel y gemcitabina (nivel de evidencia IIB).
- Pacientes con performance status de 3 o 4 se debe considerar aplicar únicamente tratamiento sintomático.

4.2. Biomarcadores en cáncer de páncreas

Entre los fármacos validados para el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico no existe ningún biomarcador que pueda ser usado en la práctica clínica para guiar nuestras decisiones terapéuticas.

De los muchos biomarcadores que se han investigado, destacaremos los siguientes por su relevancia:

- La pérdida de expresión de Smad4 en cáncer de páncreas se ha asociado con un peor pronóstico. Ello puede tener utilidad para estratificar a los pacientes y para tomar decisiones (72).
- Mutaciones en los genes de reparación del DNA. Los pacientes con un cáncer de páncreas y una alteración en los genes de reparación del DNA pueden tener una mayor sensibilidad a los platinos y puede considerarse su inclusión en estudios clínicos con inhibidores del PARP (83).
- La expresión estromal de SPARC se asoció con un mayor beneficio de la combinación de gemcitabina y *nab*-paclitaxel, sin embargo este hallazgo no se confirmó en el estudio regulatorio fase III MPACT (150).
- Los pacientes con mutaciones germinales en *STK11* (alteración asociada al síndrome de Peutz-Jeghers) podrían ser sensibles a los fármacos inhibidores de mTOR según datos pre-clínicos (60).
- La vía de Hedgehog está largamente asociada con el cáncer de páncreas. La mutación de PTCH supone una activación de la vía, y está presente en un 2% de los pacientes con cáncer de páncreas (68).
- hENT1 (*human equilibrate nucleoside transporter 1*) es una proteína que tiene la función de mediar el transporte intracelular de nucleosidos. En la literatura existen resultados contradictorios en referencia a este potencial biomarcador. Posiblemente pueden influir dos factores: los diferentes anticuerpos que se utilizan en los estudios, y los diferentes puntos de corte que se marcan para valorar su expresión.

En el estudio de adyuvancia que evaluaba el papel de la gemcitabina versus placebo, CONKO-001, se analizaron las muestra tumorales de 156 pacientes. Para los 88 pacientes tratados con gemcitabina la supervivencia fue de 24.4 meses en el grupo con baja expresión de hENT1 y de 19.5 meses en el grupo con alta expresión de hENT1 ($p=0.57$). En el grupo control la supervivencia fue de 17.7 meses en el grupo con baja expresión de hENT1 y de 19.1 meses en el grupo de alta expresión de hENT1 ($p=0.738$) (152). Los autores concluyeron que no se podía confirmar en el estudio CONKO-001 el valor predictivo de hENT1 y reclamaban medidas reproducibles y estandarizadas para determinar este potencial biomarcador.

En el estudio ESPAC-3, que evaluaba el papel de gemcitabina respecto 5-fluorouracilo en el tratamiento adyuvante, 380 pacientes fueron analizados. La supervivencia en el grupo tratado con gemcitabina y baja expresión de hENT1 fue de 17.1 meses, y en el grupo con alta expresión de hENT1 fue de 26.2 meses ($p=0.002$). Sin embargo, en el grupo tratado con 5-fluorouracilo no se observaron diferencias en supervivencia según la expresión de hENT1 (25.6 meses vs 21.9 meses, $p=0.36$). Un análisis multivariado confirmó hENT1 como factor predictivo para los pacientes tratados con gemcitabina, pero no para los tratados con 5-fluorouracilo (153).

- Proteína C reactiva (PCR): Los estudios que están testando los inhibidores de la vía de JAK están utilizando la PCR como biomarcador predictivo. Tiene la ventaja de que es fácil de obtener y técnicamente estandarizado, sin embargo, queda la duda si realmente un marcador de inflamación puede reflejar el estado de activación de la vía de JAK.

- En la reciente publicación del estudio molecular del cáncer de páncreas mediante un análisis completo de secuenciación (83), se identificaron amplificaciones focales en genes que eran considerados potenciales dianas terapéuticas (*ERBB2*, *MET*, *FGFR1*, *CDK6*, *PIK3R3*, *PIK3CA*), sin embargo, la prevalencia de estas alteraciones en el cáncer de páncreas es muy baja.

En resumen, algunas mutaciones -aunque pocas en número-, potencialmente dianas terapéuticas, han sido identificada en el cáncer de páncreas. Sin embargo, en el momento actual la medicina personalizada en el cáncer de páncreas no es una realidad y debemos seguir trabajando para mejorarlo.

4.3. Nuevas drogas en el horizonte del cáncer de páncreas metastásico

Dados los pobres resultados de los que disponemos en el momento actual en el cáncer de páncreas, es una necesidad el disponer de armas más efectivas para tratar a este tumor.

A continuación revisaremos las nuevas estrategias terapéuticas que están siendo desarrolladas en el cáncer de páncreas avanzado:

4.3.1 AGENTES CITOTÓXICOS

MM398

MM398 o nal-IRI es una formulación liposomal del irinotecan. Comparado con el irinotecan convencional demostró una mayor área bajo la curva (AUC) y una mayor concentración de la droga en las células tumorales (154). Esta droga se evaluó en el estudio NAPOLI (155), estudio fase III que randomizaba a los pacientes refractarios al tratamiento con gemcitabina a recibir 5-fluorouracilo con ácido folínico, 5-fluorouracilo con ácido folínico y MM-398 o MM398 en monoterapia.

El brazo de la combinación demostró una mejoría en la supervivencia global de 2 meses (6.1 meses vs 4.2 meses, $HR=0.67$, $p=0.012$).

De forma interesante, hasta el momento actual irinotecán había demostrado solo una actividad modesta en la población refractaria (156).

TH302

Evofosfamida o TH-302 es un nitrógeno derivado de la mostaza que se activa con la hipoxia, resultando en Br-IDM (157).

Un estudio randomizado fase II demostró que el fármaco a dosis de 340 mg/m² en combinación con gemcitabina aumentaba la supervivencia libre de progresión respecto gemcitabina sola (6 meses vs 3.6 meses, p 0.008) (158).

En el momento actual ha finalizado el reclutamiento del estudio MAESTRO, fase III que evalúa la eficacia de gemcitabina +/- TH-302 (NCT01746979).

Inhibidores PARP

Se estima que un 4-8% de los pacientes con cáncer de páncreas van a tener mutaciones en los genes de reparación del DNA. En el momento actual no existe una estrategia clara para la detección de esta población.

Estos pacientes son más sensibles a la quimioterapia basada en platino (159). En un estudio fase I con olaparib (inhibidor de PARP) se incluyeron 27 pacientes con un cáncer de páncreas portadores de una mutación en los genes de reparación del DNA. Todos ellos habían sido tratados con distintas líneas de tratamiento, y la mediana de supervivencia tras la inclusión en el estudio fue de 9,8 meses (160).

En el momento actual está reclutando pacientes el estudio POLO (NCT02184195). Pacientes con mutación en genes de reparación del DNA y un cáncer de páncreas metastásico en enfermedad estable o respuesta radiológica tras 16 semanas de tratamiento con quimioterapia basada en platino, son randomizados a ser tratados con olaparib/placebo. De forma importante este estudio es un intento de personalizar los tratamientos, y considerar los pacientes con cáncer de páncreas metastásico con mutaciones en los genes de reparación del DNA como un grupo en el que hay que considerar un tratamiento diferente.

4.3.2 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS CONTRA EL ESTROMA

Inhibidores de Hedgehog

La vía de Hedgehog se ha identificado como una de las vías centrales en el desarrollo del cáncer de páncreas (74). A diferencia de otros tumores que resultan ser muy sensibles a los inhibidores de Hedgehog (como meduloblastoma y el carcinoma de células basales), en el cáncer de páncreas las mutaciones de *PTCH1* y de *SMO* (genes que codifican el receptor para los ligandos de la vía y una proteína intracelular que activa la señal de la vía respectivamente) son muy poco frecuentes (161, 162). En el cáncer de páncreas la vía se activa básicamente en el estroma, y en menor medida en las células tumorales. Así en modelos murinos, al bloquear *SMO* en el estroma se inhibe el crecimiento tumoral (163).

En modelos pre-clínicos se demostró que al administrar gemcitabina con IPI-926 (inhibidor de SMO) en modelos murinos, se alteraba la composición del estroma, haciéndolo menos denso y más vascularizado, permitiendo mejor la llegada de la gemcitabina a las células tumorales (164). A pesar de estos prometedores datos pre-clínicos, los estudios randomizados llevados a la clínica han fallado en demostrar la eficacia de los inhibidores de Hedgehog en cáncer de páncreas (165).

Los resultados negativos con los inhibidores de Hedgehog se pueden entender mejor con la publicación de dos trabajos en los que a nivel pre-clínico se demuestra que al tratar el cáncer de páncreas con un inhibidor de Hedgehog, se deplecciona el estroma y con ello el tumor aumenta su agresividad. En estos trabajos apuntan a un posible papel protector del estroma frente al crecimiento del tumor (166, 167). Se proponen nuevas estrategias a aplicar junto con el inhibidor de Hedgehog para compensar la alteración del estroma, por ejemplo añadir un anti-angiogénico o un fármaco que ataque los checkpoints de la inmunidad (168).

Inhibidores de la hialuronidasa

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano que forma parte de la matriz extracelular. Existen trabajos pre-clínicos que apuntan que el tratamiento del cáncer de páncreas con un fármaco que degrade el ácido hialurónico, permite la disminución de la presión intersticial existente en el estroma y considerado el causante de la compresión de los vasos y por tanto de la hipoxia del estroma. Al tratar el tumor con PEGPH20 (forma recombinante de hialuronidasa humana), el estroma se vuelve más vascular, y permite un aumento de la gemcitabina en las células tumorales, así como un efecto sobre la supervivencia comparado con gemcitabina en monoterapia (169).

En el momento actual se está completando la segunda etapa de un estudio fase II randomizado con gemcitabina y *nab*-paclitaxel +/- PEGPH20. En el congreso americano de este año se presentaron los resultados preliminares de la primera etapa del estudio. En esta primera etapa se detectó una incidencia alta de trombosis en el grupo tratado con PEGPH20, motivo por el cual se cerró temporalmente el estudio, se revisó el protocolo, y se estableció que todos los enfermos debían ser tratados con heparina de bajo peso molecular profiláctica. Tras aplicar esta modificación en la segunda fase del estudio la incidencia de trombosis ha disminuido de forma importante. En la primera fase del estudio se incluyeron 146 pacientes. Los preliminares resultados en la población con alta expresión de ácido hialurónico parecen prometedores (170).

TABLA 7: Datos de eficacia de la combinación gemcitabina + nab-paclitaxel +/- PEGPH20.

Evento	Gem+nab+PEGPH20 N 74	GEM+ nab N 61
RR		
Expresión alta HA	12/23 (52%)	5/21 (24%)
Expresión baja HA	14/38 (37%)	9/24(38%)
PFS		
Expresión alta HA	9.2 meses	4.3 meses
Expresión baja HA	5.3 meses	5.6 meses
OS		
Expresión alta HA	12 meses	9 meses

RR: tasa de respuestas, HA: ácido hialurónico, PFS: supervivencia libre de progresión, OS: supervivencia, Gem: gemcitabina, nab: nab-paclitaxel, N: número de pacientes.

Existe el debate de la necesidad de obtener tejido tumoral para poder determinar el estado del ácido hialurónico, y la necesidad de estandarizar la positividad del marcador.

Una vez finalizada la parte segunda del estudio está planeado el desarrollo del estudio fase III que testará la combinación de gemcitabina + nab-paclitaxel +/- PEGPH20 en la población con alta expresión de ácido hialurónico.

Ibrutinib

Ibrutinib es un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton que está aprobado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, el linfoma del manto y la enfermedad de Waldenstrom. Actúa inhibiendo la degranulación de los mastocitos.

La infiltración de mastocitos en el estroma se correlaciona con un mal pronóstico (171). La migración de los mastocitos es estimulada por las células tumorales, y tanto las células tumorales como el estroma estimulan la degranulación de los mastocitos. Al mismo tiempo los productos de dicha degranulación (triptasa, IL-13) serán los responsables de la estimulación de las células tumorales y del estroma.

Recientemente se ha publicado el trabajo realizado por el grupo de Laura Soucek en el que demostraron en modelos murinos transgénicos y en modelos con tumores de pacientes (*xenopatients*), que al tratar a los ratones con ibrutinib se conseguía disminuir la proliferación celular, disminuir el infiltrado inflamatorio, y disminuir el colágeno y por tanto el componente de fibrosis del estroma. Al mismo tiempo, se aumentaba la supervivencia de ratón tratado con la combinación de gemcitabina en combinación con ibrutinib si se comparaba con la supervivencia del ratón tratado con gemcitabina sola (172).

En otros trabajos pre-clínicos con células de cáncer de colon y mama se demostró que ibrutinib también tenía efecto sobre la inmunidad. Ibrutinib inactiva a un

enzima, ITK, necesario para la formación de Th2. La combinación de ibrutinib con un anti-PD-L1 demostró un efecto sinérgico, abriendo una puerta a posibles estrategias terapéuticas (173).

En el momento actual está en marcha el desarrollo de un estudio fase III con gemcitabina y *nab*-paclitaxel +/- ibrutinib en pacientes afectos de un cáncer de páncreas metastásico en primera línea de tratamiento.

4.3.3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS CONTRA LA INFLAMACIÓN

La vía de JAK está implicada en la formación del cáncer de páncreas. La familia de las quinasas de Janus están formadas por 4 tirosina quinasas (JAK1, JAK2, JAK 3, y TYK2). La vía se activa con la dimerización de dos receptores tras la unión de citoquinas. Con la activación del receptor, se fosforila STAT, así como otras vías de señalización (como por ejemplo Src, RAS, PI3K)(174). Una vez STAT está activado, la señal se transmite al núcleo de la célula para empezar la proliferación celular (175).

En la mielofibrosis se han descrito hasta 505 mutaciones en el gen *JAK2 V617F*, y en esta enfermedad ruxolitinib, un inhibidor de JAK1 y 2, ha demostrado su eficacia y ha sido aprobado por las autoridades regulatorias (176, 177).

En el cáncer de páncreas también se ha descrito una activación de STAT, sin embargo el mecanismo de dicha activación no está claro. Un análisis genómico de 26 pacientes no encontró mutaciones en *JAK* (178). Existen trabajos pre-clínicos que apuntan un aumento de la expresión del receptor de citoquinas (subunidad gp130), así como un aumento de la fosforilación de STAT3 como posibles biomarcadores de respuesta a inhibidores de JAK 2 en el cáncer de páncreas (179).

Recientemente se han publicado los resultados de un estudio fase II randomizado que incluía pacientes que había progresado a la gemcitabina (estudio RECAP) (180). Un total de 127 pacientes fueron tratados con capecitabina +/- ruxolitinib. El resultado del estudio fue negativo para la supervivencia global (4.3 meses vs 4.6 meses, HR=0.79, p=0.25), y supervivencia libre de progresión (HR=0.75, p 0.14). No obstante, en un análisis pre-especificado de subgrupos, los pacientes con un componente inflamatorio en el tumor, definido por PCR mayor de 13 mg/L, la supervivencia fue superior en el grupo tratado con capecitabina y ruxolitinib (HR=0.47, p=0.011).

En el momento actual están reclutando pacientes dos estudios fase III, el JANUS 1 y 2 en segunda línea con capecitabina +/- ruxolitinib (NCT 02117479) y un estudio en primera línea que combina gemcitabina + *nab*-paclitaxel +/- momelotinib (un inhibidor de JAK 1 y 2)(NCT 02101021). Todos estos estudios seleccionan la población a tratar por un valor PCR alta (mayor de 10 mg/L).

4.3.4. ESTRATEGIAS CONTRAS LAS CÉLULAS MADRE O *STEM CELLS*

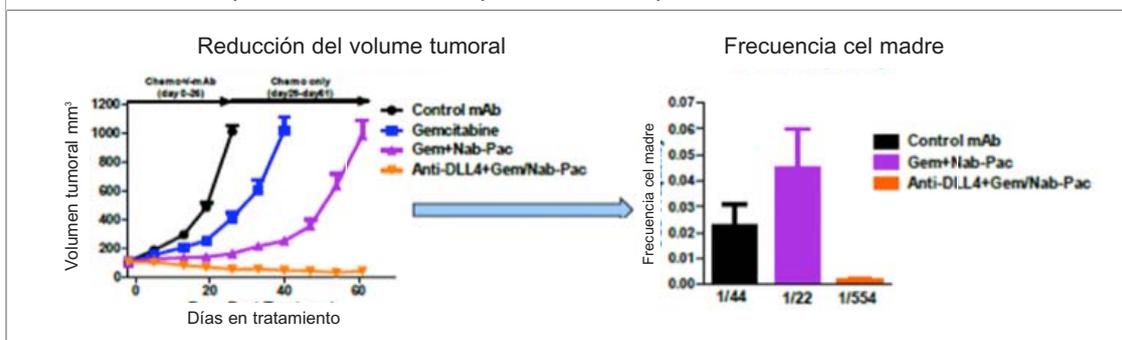
Tal y como se ha hablado con anterioridad en este trabajo, actualmente se conocen los marcadores moleculares que caracterizan a las células madre en el cáncer de páncreas, y estas están caracterizadas como células que expresan CD44+, CD21+, y ESA+ (181). En series quirúrgicas la expresión de los marcadores de las células madre en las muestras tumorales de cáncer de páncreas se correlacionaron con una menor supervivencia (182). En modelos murinos se evidenció que al tratar tumores de páncreas con drogas que utilizaban las células madre como diana, los ratones presentaban una mayor supervivencia (183, 184).

En el momento actual existen diferentes drogas que actúan inhibiendo las vías de señalización asociadas a las células madre, como Wnt, Notch y Hedgehog. Actualmente estas drogas se están evaluando en solitario o en combinación con agentes quimioterápicos.

Existe un estudio que combinan OMP-54F28, que es un antagonista de la vía de Wnt, con gemcitabina + *nab*-paclitaxel en primera línea de cáncer de páncreas (NCT02050178). También se está evaluando el fármaco LGK974 (inhibidor de la vía de la porcupina) en pacientes con cáncer de páncreas portadores de la mutación *RNF43* (NCT01351103).

Destacaremos un estudio fase II randomizado con gemcitabina+ *nab*-paclitaxel +/- demcizumab (OMP-21M18) que incluye enfermos con un cáncer de páncreas en primera línea de tratamiento (NCT02289898). Este estudio se encuentra reclutando pacientes en este momento de forma activa. OMP-21M18 es un anticuerpo humanizado IgG2 inhibidor de la vía de Notch mediante la unión al ligando DLL4. En el congreso europeo del año 2014 Manuel Hidalgo presentó los datos en modelos murinos y los datos del estudio fase 1b de la combinación de gemcitabina + *nab*-paclitaxel +/- demcizumab en pacientes afectados de cáncer de páncreas (185). En los modelos murinos, cuando demcizumab se administró con la combinación de gemcitabina y *nab*-paclitaxel se observó una disminución de las células madre y una disminución del volumen tumoral. El estudio pre-clínico demostró una sinergia al administrar demcizumab con la combinación de gemcitabina + *nab*-paclitaxel.

FIGURA 8: Actividad de demcizumab en combinación con gemcitabina + *nab*-paclitaxel en modelos murinos con implantación de tumores procedentes de pacientes.



En la figura de la izquierda se aprecia la disminución del volumen tumoral al tratar a los ratones con la triple combinación. En la figura de la derecha se aprecia la disminución de las células madre al tratar al tumor con la triple terapia.

Se incluyeron un total de 21 pacientes en el estudio fase I, obteniéndose un 41% de tasas de repuestas parciales, con una tasa de beneficio clínico del 86 % (respuesta parcial y estabilizaciones).

Si tenemos presente que las células madre son las células responsables de la resistencia a la quimioterapia y de la repoblación celular en el tumor, la estrategia de desarrollar fármacos inhibidores de las células madre en el contexto del tratamiento adyuvante debería explorarse como los siguientes pasos a seguir en esta estrategia terapéutica.

4.3.5. INMUNOTERAPIA

El cáncer de páncreas se caracteriza por ser tener un ambiente de inmunosupresión (186, 187). Esta anulación de la inmunidad contra el cáncer está orquestada por los siguientes tipos tumorales que están presentes alrededor de las células tumorales pancreáticas: fibroblastos asociados al cáncer (CAF), células supresoras derivadas mieloides (MDSCs), macrófagos asociados al tumor (TAMs), células dendríticas (DCs), y linfocitos que infiltran el tumor (TILs) (188).

El poder romper esta red inmunosupresora y promover la actividad de estas células contra el tumor será el objetivo del tratamiento de inmunoterapia en el cáncer de páncreas.

Inmunoterapia basada en el uso de anticuerpos:

Las células cancerígenas tienen la capacidad de evadir la respuesta inmune modulando la señal de las células T. PD-1 es un receptor de control de la inmunidad (*immune-checkpoint*) que está expresado en las células T activadas. Los ligandos PD-L1 y PD-L2 pueden estar expresados en el estroma y en las células cancerígenas (189). La unión de los ligandos al receptor inactiva la célula T, haciendo a las células tumorales invisibles al sistema inmune.

Anticuerpos que utilizan PD-1 o PD-L1 como diana terapéutica han demostrado eficacia en tumores como el melanoma, el cáncer de pulmón, o el cáncer renal (190, 191). Sin embargo, en el cáncer de páncreas estos fármacos no han demostrado actividad (191, 192). Los motivos por el fracaso terapéutico no están del todo claros, una posible explicación hallada en modelos pre-clínicos, es la baja expresión de CD3 (marcador de células T) y alta expresión de CXCL12 en las células de cáncer de páncreas, indicando el ambiente de inmunosupresión existente en estos tumores (193). El principal contribuidor de CXCL12 serían los fibroblastos asociados al tumor, más que las propias células tumorales. Demostrándose un efecto inmune al administrar un fármaco contra los fibroblastos, permitiendo el aumento de CD3, y con ello sensibilizando a estas células contra los fármacos anti-CTLA-4 o anti-PD-1. Otra estrategia con resultados prometedores fue utilizando un fármaco inhibidor de CXCL12, nuevamente aumentando la sensibilidad del tumor a inhibidores de *immune-checkpoints*.

Así los fármacos que utilizan el estroma como diana en combinación con fármacos dirigidos a inactivar los *immune-checkpoints* podrían utilizarse en el cáncer de páncreas.

Otra forma de activar la inmunidad puede ser a través de la activación de CD40, presente en los macrófagos asociados al tumor. En modelos murinos el tratamiento con CP-870893 (un agonista de CD40) en combinación con gemcitabina provocó el acumulo de macrófagos en el tumor, y la regresión tumoral (194). En el estudio fase I se han incluido algunos pacientes con cáncer de páncreas con evidencia de actividad antitumoral (195).

Vacunas:

GVAX es una vacuna derivada de líneas celulares de cáncer de páncreas que fue modificada para expresar factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)(196). La parte de GM-CSF de la vacuna provoca la liberación de células dendríticas que colaboran en la presentación de antígenos tumorales a la células T, las cuales estimulan la respuesta inmune contra el tumor. Con el objetivo de aumentar dicha respuesta inmune, en el día 1 de la vacuna se administra ciclofosfamida (197). La vacuna también se administró asociada a CRS 207, una forma atenuada de listeria monocytogenes (198). Un estudio fase II randomizado demostró un aumento de la supervivencia de 2 meses en los pacientes tratados con GVAX-ciclofosfamida y CRS-207 respecto a los tratados con GVAX-ciclofosfamida (6 meses vs 4 meses, HR=0.60, p=0.02)(199). El tratamiento fue bien tolerado. El mismo grupo demostró un aumento de la expresión de PD-1, PD-L1 en los tumores tratados previamente con GVAX, lo que sugiere el rol de la combinación de la vacuna GVAX con un inhibidor de los *immune-checkpoints* (200).

Actualmente está reclutando pacientes el estudio ECLIPSE, estudio randomizado que evalúa la eficacia y seguridad de la vacuna (NCT02004262).

Sin embargo, frente a estos resultados positivos, un estudio fase III randomizado con una vacuna con un péptido de la telomerasa en combinación con quimioterapia, falló en demostrar su eficacia en cáncer de páncreas (201).

El rol de las vacunas en el tratamiento del cáncer de páncreas también está siendo evaluado en el contexto del tratamiento adyuvante del cáncer de páncreas en un estudio fase III (NCT01072981).

Viroterapia oncolítica:

La terapia basada en virus se basa en la hipótesis que el virus no puede dañar la célula sana, sin embargo en la célula cancerígena provoca la liberación de GM-CSF hasta provocar la lisis de la célula, liberando GM-CSF, virus y antígenos. GM-CSF provoca la atracción de células dendríticas en la zona de las células tumorales, las cuales presentan los antígenos a las células T. De esta forma las células T tienen la capacidad de identificar los antígenos tumorales y destruir las células cancerígenas a lo largo del cuerpo.

No obstante, Bekaii-Saab presentó en el congreso europeo del año 2014 los resultados negativos de un estudio con carboplatino y paclitaxel en combinación con reolysin (202).

En el momento actual existen estudios clínicos en marcha que testan el papel de los virus en combinación con quimioterapia en cáncer de páncreas.

5. Justificación

El cáncer de páncreas es un problema de salud importante dada la alta mortalidad que presenta, y las perspectivas en la próxima década de convertirse en la segunda causa de muerte por cáncer (5). El motivo de este mal pronóstico está en el hecho de no disponer de programas que permitan un diagnóstico precoz de dicha enfermedad, siendo diagnosticados en forma avanzada en un 80% de los casos. Tampoco disponemos de un tratamiento sistémico claramente efectivo.

Los esfuerzos para conocer la biología molecular del cáncer de páncreas han permitido identificar las mutaciones y otras alteraciones presentes en la mayoría de estos tumores. Las mutaciones más frecuentes en los tumores de páncreas son *KRAS*, *CDKN2A*, *SMAD4* y *TP53* (74). Desafortunadamente, en el momento actual estas alteraciones no son potenciales dianas terapéuticas, y ello ha limitado las armas terapéuticas contra esta enfermedad. Es cierto que se han descrito otras alteraciones sí susceptibles de ser diana terapéutica en los últimos años, pero la frecuencia de las mismas es baja en este tumor (83).

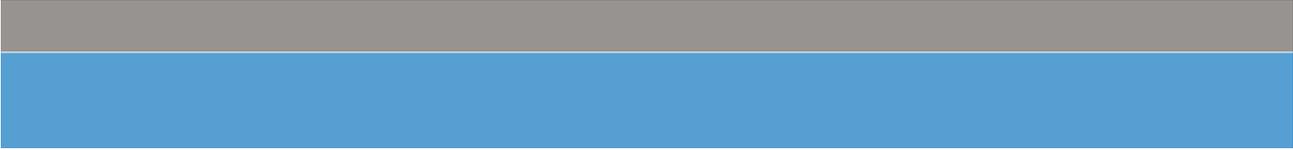
Existe la necesidad de identificar biomarcadores predictivos de respuesta con el objetivo de poder individualizar el tratamiento del cáncer de páncreas y así obtener mejores resultados terapéuticos (4). Algunos de los estudios que están en el momento actual testando nuevas drogas en el cáncer de páncreas, ya van dirigidos a una población determinada que presenta unas características que les hace más susceptible a tener un mayor beneficio terapéutico. El esfuerzo por encontrar biomarcadores pronósticos también será importante para la estratificación de los pacientes y nuevamente para la individualización terapéutica.

En esta tesis doctoral presentamos un estudio de investigación analítico para profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los pacientes con cáncer de páncreas que han sido considerados potenciales candidatos para participar en un estudio en la Unidad de Investigación de Terapia Molecular (UITM) del Hospital Universitari Vall d'Hebron. A esta población se le ha realizado un estudio molecular según la técnica vigente en el centro en cada momento.

El cáncer de páncreas tiene una dificultad añadida para la realización del estudio molecular, que es la dificultad de disponer de una muestra con la cantidad suficiente de células tumorales. Ello también ha sido estudiado en nuestra población, describiendo el fracaso muestral, así como las muestras con mayor rendimiento.

También se ha analizado la relación entre la mutación de *KRAS* y el pronóstico del paciente. En la literatura hay trabajos que apuntan a que los pacientes con mutación de *KRAS* van a presentar un peor pronóstico que los pacientes con *KRAS* nativo (203). Así mismo, está poco descrita la posible influencia de la frecuencia de la fracción del alelo mutado de *KRAS* (*KRAS mutant allele fraction*) en el cáncer de páncreas, hipotetizando que podría existir una heterogeneidad de la población *KRAS* mutada afecta de un cáncer de páncreas.

Finalmente hemos estudiado el beneficio de incluir a los pacientes con cáncer de páncreas que han fracasado al tratamiento estándar en un estudio fase I de nuestro hospital. Obviamente, se trata de una población seleccionada dentro de los pacientes afectados de un cáncer de páncreas, obteniendo supervivencias superiores a la población no seleccionada con cáncer de páncreas. Actualmente las alteraciones moleculares consideradas potenciales dianas terapéuticas presentan una baja frecuencia en este tumor. Nuestro objetivo es poder encontrar dichas alteraciones y ofrecer a estos pacientes un tratamiento dirigido, con el objetivo de aumentar las armas terapéuticas en esta población.



6. Hipótesis

6.1. Principales

1- La mutación de *KRAS* es una alteración frecuente en el cáncer de páncreas y podría conferir un peor pronóstico a esta enfermedad.

2- Existe una necesidad de encontrar potenciales dianas terapéuticas en el cáncer de páncreas, con el objetivo de aumentar las armas terapéuticas para esta enfermedad.

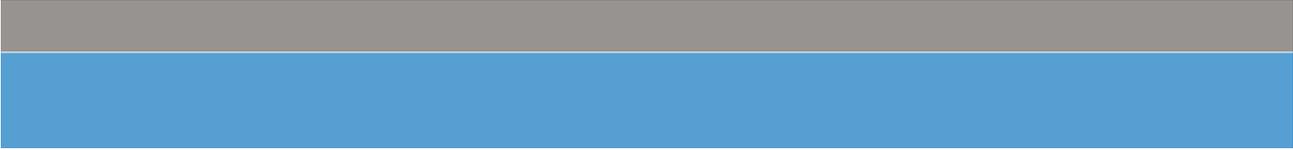
6.2. Secundarias

1- El cáncer de páncreas presenta unas determinadas mutaciones de *KRAS* con mayor frecuencia.

2- Existe una heterogeneidad dentro de los pacientes con un cáncer de páncreas portadores de mutación de *KRAS*, determinada por la frecuencia de la fracción del alelo mutado de *KRAS*.

3- Los pacientes afectos de un cáncer de páncreas que han fracasado a la terapia estándar y participan en un estudio fase I presentan una mayor supervivencia que aquellos que no participan en dichos estudios.

4- Existe una dificultad de disponer de muestras tumorales para el estudio molecular del cáncer de páncreas.



7. Objetivos

7.1. Primarios

- 1- Determinar la incidencia de la mutación de *KRAS* en el cáncer de páncreas y evaluar su impacto pronóstico en nuestra muestra.
- 2- Describir la incidencia de dianas terapéuticas en la muestra analizada.

7.2. Secundarios

- 1-Evaluar la frecuencia de las distintas mutaciones de *KRAS* en nuestra muestra.
- 2- Determinar la frecuencia de la fracción del alelo de *KRAS* y evaluar su impacto pronóstico.
- 3- Evaluar el efecto en supervivencia de la participación en un estudio fase I tras la realización de un estudio molecular en los pacientes con un cáncer de páncreas que han fracasado al tratamiento estándar.
- 4- Evaluar la frecuencia de material no evaluable para el estudio molecular en nuestra muestra, y definir la procedencia del mismo.

8. Métodos

8.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se han incluido 86 pacientes con un cáncer de páncreas metastásico, los cuales fueron considerados candidatos a la realización del estudio molecular sobre el tejido tumoral disponible y posterior inclusión en un estudio fase I dentro de la Unidad de Investigación de Terapia Molecular (UITM) del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

8.2. Selección de la muestra

Para la selección de la muestra se ha utilizado una base de datos generada con los resultados procedentes del programa de *pre-screening* molecular del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Se han seleccionado 86 pacientes con un cáncer de páncreas a los que se les ha realizado un estudio molecular durante el periodo de tiempo comprendido entre Enero del 2011 y Junio del 2015.

8.3. Análisis molecular aplicado a la muestra

Se han analizado las muestras procedentes del tumor primario o de la localización metastásica indistintamente, según disponibilidad.

Las muestras tumorales fijadas en parafina fueron analizadas para encontrar alteraciones moleculares específicas. El consentimiento informado fue obtenido antes de realizar el análisis molecular.

Desde Enero del 2011 hasta Junio del 2014 las muestras fueron analizadas mediante espectrometría de masas (MassARRAY Sequenom®). Desde Junio del 2014 hasta el momento actual la técnica utilizada ha sido un panel de *Next Generation Sequencing* (Amplicon-seq), mediante Illumina MySeq®.

El análisis molecular que se ha llevado a cabo mediante Sequenom MassARRAY®, ha sido utilizando la OncoCarta versión 1.0, y mediante Amplicon-Seq, una plataforma de NGS, usando una OncoCarta realizada por el Instituto de

Oncología Vall d'Hebron (VHIO), la VHIO-Card versión 1.0 (204, 205). Con ambos métodos se pueden analizar mutaciones *hotspots* bien establecidas en múltiples genes.

La OncoCarta versión 1.0 analiza 238 mutaciones en 19 genes. Además, junto con esta OncoCarta se ha utilizado un panel propio generado en nuestro centro que ha permitido ampliar la detección a 288 mutaciones localizadas en 24 oncogenes, con una sensibilidad que va del 10 al 15%.

Por el contrario, la VHIO-Card versión 1.0 es capaz de analizar un mayor número de mutaciones, hasta más de 50.000 posiciones en el genoma en 59 oncogenes y supresores tumorales, con una sensibilidad que va del 1 al 3%.

Tabla con la carta de genes determinada por la técnica de Sequenom

AKT1	ERBB2	IDH2
AKT2	ERBB3	KRAS
AKT3	GNAQ	MET
BRAF	GNAS	NRAS
EGFR	IDH1	PIK3CA

Panel incluido en el análisis de next generation sequencing

ABL1	ERBB3	IDH1	MYC	RNF43
AKT1	ESR1	IDH2	NF2	RUNX1
AKT2	FBXW7	JAK1	NOTCH1	SMAD4
AKT3	FGFR1	JAK3	NOTCH4	SMARCB1
ALK	FGFR2	KIT	NRAS	SRC
APC	FGFR3	KRAS	PDGFRA	STK11
BRAF	FGFR4	MAG	PIK3CA	TP53
CDH1	FLT3	MAP2K1	PIK3R1	VHL
CDKN2A	GATA1	MET	PIK3R5	ZNRF3
CSF1R	GNA11	MLH1	PTCH1	
CTNNB1	GNAQ	MPL	PTEN	
EGFR	GNAS	MSH6	RB1	
ERBB2	HRAS	MTOR	RET	

PTEN se determinó por inmunohistoquímica, mediante un anticuerpo acreditado (clon 138G6). Una muestra se consideraba con pérdida de PTEN si el H-score era menor del 50.

8.4. Variables clínico-patológicas recogidas

Se han recogido las siguientes variables clínicas: el sexo, la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico, el estadiaje al diagnóstico de la enfermedad según clasificación TNM, la fecha de las metástasis, la localización de las metástasis, terapia oncológica aplicada (número de líneas de tratamiento), procedencia de la muestra (primario *versus* metástasis), inclusión en un estudio fase I (si/no), tipo de tratamiento recibido en el estudio fase I, respuesta obtenida dentro del estudio fase I, tiempo de permanencia dentro del estudio fase I, motivo de la discontinuación del estudio fase I, supervivencia desde el diagnóstico de las metástasis, supervivencia desde la participación en un fase I, supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento, fecha de la defunción en caso de que el paciente haya fallecido.

8.5. Análisis estadístico

Todos los análisis descriptivos y correlativos se realizaron utilizando el software estadístico R versión 3.1.1.

Para los análisis de supervivencia, se realizó riesgos proporcionales de Cox modelar usando la supervivencia paquete R. Los valores de p corresponden a log-rank test.

Las variables que estudiamos fueron:

- Mutación de *KRAS*: Si o no (estratificando por el test diagnóstico Amplicon o Sequenom).
- Participación en un fase I: Si o no.
- Terapia dirigida: Si o no.
- Alta carga de *KRAS* o baja carga de *KRAS*.

La supervivencia global se considera el tiempo transcurrido desde el momento en que se diagnostican las metástasis hasta la fecha de muerte.

El tiempo de permanencia dentro de un estudio fase I se considera el tiempo transcurrido desde la inclusión del paciente en un estudio fase I hasta la salida del mismo, independientemente del motivo que haya motivado la salida.

La supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento, tiene el objetivo de definir mejor el beneficio en la participación en un estudio fase I por parte del paciente, dado que se excluye a la supervivencia global del paciente el tiempo que el enfermo ha permanecido en la única terapia que tiene una eficacia demostrada e impacto en supervivencia.

9. Resultados

9.1. Características basales de la población del estudio

En el trabajo se han incluido 86 pacientes con un cáncer de páncreas metastásico en los que se les ha realizado un estudio molecular (Sequenom o Amplicon-seq) entre el año 2011 y 2015.

La media de edad de los 86 pacientes incluidos fue de 59.3 años (rango de 29-78), de los cuales 55 fueron hombres y 31 fueron mujeres, 42 pacientes fueron diagnosticados con un estadio IV, 2 en forma de enfermedad localmente avanzada y 42 pacientes fueron sometidos a una cirugía radical inicialmente. La localización de las metástasis en el momento del diagnóstico del estadio IV fueron: hígado (54), ganglionar (19), pulmón (15), peritoneal (18), y otras (huesos, adrenal, pleural) (3). El número de metástasis al diagnóstico del estadio IV fueron: una localización en 64 pacientes, dos localizaciones en 20 pacientes y 3 o superior en 2 pacientes. El número de líneas de tratamiento recibido previo al análisis molecular tiene una media de 1.8 en nuestra muestra (mediana 2)(rango 0-5). En 64 pacientes las muestras eran procedentes del tumor primario y en 22 pacientes las muestras procedían de una localización metastásica. Se analizaron las muestras mediante Sequenom en 35 pacientes y mediante Amplicon-seq en 26 pacientes. En 25 pacientes no se pudo analizar la muestra por no existir material suficiente para el estudio molecular.

Tabla con las características de los pacientes:

Sexo	Hombre Mujer	55 (64%) 31 (36%)
Edad	61.3 años (mediana)	(rango 29-78)

Estadio al diagnóstico	Localizado	42 (49%)
	Localmente avanzado	2 (2%)
	Metastásico	42 (49%)
Sitio de la metástasis a la progresión	Hígado	54
	Ganglionar	19
	Pulmón	15
	Peritoneal	18
	Otros	3
Líneas de tratamiento previas	0	11%
	1	29%
	2	36%
	3+	24%

Técnica	Sequenom	35 (40%)
	Amplicon	26 (30%)
	No material suficiente	25 (30%)
Perfil de tejido	Primario	64 (75%)
	Metastásico	22 (25%)

9.2. Incidencia de la mutación de *KRAS* en la muestra analizada

61 muestras procedentes de pacientes fueron analizadas para la mutación de *KRAS*.

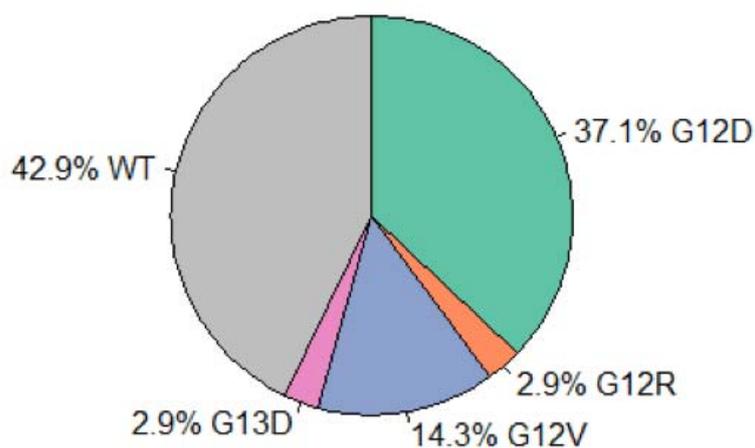
35 fueron analizadas mediante Sequenom y 26 fueron analizadas mediante Amplicon-Seq.

Las mutaciones de *KRAS* encontradas con mayor frecuencia fueron G12D (62%) y G12V (26%), a pesar que también se encontraron otras alteraciones con menor frecuencia como G12R, y G13D. Un 31 % resultaron *KRAS* nativos.

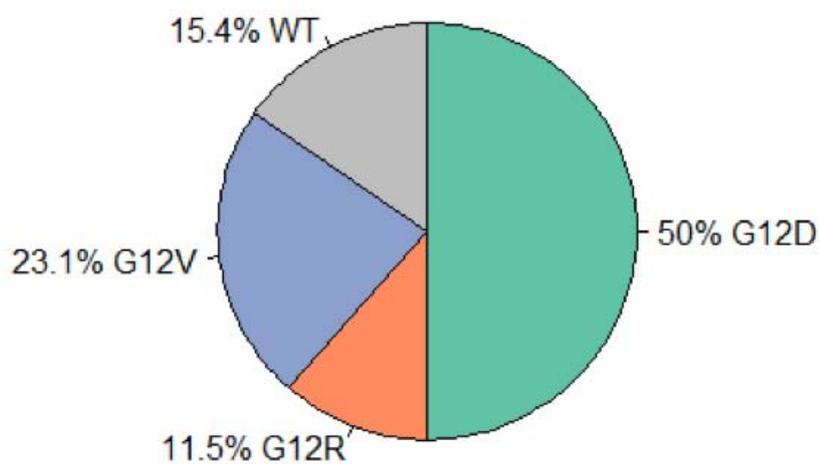
KRAS status	Wild type	19 (31%)
	Mutated:	42 (68.8%)
	G12D	26 (62%)
	G12V	11 (26%)
	G12R	4 (10%)
	G13D	1 (2%)

Con las dos técnicas se identificaron G12D y G12V como las mutaciones de *KRAS* más frecuentes.

Mutaciones de *KRAS* determinadas por Sequenom



Mutaciones de *KRAS* determinadas por Amplicon-seq



Cuando miramos la incidencia de la mutación de *KRAS* según la técnica, vemos que la incidencia de *KRAS* es mayor cuando se determina por Amplicon-seq (85% si se determina por Amplicon-seq y 57% si se determina por Sequenom), atribuyendo este hecho a un factor de sensibilidad de la técnica.

	Sequenom	Amplicon-seq
Nativo	15 (43%)	4 (15%)
Mutado	20 (57%)	22 (85%)

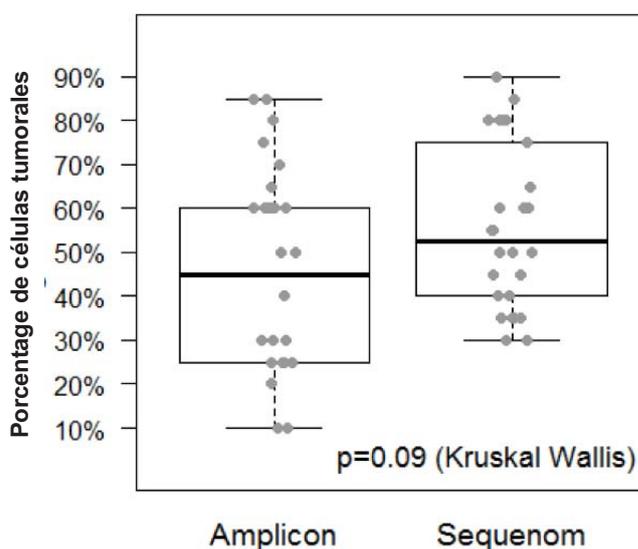
Cuando analizamos la diferencia en la incidencia de *KRAS* según la técnica utilizada para el análisis, resulta estadísticamente significativa, con un valor de la p de 0.0273.

Con el objetivo de descartar la pureza de la muestra tumoral como posible factor de confusión en las diferencias en la incidencia de la mutación de *KRAS* en las dos técnicas exploradas, ajustamos los resultados de la mutación de *KRAS* por la pureza del tumor.

La media de la pureza tumoral en las muestras analizadas por Amplicon-seq fue de 0.45 (mediana 0.45)(rango 0.1-0.85). Con la técnica de Sequenom la media de la pureza tumoral fue de 0.55 (mediana 0.52)(rango 0.3-0.9). La p según el análisis de Kruskal-Wallis fue de 0.9.

Una vez ajustada la incidencia de la mutación de *KRAS* por la pureza del tumor, sigue existiendo una diferencia en la incidencia de la mutación de *KRAS* atribuible a la sensibilidad de la técnica y no a la pureza de la muestra tumoral.

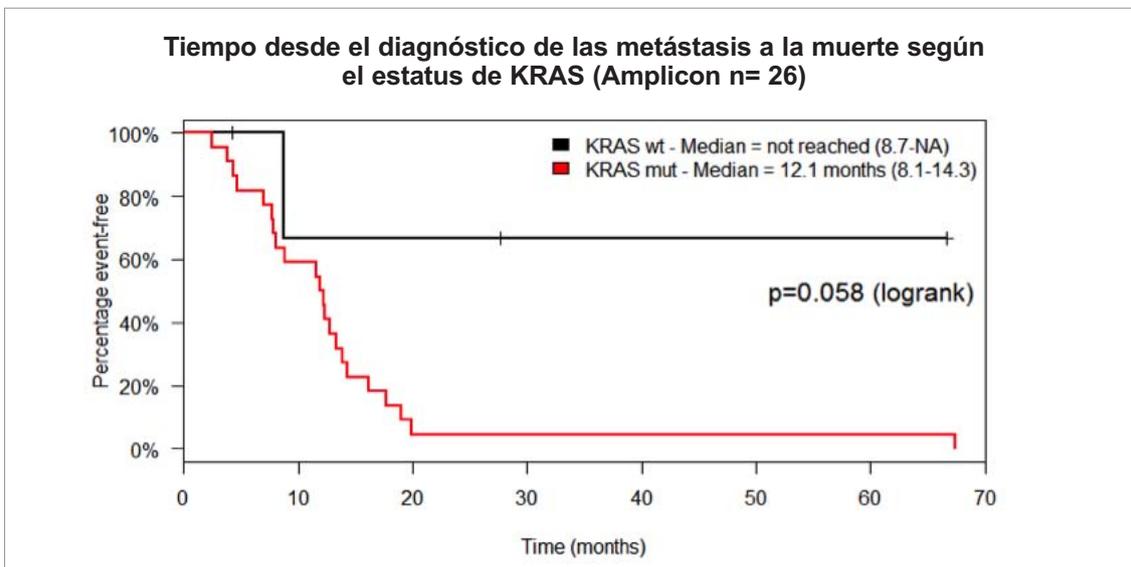
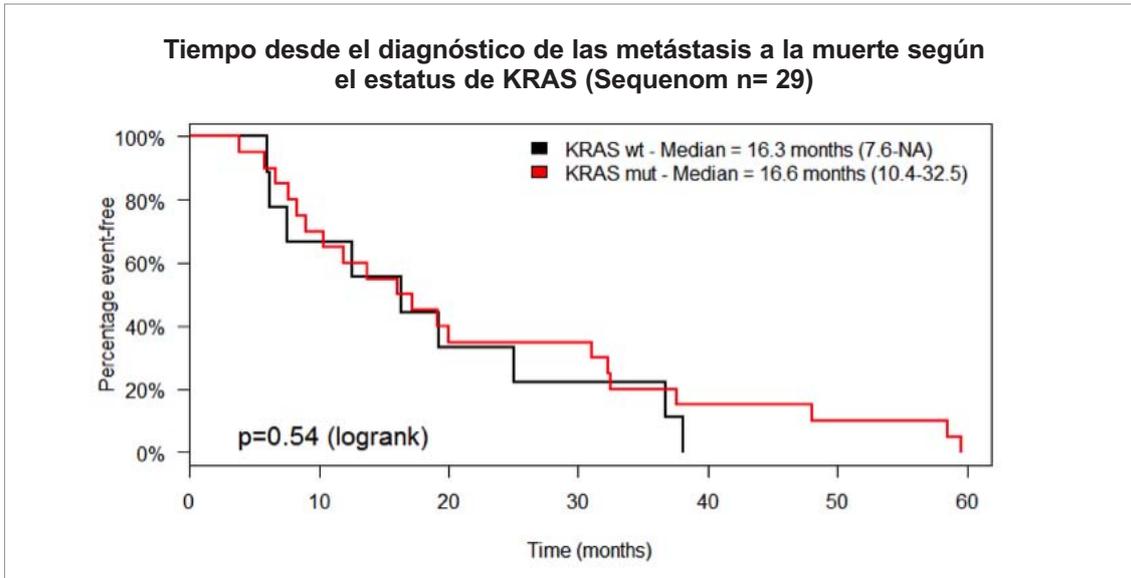
Pureza del tumor determinada por el patólogo



9.3. Factor pronóstico de la mutación de *KRAS*

Se determinó la supervivencia de los pacientes incluidos en la muestra desde el momento del diagnóstico del estadio IV hasta la muerte. Comparamos la población con mutación de *KRAS* respecto los pacientes con *KRAS* nativo.

Posteriormente, se dividió la muestra según la técnica utilizada para la determinación de *KRAS*, dada la diferente sensibilidad para detectar la mutación en *KRAS* de las dos técnicas utilizadas.



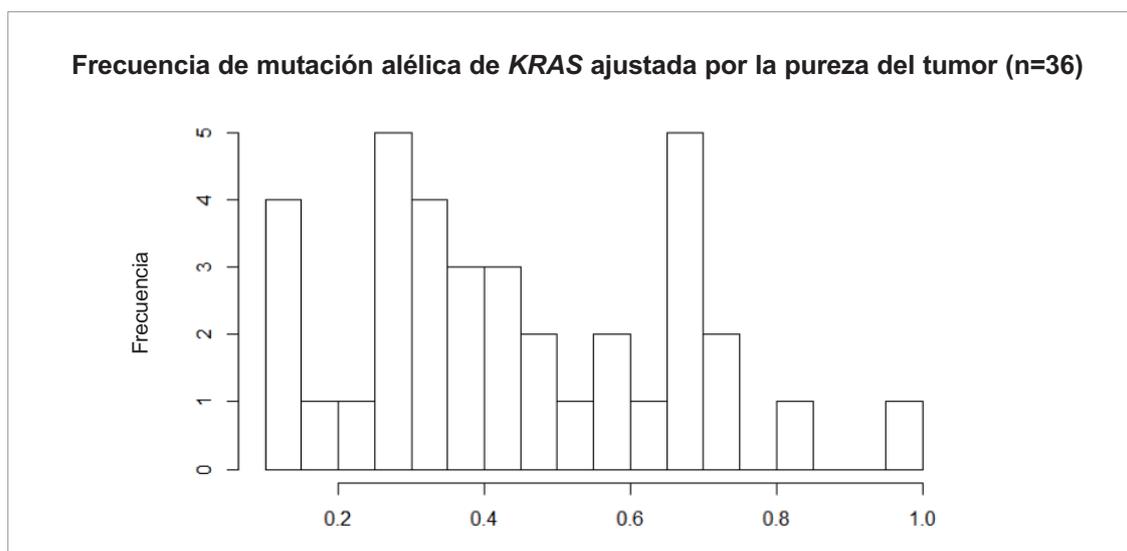
Las diferencias en supervivencia son mayores en el grupo analizado por Amplicon-seq, debido a que la tasa de falsos negativos es menor. Las diferencias rozan la significación estadística, probablemente debido a la limitación del tamaño muestral (26 pacientes). Los pacientes con *KRAS* mutado tienen una supervivencia de 12.1 meses, respecto a los pacientes con *KRAS* nativo en los que la supervivencia no se alcanzó en el momento del análisis, $p=0.58$.

Con la técnica de Sequenom los pacientes *KRAS* mutado tiene una supervivencia de 16.6 meses, y los pacientes con *KRAS* nativo tienen una supervivencia de 16.3 meses, $p=0.54$ (29 pacientes). Las diferencias en la supervivencia son menores en el grupo analizado por Sequenom debido a una mayor tasa de falsos negativos. Existe un grupo de pacientes con *KRAS* mutado falsamente clasificado como *KRAS* nativo.

9.4. Frecuencia de la fracción del alelo de *KRAS*

En este trabajo se estudia la posibilidad de que en el cáncer de páncreas no exista una población homogénea dentro de los pacientes con *KRAS* mutado. Si bien es cierto que está bien establecido que la mutación más frecuentemente encontrada en el cáncer de páncreas es la G12D y G12V, no está descrito en la literatura el papel de la frecuencia de la fracción del alelo de *KRAS* (*KRAS mutant allele fraction*).

En nuestra serie 0.44 es la media y 0.41 es la mediana de frecuencia de fracción del alelo de *KRAS* mutado (rango 0.1-1.0). La distribución de la frecuencia de la fracción del alelo de *KRAS* es heterogénea en la muestra, como muestra el gráfico. Esta distribución se obtuvo tras ajustar los datos de la frecuencia de la fracción del alelo de *KRAS* por la pureza tumoral.



Con este gráfico se insinúa que la población de cáncer de páncreas con *KRAS* mutado puede ser heterogénea. No obstante, debido a el bajo número de muestras en nuestra serie, no podemos establecer un punto de cohorte y considerar los pacientes con alta o baja carga de *KRAS*. Consideramos necesario seguir investigando en este sentido.

Por el mismo motivo del tamaño muestral, no podemos considerar esta variable como pronóstica.

9.5. Incidencia de otras alteraciones moleculares en la muestra analizada

En la muestra analizada se determinó pérdida de PTEN en 13/22 muestras, encontrándose 4/22 pacientes con pérdida de PTEN.

Así mismo se encontraron otros eventos mutacionales como los siguientes:

RNF43 H427fs en 1 paciente, *BRAF G469A* en 1 paciente, *BRAF V600E* en 1 paciente, *CDKN2A* mutado en 2 pacientes, y *STK11* mutado en 1 paciente.

Las mutaciones potencialmente diana terapéutica que se encontraron según la técnica utilizada fueron los siguientes:

Numero de mutaciones por tecnica	Amplicon-seq	Sequenom
0	3	14
1	20	21
2	3	0

Como se puede apreciar, las dos técnicas presentan diferente capacidad para detectar mutaciones en las muestra analizadas. Cuando utilizamos la técnica de Amplicon-seq existen más pacientes a los que encontramos 2 mutaciones, y con la técnica de Sequenom existen más muestras en las que no encontramos ninguna mutación (Fisher test p-value = 0.00811).

9.6. Impacto de la muestra utilizada para el análisis y descripción del momento en la historia oncológica en el que se realiza el estudio molecular

La mayoría de las muestras analizadas provenían del tumor primario (64 muestras), mientras que las muestras procedentes de la localización metastásica eran menos (22 muestras).

La dificultad para obtener material tumoral para el análisis molecular en el cáncer de páncreas es un hecho descrito a lo largo de la literatura. En nuestra serie el porcentaje de material insuficiente para el análisis era superior en las muestras que provenían de localización metastásica. Y ello se reproducía de forma independiente a la técnica utilizada para el análisis molecular (Fisher test p-value = 0.009427).

	Amplicon-seq	Sequenom	No suficiente material
Localización metastásica	6	4	12
Localización primaria	20	29	13

Los pacientes que solo disponían de material metastásico tenían mayores probabilidades de que la muestra tumoral resultara insuficiente o de escasa calidad para el análisis molecular.

A través de los años se observa como el análisis molecular se determina antes a lo largo de la historia oncológica del paciente, y ello se puede apreciar en la tabla en que se determina el número de líneas previas de tratamiento realizadas por el paciente antes del estudio molecular.

En el año 2011 solo 3 pacientes habían recibido una línea previa de tratamiento previa al análisis molecular y 3 pacientes había recibido dos líneas. En el año 2015, 14 enfermos fueron sometidos al análisis molecular tras solo una línea de tratamiento oncológico.

Año	Número de líneas de tratamiento previo al análisis molecular	
	0-1	2 +
2011	2	3
2012	7	13
2013	5	14
2014	2	12
2015	14	14

9.7. Descripción de la población que participó en un estudio fase I como parte de su tratamiento

Del total de pacientes incluidos en el estudio, 30 fueron tratados dentro de un estudio fase I, 20 en terapia no dirigida y 10 en terapia dirigida.

Tabla con los pacientes incluidos en la terapia dirigida:

Tipo de tratamiento	N	Alteración molecular
HDM2	1	TP53 nativo
mTOR/PI3K	1	Pérdida de PTEN
PDL1	1	Alta expresión PDL1
PI3K	2	Pérdida de PTEN
QTA + PI3K	2	Pérdida de PTEN
PI3K + inhib MEK	2	KRAS mutado

De todos los pacientes incluidos solo se reportó una respuesta parcial en un paciente, 14 pacientes presentaron una progresión como mejor respuesta y 13 una estabilización, 2 pacientes no fueron evaluables para la respuesta del tratamiento.

Cuando dividimos los estudios en dirigidos o no dirigidos a una diana terapéutica, las respuestas son las siguientes:

-Terapia dirigida: 5 pacientes progresaron, 1 presentó una respuesta parcial y 4 presentaron una estabilización.

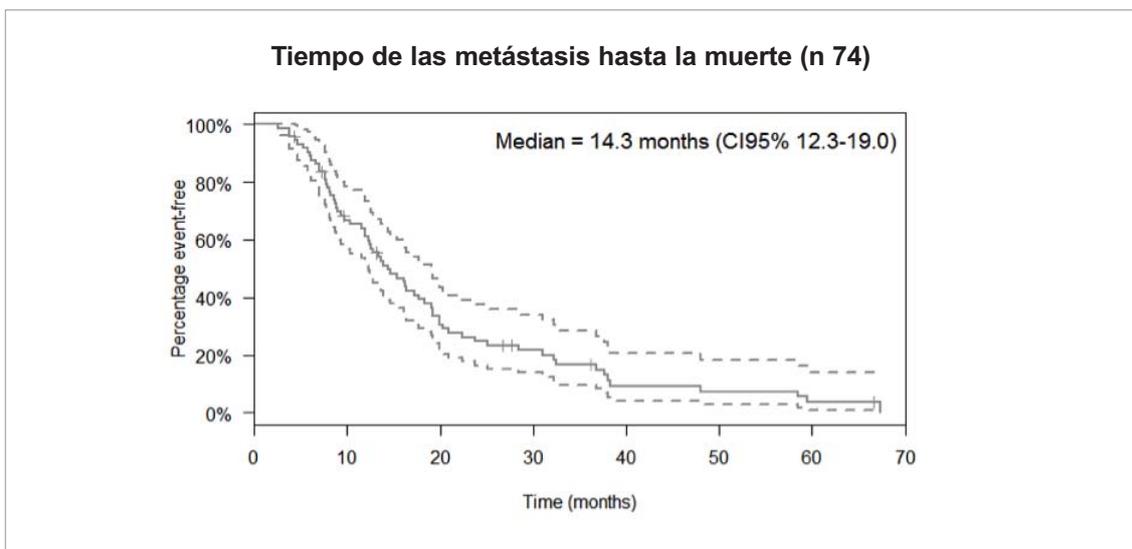
El paciente que presentó una respuesta parcial fue tratado con un inhibidor de PI3K en combinación con quimioterapia basada en taxanos. De los pacientes que presentaron una estabilización, 2 se trataron con un inhibidor de PI3K y quimioterapia, uno con un inhibidor de PI3K, y una con un inhibidor de PI3K en combinación con un inhibidor de MEK.

-No terapia dirigida: 9 pacientes progresaron y 9 presentaron una estabilización.

De los pacientes que presentaron estabilización como mejor respuesta, 6 fueron tratados con quimioterapia (uno en combinación con un inhibidor de CCL2, y otro en combinación con un inhibidor de TGF-beta), 2 se trataron con un inhibidor de Hedgehog y uno con un inhibidor de *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR).

9.8. Supervivencia de los pacientes incluidos en la muestra

La supervivencia de la población de la muestra fue de 14.3 meses (IC 95%:12.3-19).

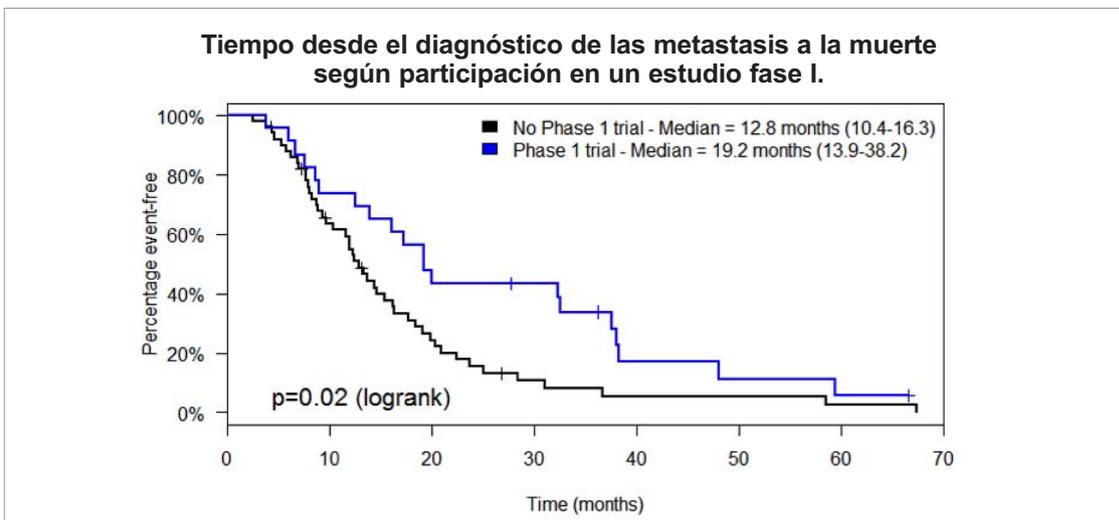


La supervivencia reportada en nuestra muestra es superior a la reportada en los estudios pivotaes. El motivo es la selección de la muestra. El paciente con un cáncer de páncreas que ha progresado a un tratamiento estándar y persiste con un estado general que permite la posibilidad de ser incluido en un estudio fase I define una población con una supervivencia mayor a la población general con un cáncer de páncreas.

9.9. Supervivencia de los pacientes de la muestra incluidos en estudios fase I

Los pacientes que se incluyeron en un estudio fase I presentaron una supervivencia mayor que aquellos que no participaron en el mismo.

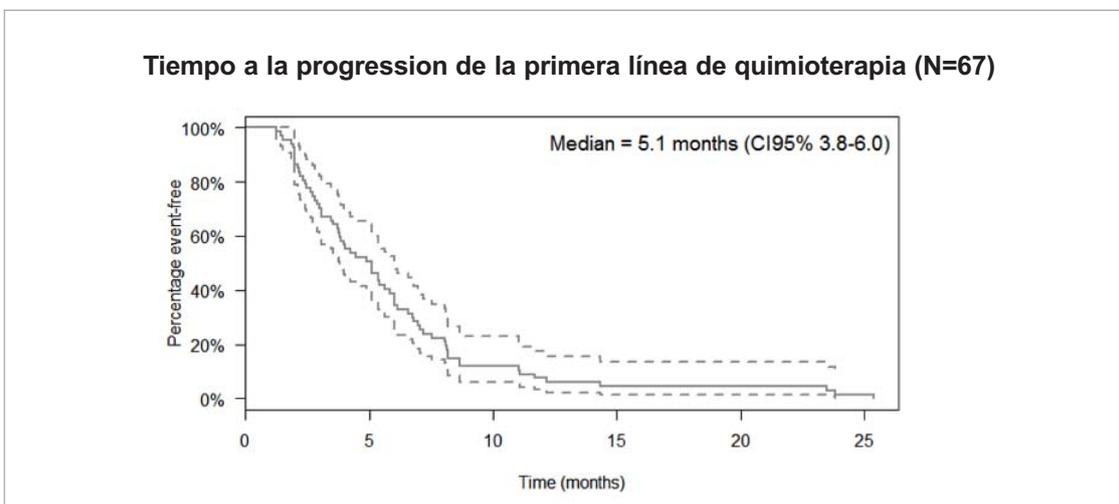
La supervivencia fue de 19.2 meses en los pacientes que sí se incluyeron en un estudio fase I respecto 12.8 meses en el grupo que no participó en un estudio, p=0.02.



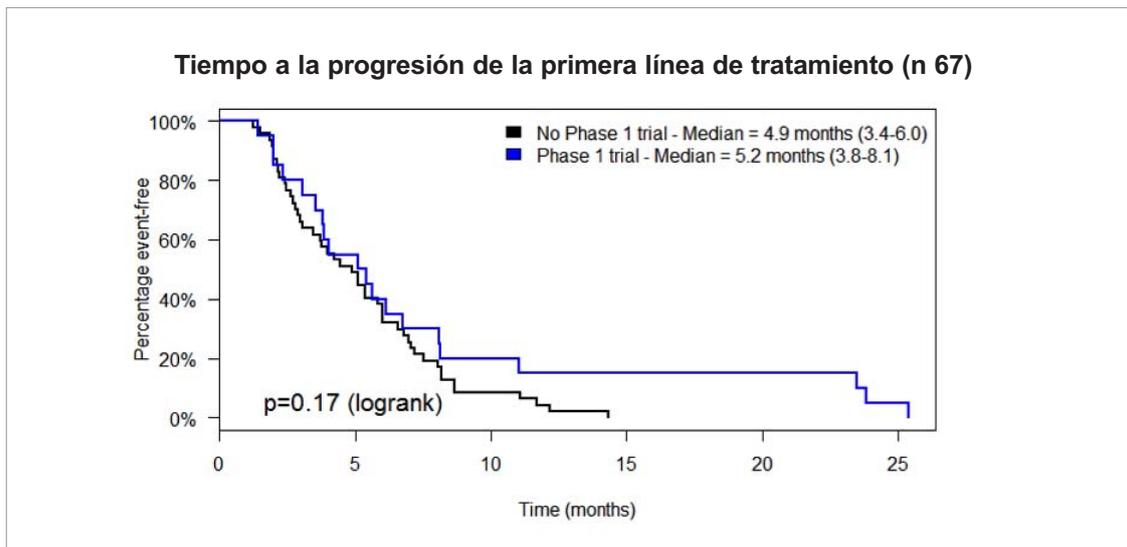
9.10. Supervivencia desde la fecha de progresión a la primera línea de tratamiento

Con el objetivo de eliminar el efecto en la supervivencia global del único tratamiento que ha demostrado impacto en la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas, calculamos la supervivencia desde el fracaso de la primera línea de tratamiento hasta la muerte.

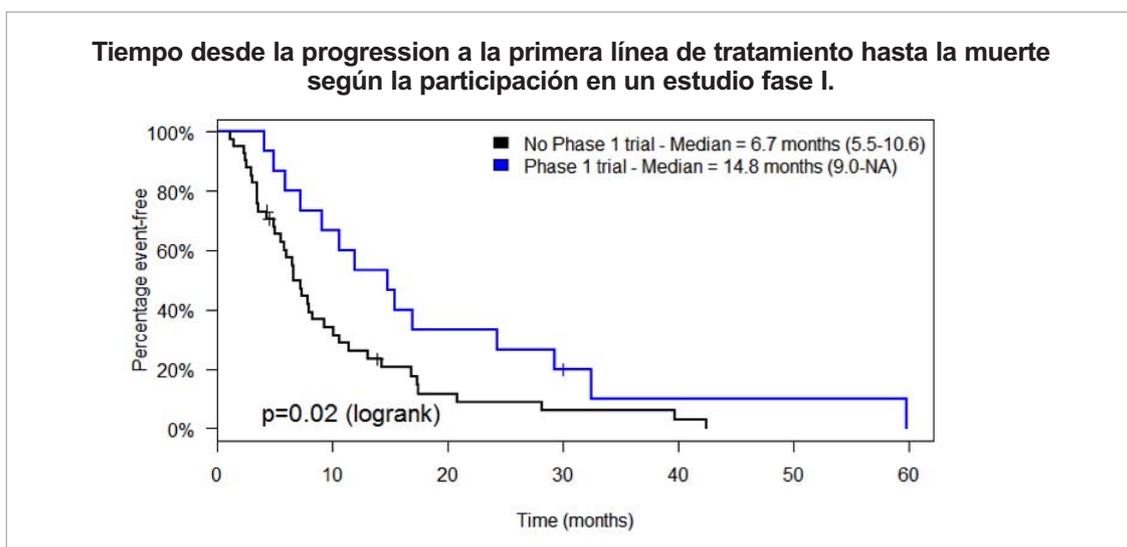
Tanto los pacientes que participaron en un estudio fase I como los que no lo hicieron, presentaron una supervivencia libre de progresión en la primera línea de tratamiento similar, con una mediana de 5.1 meses (IC 95% 3.8-6.0).



La diferencia entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa: 4.9 meses en los pacientes que no participaron en un fase I respecto 5.2 meses en aquellos que sí participaron ($p=0.17$).



Cuando analizamos la supervivencia desde el fracaso de la primera línea hasta la muerte, las diferencias entre ambos grupos sí son estadísticamente significativas. La supervivencia fue de 6.7 meses en el grupo que no se incluyó en un estudio fase I y de 14.8 meses en la población que participó en un estudio fase I. La diferencia fue estadísticamente significativa, $p=0.02$.



Una vez eliminado el efecto de la primera línea en la supervivencia, los pacientes que participan en un estudio fase I presentan una supervivencia estadísticamente superior al grupo no tratado dentro de un estudio fase I.

10. Discusión

En el análisis de este trabajo debemos tener presente la limitación en cuanto al carácter retrospectivo del mismo, entendiendo la dificultad que ello supone para la homogeneización de la muestra.

El número de muestras de las que se disponen para el análisis es limitado, en gran parte por la dificultad de disponer de muestras de calidad suficiente para realizar un estudio molecular en el cáncer de páncreas.

Nuestra muestra es una población seleccionada de pacientes afectados de cáncer de páncreas, dado que están excluidos del análisis los pacientes cuya evolución no permite realizar un análisis molecular, y se centra en pacientes que tras progresar a la terapia estándar, mantiene un estado general que permite proponer su participación en un estudio clínico y el análisis molecular de la muestra con el objetivo de conocer mejor la biología del tumor y valorar una terapia dirigida.

Los puntos analizados en nuestra serie permiten concluir que los pacientes afectados de un cáncer de páncreas se pueden beneficiar de participar en un estudio fase I. Nuestra intención es ofrecer cada día más dicha posibilidad a los pacientes con un cáncer de páncreas. A pesar de la dificultad en encontrar potenciales dianas terapéuticas, existen en la literatura y en nuestra serie respuestas a dichos tratamientos diana, y con ellos podemos aumentar las armas terapéuticas para luchar contra esta enfermedad.

10.1. *KRAS* y cáncer de páncreas

Nuestro análisis confirma la alta prevalencia de *KRAS* mutado en el cáncer de páncreas, estando presente en el 85% de pacientes si se determina con la técnica de Amplicon-seq y en el 57% de pacientes si se determina por Sequenom.

También se confirma que las mutaciones de *KRAS* más frecuentes en cáncer de páncreas son las mutaciones en G12V y G12D, tal y como está descrito en la literatura (4). No obstante, no se excluye la posibilidad de otras mutaciones con mucha menor frecuencia, habiéndose encontrado en nuestra serie mutaciones en G12R, y G13D. Debido a su baja frecuencia no se puede concluir las implicaciones de estas mutaciones diferentes de G12V y G12D en el cáncer de páncreas. En la literatura la mutación más frecuentemente descrita es la del codón 12, pero también se han descrito mutaciones en el codón 13 y en el codón 61 (197).

En nuestra serie la mutación de *KRAS* apunta a ser un factor pronóstico, destacando la menor supervivencia en aquellos pacientes con *KRAS* mutado respecto a los pacientes con *KRAS* nativo. No obstante, creemos que el tamaño muestral es una limitación para la significación estadística del resultado.

Así, destacamos la importancia de la sensibilidad de la técnica para poder determinar la población real con *KRAS* mutado. Al analizar los datos de los tumores analizados con la técnica de Sequenom, existe una alta tasa de falsos negativos, siendo menor el porcentaje de pacientes clasificados como *KRAS* mutado que los porcentajes descritos en la literatura. Además cuando comparamos las curvas de supervivencia entre los pacientes *KRAS* mutados y los pacientes con *KRAS* nativo, las diferencias son menores que con la técnica de Amplicon-seq. Ello es debido a que estamos clasificando como *KRAS* nativos a pacientes que tienen la mutación de *KRAS*, porque la técnica no tiene la sensibilidad suficiente para detectarlo.

El posible factor pronóstico de *KRAS* ha sido discutido ampliamente en la literatura, sin embargo la sensibilidad de las diferentes técnicas para detectar la mutación ha sido una limitación en la conclusión del valor pronóstico de *KRAS* en el cáncer de páncreas. No obstante, dado que en el momento actual disponemos de técnicas con mayor sensibilidad, debemos seguir investigando en esta línea.

Existe un concepto poco explorado hasta el momento actual en la literatura, la frecuencia de la fracción del alelo mutado de *KRAS*. En nuestra serie descubrimos que no todos los pacientes tienen la misma frecuencia de mutación del gen. Para hacer un análisis más puro se ha ajustado la frecuencia del alelo mutado encontrado por la pureza tumoral. Una vez realizado el ajuste, se define una población heterogénea dentro de la población con mutación de *KRAS*. Sin embargo, la heterogeneidad de la muestra por el bajo tamaño muestral no permite dicotimizar o poner un punto de cohorte que para dividir la población en alta o baja carga de *KRAS*.

Creemos importante seguir investigando este concepto en el cáncer de páncreas, dado que podría tener un papel pronóstico y predictivo.

En cuanto a las implicaciones terapéuticas, en el momento actual todos los intentos de utilizar *KRAS* o sus efectores como diana terapéutica han fracasado. En el estudio presentado por H. Riess en el congreso americano del 2014 donde los pacientes con un cáncer de páncreas fueron tratados con gemcitabina más refametinib, un inhibidor de MEK, los resultados reportados fueron negativos. No obstante, se hallaron dos hechos importantes: se apuntaba que los pacientes con *KRAS* nativo presentaban mejor respuesta al tratamiento, lo cual diferencia la población *KRAS* mutada de la población *KRAS* nativa en la respuesta a un fármaco que utiliza esta vía como diana, y en segundo lugar introduce el concepto que la fracción del alelo mutado puede influir en la respuesta al tratamiento con refametinib (142).

En el intento de poder clasificar el cáncer de páncreas según los hallazgos moleculares, según la clasificación de Collison (78), en el subtipo clásico se encontrarían los tumores con mayor implicación de la vía de *KRAS*, y por tanto sería el grupo en el que los fármacos dirigidos contra dicha vía tendrían mayores posibilidades de eficacia. El mismo grupo testa la eficacia de erlotinib en los diferentes subtipos, y es el subtipo clásico el que presenta mayor respuesta al mismo. Así, erlotinib que ha demostrado un efecto modesto en la población general de cáncer de páncreas, podría ser efectivo en un subgrupo molecular determinado.

En el análisis molecular del estudio canadiense, no se encontró ningún factor predictivo, no obstante, los pacientes con *KRAS* nativo tenían una tendencia a obtener un mayor beneficio al ser tratados con erlotinib. El tamaño muestral era limitado, y ello no permitió obtener mejores resultados (139).

10.2. Otras alteraciones moleculares en cáncer de páncreas

El análisis molecular realizado en las muestras tumorales de nuestro trabajo ha permitido poner de manifiesto alteraciones moleculares menos frecuentes en el cáncer de páncreas pero potencialmente dianas terapéuticas, como sería el caso de *RNF43* y los tratamientos contra la vía de Wnt.

Existe en el momento actual el ejemplo de los pacientes con cáncer de páncreas y mutación en los genes reparadores del DNA. Ésta es una alteración con una frecuencia que oscila entre el 4-8% de los tumores de páncreas. No obstante, es una población que se beneficia del tratamiento con platinos y con inhibidores del PARP. A pesar de su baja frecuencia es una población diferente a nivel terapéutico, y por tanto debemos sumar esfuerzos para identificarla.

Cabe destacar el carácter dinámico de los hallazgos moleculares potencialmente tratables a medida que aparecen nuevos tratamientos y que vamos profundizando en el estudio molecular del cáncer de páncreas.

Nuevamente destacamos la importancia de utilizar técnicas con la sensibilidad necesaria para determinar estas mutaciones, para evitar los falsos negativos. Nuestra experiencia es que con la técnica Sequenom no éramos capaces de detectar la mayoría de estas mutaciones frecuentes en el cáncer de páncreas y descritas en la literatura. Actualmente disponemos de técnicas con mayor sensibilidad que permiten diagnosticar con mayor frecuencia alteraciones moleculares en este tumor.

10.3. Muestra tumoral para estudio molecular en cáncer de páncreas

Nuestro análisis pone de manifiesto la dificultad de disponer de una muestra tumoral óptima para el estudio molecular en el cáncer de páncreas. Del global de las 86 muestras con intención de análisis, existían 25 muestras sin material suficiente para el análisis, las cuales en su mayor parte procedían de muestras metastásicas (de localización hepática en su mayor número).

El motivo es la alta carga estromal y de necrosis en las muestras obtenidas, y el bajo porcentaje de células tumorales, insuficientes para el estudio molecular. Por otro lado existe una dificultad de obtener material procedente del tumor primario a no ser que exista el antecedente de una pancreatectomía.

Ello ha dificultado la búsqueda de biomarcadores en cáncer de páncreas. La mayoría de los estudios con nuevas drogas no disponen de material de tejido tumoral para el estudio de biomarcadores, o el número de muestras es escaso. El estudio molecular permitiría identificar subtipos moleculares que se puedan beneficiar de tratamientos ineficaces para el global de la población. Es el caso del erlotinib, en el que el análisis molecular asociado al resultado modestamente positivo del estudio, ha sido pobre y no ha dado ninguna luz sobre los pacientes que se pueden beneficiar de este fármaco (139).

Uno de los marcadores más prometedores en cáncer de páncreas ha sido SPARC. En el estudio fase I/II que testaba gemcitabina y *nab*-paclitaxel, parecía tener un valor predictivo. Este hecho no se confirmó en el estudio fase III regulatorio, en el cual se analizó el SPARC estromal en 256 muestras de los 861 pacientes incluidos en el estudio. SPARC no demostró ser un biomarcador predictivo ni pronóstico (150).

A falta de los datos del TCGA en páncreas, el estudio molecular más completo realizado hasta el momento en cáncer de páncreas ha sido llevado por el grupo australiano. En este estudio se clasifica el cáncer de páncreas en cuatro subtipos basándose en los hallazgos moleculares, y destacan los autores un subtipo especialmente enriquecido en alteraciones de los genes de reparación del DNA. Destacan la importancia de conocer este concepto dado que estos pacientes son especialmente sensibles a la quimioterapia basada en platino y a los inhibidores del PARP. Con ello podríamos individualizar el tratamiento y con ello garantizar mayor eficacia terapéutica (83).

De nuestra experiencia en el análisis destacamos la importancia de realizar el estudio molecular de forma precoz en la enfermedad, ya que en caso de encontrar una mutación potencialmente diana terapéutica se debe plantear precozmente en el plan terapéutico del paciente.

En los estudios actualmente en marcha que testan nuevas drogas contra el cáncer de páncreas, algunos van dirigidos a poblaciones determinadas, con el objetivo de aumentar el rendimiento terapéutico. Es el caso de PEGPH20, una hialuronidasa pegilada que ha demostrado su eficacia de forma preliminar en los pacientes afectos de un cáncer de páncreas con alta expresión de ácido hialurónico en el tumor. El estudio requiere un esfuerzo importante de que el paciente disponga de muestra tumoral para poder determinar el posible marcador de respuesta, el ácido hialurónico.

Otro intento de encontrar un biomarcador predictivo es la PCR en los estudios con inhibidores de JAK1/2. Dichos estudios seleccionan la población a tratar por la PCR alta.

Frente a esta dificultad de disponer de tejido tumoral, el análisis molecular en sangre periférica, el concepto de biopsia líquida, es de especial importancia en el cáncer de páncreas. Debemos invertir esfuerzos y recursos en profundizar en su estudio.

10.4. Inclusión en estudios fase I pacientes con cáncer de páncreas

En nuestra población seleccionada vemos como la participación en un estudio fase I confiere a los pacientes una mayor supervivencia que el hecho de no participar en ellos.

Al tratarse de una población seleccionada, la supervivencia obtenida en nuestro análisis es superior a la reportada en la literatura (14.3 meses respecto 8.5 meses en el estudio MPACT). En nuestra muestra los pacientes incluidos en un estudio fase I viven 19.2 meses respecto 12.8 meses los que no participan.

Hemos querido hacer más puro el beneficio de la participación en un fase I en estos pacientes, y por ello se ha restado a la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión de la primera línea de nuestros pacientes, dado que la primera línea de tratamiento es la única que claramente ha demostrado eficacia en los pacientes afectos de un cáncer de páncreas, y esta línea de tratamiento puede influir en la supervivencia global del paciente.

La supervivencia libre de progresión de la primera línea es superponible en los dos grupos: 4.9 meses en los pacientes que no han participado en un estudio fase I y 5.2 meses en los que sí han participado en un estudio fase I a la progresión del tratamiento considerado estándar ($p=0.17$).

Una vez eliminada la influencia de la primera línea en la supervivencia del enfermo, existen diferencias significativas entre los pacientes que participan en un estudio fase I y los que no: 6.7 meses respecto 14.8 meses, y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.02$).

No vemos este beneficio tan claro con las terapias dirigidas respecto a las no dirigidas, probablemente porque en el cáncer de páncreas las mutaciones más frecuentes no son diana de fármacos y nuevas drogas, por sus características estructurales, incluyendo el caso de *KRAS*, la mutación más frecuente, que hasta el momento actual no se ha conseguido utilizar como diana terapéutica en el cáncer de páncreas.

No obstante, en el momento actual empezamos a identificar mutaciones sobre las que sí tenemos un tratamiento específico, como sería *RNF43* y los inhibidores de la vía de Wnt, o las mutaciones en *PI3K* y los inhibidores del mismo.

En la literatura existen reportados casos de respuesta a una terapia molecular dirigida, sería el caso de un paciente afecto de un cáncer de páncreas con una baja expresión de PTEN y mutación en *KRAS* (G12D) y una respuesta parcial a un inhibidor de AKT (MK 2206)(206).

En nuestra serie tenemos otro ejemplo de un paciente con una pérdida de expresión de PTEN y una respuesta parcial al tratamiento con un inhibidor de PI3K en combinación con quimioterapia basada en taxanos. El estudio molecular del paciente puso de manifiesto la presencia de una mutación en *KRAS* Q61H, y en *TP53* G245fs. Este paciente se intervino de una neoplasia de páncreas, progresó al finalizar el tratamiento adyuvante basado en gemcitabina y progresó a la primera línea dentro de un estudio clínico con PM1183. No obstante, dentro del estudio clínico fase I presentó una respuesta parcial con normalización del marcador tumoral.

La experiencia de este trabajo pone de manifiesto que no hay que excluir a los pacientes con un cáncer de páncreas de participar en un estudio fase I, dado que ello puede impactar en su supervivencia.

Hay que realizar un esfuerzo para encontrar las alteraciones moleculares poco frecuentes en el cáncer de páncreas, pero potenciales dianas terapéuticas, dado que cada día son más los ejemplos de pacientes que han respondido a terapia dirigida molecularmente.

11. Conclusiones

- 1** *KRAS* es una mutación frecuente en el cáncer de páncreas, siendo las mutaciones más frecuentes G12D y G12V.
- 2** La mutación de *KRAS* como factor pronóstico no ha demostrado su valor en la literatura, probablemente debido a la utilización de técnicas con baja sensibilidad para determinar dicha mutación. Con las técnicas de las que disponemos actualmente con mayor sensibilidad, debemos seguir estudiando el valor pronóstico de *KRAS* en el cáncer de páncreas. En nuestra pequeña experiencia con una técnica de alta sensibilidad, existe una tendencia a que los pacientes con mutaciones de *KRAS* tengan un peor pronóstico.
- 3** Los pacientes afectos de un cáncer de páncreas que han progresado a una terapia estándar, se benefician de la participación en un estudio fase I, presentando una mayor supervivencia que aquellos que no llegan a participar en él. La diferencia en supervivencia se acentúa cuando eliminamos la influencia de la primera línea de tratamiento y es estadísticamente significativa.
- 4** En el momento actual hemos identificado una baja frecuencia de mutaciones que sean potenciales dianas terapéuticas, no obstante, hay que insistir en buscar a esta población y tratarla con la terapia dirigida que les pueda ofrecer un beneficio terapéutico.
- 5** La frecuencia de alelo mutado de *KRAS* determina una población heterogénea dentro de los pacientes con un cáncer de páncreas y *KRAS* mutado. Se necesita seguir explorando este concepto para poder evaluar su valor pronóstico y predictivo.
- 6** Se constata la dificultad en el cáncer de páncreas de obtener tejido tumoral para estudio molecular, especialmente en el material que proviene de las localizaciones metastásicas o de localización primaria pero no quirúrgica.

12. Bibliografía

- 1-Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-1403.
- 2-Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:5-29.
- 3-Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004;363:1049-1057.
- 4-Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1605-1617.
- 5-Rahib L, Smith B, Aizenberg R, et al. Projecting Cancer incidence and death to 2013: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74:2913-2921.
- 6-Bonnetain F, Bonsing B, Conroy T, et al. Guidelines for time-to-event end-point definitions in trials for pancreatic cancer. Results of the DATECAN initiative(Definition for the Assessment of Time-to-event End-points in CANcer trials). *Eur J Cancer* 2014;50:2983-2993.
- 7-Tabernero J, Macarulla T. Changing the paradigm in conducting randomized clinical studies in advanced pancreatic cancer: an opportunity for better clinical development. *J Clin Oncol* 2009;27:5487-5491.
- 8-Hassan M, Bondy ML, Wolff RA, et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2696-2707.
- 9-Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pool analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:765-776.
- 10-Landi S. Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: a review of the literature. *Mutat Res* 2009;681:299-307.
- 11- Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:197-209.
- 12-Batty GD, Kivimaki M, Morrison D, et al. Risk factors for pancreatic cancer mortality: extended follow-up of the original Whitehall study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:673-675.
- 13- Tersmette AC, Pedersen GM, Offerhaus GJ, et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relative of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:738-744.
- 14- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: A kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1694-1706.
- 15-Thompson D, Easton DF. The breast Cancer linkage consortium: Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1358-1365.
- 16-Iqbal J, Ragone A, Lubinski, et al. The incidence of pancreatic cancer in BRCA-1 and BRCA-2 mutation carriers. *Br J Cancer* 2012;107:2005-2009.
- 17-Golan T, Kanji Z, Epelbaum R, et al. Overall survival and clinical characteristics of pancreatic cancer in BRCA mutation carriers. *Br J Cancer* 2014;111:1132-1138.
- 18-Kaufman B, Shapina-Frommer R, Schmutzler R, et al. Olaparib Monotherapy in Patients with Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. *J Clin Oncol* 2014;32:1-8.
- 19-Holter S, Borgida A, Dodd A, et al. Germline BRCA mutations in a large clinic-based cohort of patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2015;33:3124-3129.
- 20- Ferrone CR, Levine DA, Tang LH, et al. BRCA germline mutations in Jewish patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2008;27:433-438.
- 21-Lucas AL, Shakya R, Lipsyc MD, et al. High prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations with loss of heterozygosity in a series of resected pancreatic adenocarcinoma and other neoplastic lesions. *Clin Cancer Res* 2013;19:3396-3403.
- 22-Hahm Sa, Greenhalf B, Ellis I, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:214-221.
- 23-Murphy KM, Brune KA, Griffin C, et al. Evaluation of candidate genes MAP2KA, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: Deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res* 2002;62:3789-3793.
- 24-Ozcelik H, Schmocker B, Di Nicola N, et al. Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet* 1997;16:17-18.
- 25-Real FX, Malats N, Lesca G, et al. Family history of cancer and germline BRCA2 mutations in sporadic exocrine pancreatic cancer. *Gut* 2002;50:653-657.

- 26-Lal G, Liu G, Schmocker B, et al. Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: Role of familial history and germline p16, BRCA1, and BRCA2 mutations. *Cancer Res* 2000;60:409-416.
- 27-Ballehanina U, Chamberlain R. The clinical utility of serum Ca 19.9 in the diagnosis, prognosis, and management of pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2012;3:105-119.
- 28-Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, et al. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med* 2009;6:e1000046.
- 29-Kiliç M, Göçmen E, Tez M, et al. Value of preoperative serum CA 19-9 levels in predicting resectability for pancreatic cancer. *Can J Surg* 2006;49:241-244.
- 30-Lundin J, Roberts PJ, Kuusela P, et al. The prognostic value of preoperative serum levels of CA 19-9 and CEA in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1994;69:515-519.
- 31-Miura F, Takada T, Amano H, et al. Diagnosis of pancreatic cancer. *HPB (Oxford)* 2006;8:337-342.
- 32-Karmazanovsky G, Fedorov V, Kubyskhin V, et al. Pancreatic head cancer: accuracy of Ct in determination of respectability. *Abdom Imaging* 2005;30:488-500.
- 33-Al-Hawary MM, Francis IR, Chari ST, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. *Radiology* 2014;270:248-260.
- 34-Pietryga JA, Morgan DE. Imaging preoperatively for pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2015;6:343-357.
- 35- Navarro S, Vaquero E, Maurel J, et al; en representación del Grupo Español de Consenso en Cáncer de Páncreas; el Club Español Biliopancreático (CEBP); Grupo Español Multidisciplinar de Cáncer Digestivo (GEMCAD); Sociedad Española de Diagnóstico por Imagen del Abdomen (SEDIA); Sociedad Española de Endoscopia Digestiva (SEED); la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP). [Recommendations for diagnosis, staging and treatment of pancreatic cancer (Part II)]. *Med Clin (Barc)* 2010; 22;134:692-702.
- 36- Navarro S, Vaquero E, Maurel J, et al; Representación del Grupo Español de Consenso en Cáncer de Páncreas; Club Español Biliopancreático (CEBP); Grupo Español Multidisciplinar de Cáncer Digestivo (GEMCAD); Sociedad Española de Diagnóstico por Imagen del Abdomen (SEDIA); Sociedad Española de Endoscopia Digestiva (SEED); Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP). [Recommendations for diagnosis, staging and treatment of pancreatic cancer (Part I)]. *Grupo Español de Consenso en Cáncer de Páncreas* Med Clin (Barc). 2010 May 15;134:643-655.
- 37-Dumonceau JM, Vonlaufen A. Pancreatic endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). *Endoscopy* 2007;39:124-130.
- 38-Kauhanen SP, Komar G, Seppänen MP, et al. A prospective diagnostic accuracy study of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography, multidetector row computed tomography, and magnetic resonance imaging in primary diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Annals of Surgery* 2009;250:957-963.
- 39-Greenhalf W, Grocock C, Harcus M, et al. Screening high-risk families for pancreatic cancer. *Pancreatology* 2009;9:125-222.
- 40-Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer, 2010.
- 41-Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, et al. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer* 2007;110:738-744.
- 42-Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathway they control. *Nat Med* 2004;10:789-799.
- 43-Ryan D, Hong T, Bardeesy N, et al. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2014;371:1039-1048.
- 44-Hruban R, Maitra A, Kern S, et al. Precursors to Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2007;36:831-841.
- 45-Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25:579-586.
- 46-Kanda M, Matthai H, Wu J, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2012;142:730-733.
- 47-Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, et al. Concordance loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 2005;18:959-963.
- 48-Sohon T, Yeo C, Cameron J, et al. Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: An update experience. *Ann Surg* 2004;239:788-797.
- 49-Wu J, Matthaehi H, Maitra A, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med* 2011;3:92ra66.
- 50-Crippa S, Fernandez del Castillo C, Salvia R, et al. Mucin-producing neoplasm of the pancreas: An analysis of distinguishing clinical and epidemiologic characteristics. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:213-219.
- 51-Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-KRAS genes. *Cell* 1988;53:549-554.
- 52-Schubbert S, Shannon K, Bollag G, et al. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev* 2007;7:295-308.

- 53-Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE, et al. P16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2140-2143.
- 54-Fleming JB, Shen GL, Holloway SE, et al. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras directed therapy. *Mol Cancer Res* 2005;3:413-423.
- 55-Navas C, Hernández-Porras I, Schuhmacher A, et al. EGF receptor signaling is essential for KRAS oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;22:318-330.
- 56-Hingorani S, Wang L, Multani A, et al. Tp53 and Kras cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469-483.
- 57-Eser S, Schnieke A, Schneider G, et al. Oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2014;111:817-822.
- 58-Garrido-Laguna I, Tan AC, Uson M, et al. Integrated preclinical and clinical development of mTOR inhibitors in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2010;103:649-655 .
- 59- Wolpin BM, Hezel AF, Abrams T, et al. Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:193-198.
- 60-Klümpen HJ, Queiroz KC, Spek CA, et al. mTOR inhibitor treatment of pancreatic cancer in a patient With Peutz-Jeghers syndrome. *J Clin Oncol* 2011;29:e150-153.
- 61-Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16(MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994;8:27-32.
- 62-Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006;127:265-275.
- 63-Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:3126-3130.
- 64-Redson MS, Caldas C, Seymour AB, et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 1994;54:3025-3033.
- 65-Volgestein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310.
- 66-Raycroft L, Wu HY, Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 1990;249:1049-1051.
- 67-Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-353.
- 68-Hidalgo M and Maitra A. The hedgehog pathway and pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2009;361:2094-2096.
- 69-Blobe G, Schiemann C, Lodish W, et al. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-1358.
- 70-Massague J. TGFbeta in cancer. *Cell* 2008;134:215-230.
- 71-Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:4115-4121.
- 72-Blackford A, Serrano O, Wolfgang C, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:4674-4679.
- 73-Lacobuzio-Donahue Ca, Fu B, Yachida S, et al. DPC4 gene status of the primary carcinomas correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1806-1811.
- 74-Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analysis. *Science* 2008;321:1801-1806.
- 75-Lacobuzio-Donahue. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. *Gut* 2012;61:1085-1094.
- 76-Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015 Oct 12. doi: 10.1038/nm.3967.
- 77-Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68.
- 78-Collisson E, Sadanandam A, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing response to therapy. *Nat Med* 2011;17:500-503.
- 79-Decker K, Goldman DC, Grash CL, et al. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Dev Biol* 2006;298:415-429.
- 80-Kwei Ka, Bashyam M, Kao J, et al. Genomic profiling identifies GATA6 as a candidate oncogene amplified in pancreatobiliary cancers. *PLoS Genet* 2008;4:e1000081.
- 81-Fu B, Luo M, Lakkur, et al. Frequent genomic copy number gain and overexpression of GATA-6 in pancreatic carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1593-1601.
- 82-Singh A, Greninger P, Rodhes D, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009;15:489-500.
- 83-Waddell N, Pajic M, Patch A, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015;518:495-501.

- 84-Moffitt R, Marayati R, Flate E, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Genetics* 2015;published online 7 September 2015;doi:10.1038/ng.3398.
- 85-Cancer genome atlas research network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507:315-322.
- 86-Rhim A, Mirek E, Aiello N, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012;148:349-361.
- 87-Lonardo E, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells-update and future directions. *Molec Oncology* 2010;4:431-442.
- 88-Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-1037.
- 89-Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* 2009;8:310-314.
- 90-Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1:313-323.
- 91-Mahadevan D, Von Hoff D. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1186-1197.
- 92-Cruickshank AH. Solid carcinomas of the exocrine pancreas. In *Pathology of the pancreas*. London (UK): Springer-Verlag;1986, p 155-77.
- 93-Neesse A, Michl P, Frese KK, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 2010;60:861-880.
- 94-Bardeesy N, DePinho Ra. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2:897-909.
- 95-Li J, Wientjes MG, Au JL. Pancreatic cancer: pathobiology, treatment options, and drug delivery. *AAPS J* 2010;12:223-232.
- 96-Mukherjee P, Basu GD, Tinder TI, et al. Progression of pancreatic adenocarcinoma is significantly impeded with a combination of vaccine and COX-2 inhibition. *J Immunol* 2009;182:216-224.
- 97-Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, et al. Peritumoral SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:319-325.
- 98-Heinemann V, Reni M, Ychou M, et al. Tumour-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and current evidence for new therapeutic strategies. *Cancer Treat Rev* 2014;40:118-128.
- 99-Chu G, Kimmelman A, Hezel A, et al. Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2007;101:887-907.
- 100-Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer* 2004;3:26.
- 101-Apte MV, Park S, Phillips PA, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 2004;29:179-187.
- 102-Omary MB, Lugea A, Lowe AW, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 2007;117:50-59.
- 103-Phillips PA, McCarroll JA, Park S, et al. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 2003;52:275-282.
- 104-Zhang W, Erkan M, Abiatari I, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) in pancreatic neoplasm and pancreatic stellate cells. *Cancer Biol Ther* 2007;6:218-227.
- 105-Shek FW, Benyon RC, Walker FM, et al. Expression of Transforming Growth Factor- β 1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis. *Am J Pathol* 2002;160:1787-1798.
- 106-Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol* 2009;44:249-260.
- 107-Erkan M, Reisen-Erkan C, Michalski CW, et al. Cancer stellate cells interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia* 2009;11:497-508.
- 108-Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. PRODIGE Intergroup: FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreas cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1817-1825.
- 109-Von Hoff, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013;369:1691-1703.
- 110-Sultana A, Smith CT, Cunningham D, et al. Metaanalyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:2607-2615.
- 111-Kovach JS, Moertel CG, Schutt AJ, et al. Proceedings: A controlled study of combined 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 5-fluorouracil therapy for advanced gastric and pancreatic cancer. *Cancer* 1974;33:563-567.
- 112-Burriss Ha, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvement in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-2413.
- 113-Oettle H. Progress in the knowledge and treatment of advanced pancreatic cancer: from bench to bedside. *Cancer Treat Rev* 2014;40:1039-1047.

- 114-Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, et al. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: eastern cooperative oncology group trial E2297. *J Clin Oncol* 2002;20:3270-3275.
- 115-Di Costanzo F, Carlini P, Doni L, et al. Gemcitabine with or without continuous infusion 5-FU in advanced pancreatic cancer: a randomized phase II trial of the Italian oncology group for clinical research (GOIRC). *Br J Cancer* 2005;93:185-189.
- 116-Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, et al. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2007;25:2212-2217.
- 117-Cunningham D, Chau I, Stocken DD, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5513-5518.
- 118-Hu J, Zhao G, Wang HX, et al. A meta-analysis of gemcitabine containing chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 2011 Mar 26;4:11. doi: 10.1186/1756-8722-4-11.
- 119-Louvet C, Labianca R, Hammel P, et al. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GIS-CAD phase III trial. *J Clin Oncol* 2005;23:3509-3516.
- 120-Poplin E, Feng Y, Berlin J, et al. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the eastern cooperative oncology group. *J Clin Oncol* 2009;27:3778-3785.
- 121-Heinemann V, Quetzsch D, Gieseler F, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3946-3952.
- 122-Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, et al. Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the gruppo oncologia dell'italia meridionale. *Cancer* 2002;94:902-910.
- 123-Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, et al. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002;87:161-167.
- 124-Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1430-1438.
- 125-Abou-Alfa GK, Letourneau R, Harker G, et al. Randomized phase III study of exatecan and gemcitabine compared with gemcitabine alone in untreated advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4441-4447.
- 126-Rocha Lima CM, Green MR, Rotche R, et al. Irinotecan plus gemcitabine result in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increase tumor response rate. *J Clin Oncol* 2004;22:3776-3783.
- 127-Oettle H, Richards D, Ramanathan RK, et al. A phase III trial of pemetrexed plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2005;16:1639-1645.
- 128-Kulke MH, Tempero MA, Niedzwiecki D, et al. Randomized phase II study of gemcitabine administered at a fixed dose rate or in combination with cisplatin, docetaxel, or irinotecan in patients with metastatic pancreatic cancer: CALGB 89904. *J Clin Oncol* 2009;27:5506-5512.
- 129-Stathoulos GP, Syrigos K, Aravantinos G, et al. A multicenter phase III trial comparing irinotecan-gemcitabine with gemcitabine monotherapy as first line treatment in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2006;95:587-592.
- 130-Schneider BP, Ganjoo KN, Seitz DE, et al. Phase II study of gemcitabine plus docetaxel in advanced pancreatic cancer: a Hoosier Oncology Group study. *Oncology* 2003;65:218-223.
- 131-Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 2010;28:3617-22.
- 132-Van Cutsem E, Vervenne WL, Bennouna J, et al. Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2231-2237.
- 133-Kindler HL, Ioka T, Richel DJ, et al. Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12:256-262.
- 134-Rougier P, Riess H, Manges R, et al. Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2013;49:2633-2642.
- 135-Gonçalves A, Gilibert M, François E, et al. BAY-PAN study: a double-blind phase III randomized trial comparing gemcitabine plus sorafenib and gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2012;23:2799-805.

- 136-Moore M, Goldstein D, Jamm J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007;25:1960-1966.
- 137-Philip PA, Benedetti J, Corless C, et al. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: southwest Oncology Group-directed intergroup trial SO205. *J Clin Oncol* 2010;28:3605-3610.
- 138-Eberhard DA, Johnson B, Amler L, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5900-5909.
- 139-da Cunha Santos G, Dhani N, Tu D, et al. Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3. *Cancer* 2010;116:5599-5607.
- 140-Van Cutsem E, Li C, Nowara E, et al. Dose escalation to rash for erlotinib plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: the phase II RACHEL study. *Br J Cancer* 2014;111:2067-2075.
- 141-Ormanns S, Siveke J, Heinemann V, et al. pERK, pAKT and p53 as tissue biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer: a translational subgroup analysis from AIO-PK0104. *BMC Cancer* 2014;14:624.
- 142-Van Laethem JL, Jassen J, Heinemann V, et al. Phase II study of refametinib (BAY-86-9766), an allosteric dual MEK 1/2 inhibitor, and gemcitabine in patients with unresectable, locally advanced, or metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:(abstr 4025).
- 143-Riess H, Jean-Luc Van Laethem, Martens U, et al. Phase II study of the MEK inhibitor refametinib (BAY 86-9766) in combination with gemcitabine in patients with unresectable, locally advanced, or metastatic pancreatic cancer: Biomarker results. *J Clin Oncol* 2014;32:(abstr 4129).
- 144-Van Cutsem E, Hidalgo M, Bazin I, et al. Phase II randomized trial of MEK inhibitor pimasertib or placebo combined with gemcitabine in the first-line treatment of metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:(abstr 344).
- 145-Infante J, Somer B, Park J, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* 2014;50:2072-2081.
- 146-Bodoky G, Timcheva C, Spigel DR, et al. A phase II open-label randomized study to assess the efficacy and safety of selumetinib (AZD6244 [ARRY-142886]) versus capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer who have failed first-line gemcitabine therapy. *Invest New Drugs* 2012;30:1216-1223.
- 147-Ducreux M, Cuhna A, Caramella C, et al. Cancer of the pancreas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26:v56-v68.
- 148-Von Hoff D, Ramanathan R, Borad M, et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial. *J Clin Oncol* 2011;29:4548-4554.
- 149-Scheithauer W, Von Hoff DD, Ramanathan RK, et al. Dose Delivery in a Phase III Trial (MPACT) of Weekly nab-Paclitaxel (nab-P) Plus Gemcitabine (Gem) vs Gem Alone for Patients With Metastatic Adenocarcinoma of the Pancreas [abstract 2.586]. *European Cancer Congress 2013 (ECCO-ESMO-ESTRO)*; September 27-October 1; Amsterdam.
- 150-Hidalgo M, Plaza C, Musteanu M, et al. SPARC expression did not predict efficacy of nab-paclitaxel plus gemcitabine or gemcitabine alone for metastatic pancreatic cancer in an exploratory analysis of the phase III MPACT trial. *Clin Cancer Res* 2015;Jul 13.
- 151-Carrato A, García P, López R, et al. Cost-utility analysis of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nab-paclitaxel) in combination with gemcitabine in metastatic pancreatic cancer in Spain: results of the PANCOSTA-BRAX study. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2015;15:579-89.
- 152-Sinn M, Riess H, Sinn B, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression analysed by the clone SP 120 rabbit antibody is not predictive in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant gemcitabine- results from the CONKO-001 trial. *Eur J Cancer* 2015;51:1546-1554.
- 153-Greenhalf W, Ghaneh P, Neoptolemos J, et al. Pancreatic Cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(1):djt347. doi: 10.1093/jnci/djt347. Epub 2013 Dec 3.
- 154-Drummond DC, Noble CO, Guo Z, et al. Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy. *Cancer Res* 2006;66:3271-3277.
- 155-Von Hoff, Li C, Wang-Gillan A, et al. NAPOLI-1: randomized phase 3 study of MM-398 (nal-IRI), with or without 5-fluorouracil and leucovorin versus 5-fluorouracil and leucovorin, in metastatic pancreatic cancer progressed on or following gemcitabine-based therapy. *Ann Oncol* 2014;25:ii105-ii117.
- 156-Zaniboni A, Aitini E, Barni S, et al. FOLFIRI as second-line chemotherapy for advanced pancreatic cancer: a GISCAD multicenter phase II study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69:1641-1645.
- 157-Sun JD, Liu Q, Wang J, et al. Selective tumor hypoxia targeting by hypoxia-activated prodrug TH-302 inhibits tumor growth in preclinical models of cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:758-770.

- 158-Borad M, Reddy S, Bahary N, et al. Randomized Phase II Trial of Gemcitabine Plus TH-302 Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33:1475-1481.
- 159-Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancer deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 2008;26:3785-3790.
- 160-Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol* 2015;33:244-250.
- 161-Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009;361:1173-1178.
- 162-Von Hoff D, LoRusso P, Rudin C, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:1164-1172.
- 163-Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 2008;455:406-410.
- 164-Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009;324:1457-1461.
- 165-Madden, J. Infinity Pharmaceuticals, Inc. announced interim data from its double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 study comparing saridegib (also known as IPI-926) in combination with gemcitabine to placebo plus gemcitabine in 122 patients with previously untreated, pancreatic metastatic cancer. January 27, 2012.
- 166-Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 2014;25:719-734.
- 167-Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:735-747.
- 168-Gore J, Korc M. Pancreatic cancer stroma: friend or foe? *Cancer Cell* 2014;25:711-712.
- 169-Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;21:418-429.
- 170-Hingorani SR, Harris WP, Hendifar AE, et al. High response rate and PFS with PEGPH20 added to nab-paclitaxel/gemcitabine in stage IV previously untreated pancreatic cancer patients with high-HA tumors: Interim results of a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2015;33:(abstr 4006).
- 171-Ma Y, Hwang RF, Logsdon CD, et al. Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013;73:3927-3937.
- 172-Massó-Vallés D, Jauset T, Serrano E, et al. Ibrutinib exerts potent antifibrotic and antitumor activities in mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2015;75:1675-1681.
- 173-Sagiv-Barfi I, Kohrt HE, Czerwinski DK, et al. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E966-72.
- 174-Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000;19:5662-5679.
- 175-Quintás-Cardama A, Verstovsek S. Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin Cancer Res* 2013;19:1933-1940.
- 176-Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1061.
- 177-Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366:799-807.
- 178-Kocher HM, Mears L, Lea N, et al. JAK V617F missense mutation is absent in pancreatic cancer. *Gut* 2007;56:1174-1175.
- 179-Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, et al. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res* 2011;71:5020-5029.
- 180-Hurwitz HI, Uppal N, Wagner SA, et al. Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed. *J Clin Oncol* 2015 Sep 8. pii: JCO.2015.61.4578.
- 181-Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-1037.
- 182-Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, et al. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:340-351.
- 183-Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* 2009;8:310-314.
- 184-Rajeshkumar NV, Rasheed ZA, García-García E, et al. A combination of DR5 agonistic monoclonal antibody with gemcitabine targets pancreatic cancer stem cells and results in long-term disease control in human pancreatic cancer model. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2582-2592.
- 185-Hidalgo M, Jameson M, Carrato A, et al. A phase 1b study of the anti-cancer stem cell agent demcizumab (DEM) & gemcitabine (GEM) +/- paclitaxel protein bound particles (nab-paclitaxel) in pts with advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2014;25 (suppl_4): iv210-iv253.

- 186-von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, et al. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:925s-932s.
- 187-Clark CE, Beatty GL, Vonderheide RH, et al. Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: Insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Lett* 2009;279:1-7.
- 188-Workmann S, Diakopoulos K, Lesina M, et al. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene* 2014;33:2956-2967.
- 189-Melero I, Grimaldi A, Perez-Garcia JL, et al. Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities from combination. *Clin Cancer Res* 2013;19:997-1008.
- 190-Brahmer J, Tykodi S, Chow L, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455-2465.
- 191-Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443-2454.
- 192-Royal RE, Levy C, Turner K, et al. Phase 2 trial of single agent ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* 2010;33:828-833.
- 193-Feig C, Jones JO, Kraman M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:20212-20217.
- 194-Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, et al. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 2011;331:1612-1616.
- 195-Beatty GL, Torigian DA, Chiorean EG, et al. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:6286-6295.
- 196-Laheru D, Lutz E, Burke J, et al. Allogeneic granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor immunotherapy alone or in sequence with cyclophosphamide for metastatic pancreatic cancer: a pilot study of safety, feasibility, and immune activation. *Clin Cancer Res* 2008;14:1455-1463.
- 197-Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, et al. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 2005;201:1591-1602.
- 198-Le DT, Brockstedt DG, Nir-Paz R, et al. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin Cancer Res* 2012;18:858-868.
- 199-Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria* Monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:1325-1333.
- 200-Lutz ER, Wu AA, Bigelow E, et al. Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. *Cancer Immunol Res* 2014;2:616-631.
- 201-Middleton G, Silcocks P, Cox T, et al. Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:829-840.
- 202-Bekaii-Saab T, Noonan A, Lesinski G, et al. A multi-institutional randomized phase 2 trial of the oncolytic virus reolysin in the first line treatment metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Oncol* 2014;25:1-41.
- 203-Sinn BV, Striefler JK, Rudl MA, et al. KRAS mutations in codon 12 or 13 are associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2014;43:578-583.
- 204-Jurinke C, van den Boom D, Cantor CR, et al. Automated genotyping using the DNA MassArray technology. *Methods Mol Biol* 2002;187:179-192.
- 205-Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW, et al. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev* 2011;32:177-195.
- 206-Yap TA, Yan L, Patnaik A, et al. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2011;29:4688-4695.

