



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**DEPARTAMENTO DE CIÈNCIES MORFOLÒGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
Barcelona, 2015**

**NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PANCREÁTICA Y ADENOCARCINOMA
DUCTAL DE PANCREAS: ESTUDIO DE FACTORES DE LAS VÍAS DE
SEÑALIZACIÓN CELULAR Y SU CORRELACIÓN CON LA CLÍNICA**

Maria Teresa Salcedo Allende

**Tesis Doctoral desarrollada en el Departamento de Anatomía Patológica del H.U. Vall d'
Hebron, bajo la supervisión de los directores doctores:**

Santiago Ramon y Cajal Agüeras

Javier Hernández Losa

Dr. Santiago Ramon y Cajal Agüeras, Catedrático de Patología Estructural y Molecular de la Unidad de Anatomía Patológica del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona, Doctor en Medicina y Cirugía y jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Vall d' Hebron

Dr. Javier Hernández Losa, Doctor en Ciencias Biológicas y jefe del Laboratorio de Biología Molecular, del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Certifican que la tesis titulada **“NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PANCREÁTICA Y ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PANCREAS: ESTUDIO DE FACTORES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR Y SU CORRELACIÓN CON LA CLÍNICA”**, dirigida por los abajo firmantes es apta ser defendida ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Prof. Santiago ramón y Cajal
Barcelona, 9 de Octubre 2015

Directores de tesis:

Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Dr. Javier Hernández Losa

A Javier y a mis hijas,
los es fundamentaesi que dan
sentido a mi vida.

A mis padres, ejemplo y guías indispensables a lo largo de mi vida y mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero destacar que este proyecto se ha podido realizar gracias al trabajo y colaboración de muchísimas personas. Para todas ellas mi más profundo agradecimiento.

Quiero agradecer al Dr. Santiago Ramon y Cajal la oportunidad y la ayuda ofrecida en todo momento para poder realizar este proyecto, sin escatimar nunca en gastos ni tiempo. Gracias Dr. Ramon y Cajal, Dra. Allende y Dr. Hernández, por aceptar ser mis directores de tesis y por aportarme todas vuestras reflexiones, capacidad de síntesis y experiencia. Mamá, gracias por todo lo que me has enseñado en la vida, como docente y compañera. Gracias por tus consejos personales y profesionales, idóneos en cada momento y por tu disponibilidad incondicional.

Gracias Teresa, Rosa y Francesc, por dedicar tantas y tantas horas a sacar adelante todos los estudios inmunohistoquímicos y moleculares y por vuestra rigurosidad en el trabajo de laboratorio realizado.

Gracias a Santiago Perez-Hoyos por su toda su ayuda y trabajo en el estudio estadístico y por su paciencia e interés a la hora de intentar entender el galimatías que ha supuesto este trabajo.

Gracias a todos los que formáis parte del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, secretarias, técnicos, adjuntos, residentes, en especial a los doctores Vicente Peg, Elena Martínez, Irene Sansano, Maria Eugenia Semidey, Alejandra Gabaldon y Marta Vidal, por su amistad y sus horas de risas y catarsis, que han hecho y hacen que los momentos de nervios y estrés se lleven mucho mejor. Gracias a todos, amigos y compañeros, sin vuestra colaboración y apoyo no hubiera sido posible.

Gracias a la Dra. Ruth Orellana por animarme en la consecución de este trabajo.

Gracias a los médicos del Servicio de Cirugía, en especial al Dr. Joaquim Balsells, del Servicio de Oncología, en especial a la Dra. Teresa Macarulla y al Dr. Jorge Zeron y del Servicio de Radiología, al Dr. Xavier Merino por su gran experiencia e inestimable ayuda prestada en los últimos tramos. Y en definitiva, a todos aquellos que en algún momento han participado en el proceso diagnóstico y terapéutico de los pacientes incluidos en este estudio.

Gracias Javitxu por estar siempre a mi lado, alentándome a seguir adelante en todos los proyectos que vivimos juntos (carrera, MIR, familia) y por ayudarme a seguir creyendo que éstos eran posible. Gracias por tu amor infinito a nuestra familia, tu infinita paciencia, por tus cuidados, por tu ayuda con nuestras hijas, y por hacerme mejor persona.

Gracias papás, por todo lo que me habéis enseñado a lo largo de mi vida. Gracias por compartir vuestra maravillosa manera de vivirla y mostrarme que nadie es perfecto, que todos tenemos nuestras virtudes, defectos y limitaciones y que el logro reside en conocerlas, aceptarlas e intentar mejorar cada día. Gracias por contagiarme vuestro amor por la medicina, el compromiso profesional, la dedicación y entrega a nuestra maravillosa profesión y enseñarme que, hasta el último día, uno puede aprender. Todo ello me alienta a seguir superándome.

Jelen, Bego, gracias por estar a mi lado cada día y por vuestro apoyo constante. Simplemente, gracias por quererme.

En definitiva gracias a todos, compañeros de profesión, compañeros de trabajo, amigos, familiares, gracias por estar a mi lado y hacer que me haya sentido tan apoyada durante todo este tiempo. Todo mi agradecimiento y afecto por vuestra ayuda y comprensión.

I. ÍNDICE

I.Índice	11
II.Abreviaturas	13
1.Introducción	15
1.1 .Adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP)	17
1.1.1. Concepto de ADP. Revisión histórica	18
1.1.2. Epidemiología y factores de riesgo del ADP	18
1.1.3. Clínica	21
1.1.4 .Diagnóstico	22
1.1.5. Clasificación histológica del ADP	30
1.1.6. Espectro inmunohistoquímico del ADP	32
1.1.7. Comportamiento del ADP	32
1.1.8. Diagnóstico diferencial del ADP	33
1.1.9. Tratamiento del ADP	35
1.1.10. Pronóstico del ADP	42
1.2 .Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN)	45
1.2.1 .Concepto de lesiones precursoras. Revisión histórica	45
1.2.2. Diagnóstico morfológico de los PanIN	46
1.2.3 .Espectro inmunohistoquímico de los PanIN	47
1.2.4. Diagnóstico diferencial de los PanIN	47
1.2.5. Tratamiento de los PanIN	48
1.3 .Vías de señalización celular	51
1.3.1 Vías de señalización celular en ADP	53
1.3.1.1. Vía Her2Neu, RAS-MEK-ERK	53
1.3.1.2 .PI3 quinasa-AKTmTOR	55
1.3.1.3.Genes supresores de tumores: p53, p21, p16/ INK4, SMAD4/DPC4	56
1.3.1.4. Transición epitelio-mesénquima (EMT) y cadherinas	58
1.3.1.5. Vía Hippo. Yes Associated Protein (YAP)	60
1.3.2. Vías de señalización celular en PanIN	65
2 .Hipótesis de trabajo y objetivos	69

3. Material y métodos	73
3.1. Material de estudio	75
3.2. Recogida de datos clínicos y parámetros histológicos	76
3.3. Estudio inmunohistoquímico	76
3.4. Análisis de mutaciones en RAS	79
3.5. Análisis estadístico	82
4. Resultados	87
4.1. Análisis descriptivo	
4.1.1. Análisis descriptivo de parámetros clínico-patológicos en ADP	91
4.1.2. Análisis descriptivo de las mutaciones de RAS en ADP	95
4.1.3. Análisis descriptivo del estudio inmunohistoquímico de factores de las vías de señalización celular en : Pancreatitis crónica (PC), Lesiones preinvasivas (Pan-IN) y Adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP)	96
4.1.4. Análisis descriptivo de las supervivencias en ADP	99
4.1.4.1. Supervivencia global en ADP	99
4.1.4.2. Supervivencia libre de progresión en ADP9	99
4.2. Modelo de progresión	101
4.2.1. Ducto PC → PanIN PC → ADP	103
4.2.2. "ADP primarios" versus "ADP secundarios"	108
4.3. Estudio de mutación de KRAS	11
4.3.1. Relación entre estado mutacional y expresión de proteínas en ADP	113
4.3.2. Relación entre estado mutacional y parámetros clínico-patológicos en ADP	117
4.4. Estudio de parámetros clínico-patológicos	119
4.4.1. Relación de parámetros clínico- patológicos y expresión de proteínas en ADP	121
4.4.2. Asociación de parámetros clínico-patológicos entre sí en ADP	126
4.5. Estudio de supervivencias	131
4.5.1. Relación entre supervivencias y estado mutacional en ADP	133
4.5.2. Relación entre supervivencias y expresión de proteínas en ADP	136
4.5.3. Relación entre supervivencias y parámetros clínico-patológicos en ADP	137
4.6. Análisis multivariante	147
5. Discusión	151
Conclusiones	169
Resumen de la tesis	171
Bibliografía	173

II. ABREVIATURAS

ADP: adenocarcinoma ductal de páncreas
AH: arteria hepática
AHBPA/SSO: American Hepatobiliary Association
AJCC: American Joint Committee Cancer
AMS: arteria mesentérica superior
ASCO:
CEA: Antígeno carcinoembrionario
CGA: campos microscópicos de gran aumento
CP: Cáncer de páncreas
CPLA: Cáncer de páncreas localmente avanzado
CPM: Cáncer de páncreas metastásico
DPC: Duodenopancreatectomía cefálica
DM: Diabetes Mellitus
EEM: error estándar de la media
EMT: transición epitelio-mesénquima
EUS: Ecografía
5-FU: 5- fluorouracilo
IC95%: Intervalo de confianza
IHQ: inmunohistoquímico/a
K-Ras: Kirsten rat sarcoma virus oncogen
LOH: pérdida de heterocigosidad
MAD: metaplasia acinar- ductal
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
mRNA: RNA mensajero
NCCN: National Comprehensive Cancer Network
NF-1: neurofibromatosis múltiple tipo 1
NMP: Neoplasia Mucinoso Papilar
NMQ: Neoplasia Mucinoso Quística
N-Ras: Neuroblastoma viral-homólogo oncogen
Pan-IN: Neoplasia intraepitelial pancreática
PC: pancreatitis crónica
PET: Tomografía con emisión de positrones
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa
QT: quimioterapia
Rb: proteína del retinoblastoma
RM: Resonancia magnética
RT: radioterapia
SG: supervivencia global
SLP: supervivencia libre de progresión
TAC: Tomografía Axial Computerizada
TC: tronco celiaco
T-L: anastomosis termino-lateral
T-T: anastomosis término-terminal
UICC: Union for International Cancer Control
VMS-VP: Vena mesentérica superior-vena porta
WT: wild-type
WTS: protein quinasa warts
YAP: Yes-associated protein

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) constituye aproximadamente el 85% de los tumores del páncreas. Es el tumor en el que menos avances clínicos se han producido en los últimos 50 años. Constituye la 4ª-5ª causa de mortalidad por cáncer en el mundo occidental y posee la relación mortalidad/incidencia más alta de todas las neoplasias, porque en el momento del diagnóstico el 93% de los pacientes ya presenta metástasis (locales o a distancia) (Jemal A. et al., 2009; Hidalgo M., 2010; Vincent A. et al., 2011). Las razones para este sombrío pronóstico subyacen en su extrema agresividad y rápida progresión. Al mal pronóstico contribuyen múltiples causas: 1) el diagnóstico se realiza tarde ya que la sintomatología es bastante inespecífica, 2) no existen métodos diagnósticos suficientemente sensibles y específicos como para realizar cribado, 3) los grupos de riesgo están insuficientemente definidos, 4) Sólo un 20% de pacientes son susceptibles de cirugía potencialmente curativa y el tumor recurre en la mayoría de ellos y 5) el tumor es resistente a los tratamientos con quimio- y radioterapia. Tiene además el ratio de supervivencia a 5 años más bajo, aproximadamente 5% de los pacientes (Vincent A. et al., 2011).

Actualmente, el marcador tumoral más comunmente utilizado en la práctica clínica para el despistaje de ADP es el Ca19.9, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 90% para cáncer de páncreas. Está íntimamente relacionado con el volumen tumoral y no sirve para identificar a pacientes con tumores pequeños que se puedan resear. Asimismo, su utilidad se ve restringida por los falsos positivos, pues es incapaz de diferenciar el cáncer de páncreas de otras alteraciones pancreatobiliares, como la pancreatitis crónica (PC) (Grote T. y Logsdon C.D., 2007; Misek D.E. et al., 2007). Por lo tanto es obvia la necesidad de descubrir nuevos biomarcadores que sean específicos y sensibles para el ADP.

El tratamiento estándar de primera línea del ADP es la Gemcitabina, en combinación con otros fármacos, que prolonga la supervivencia en pocas semanas (Li D. et al., 2004). Aprobada en 1996 (Burriss H.A. et al., 1997), ha tenido resultados poco alentadores. La resistencia innata o adquirida a los fármacos por el ADP sigue siendo el principal obstáculo para el éxito en el control de esta enfermedad (Adesso L. et al., 2013). Por ello, es necesario encontrar urgentemente nuevas y más efectivas dianas terapéuticas para poder tratar esta enfermedad (Hidalgo M., 2010; Guerra C. y Barbacid M., 2013).

A lo largo de los años se han descrito las principales alteraciones genéticas y moleculares que acompañan a la progresión del ADP (Ghaneh P. et al., 2007; Hernández-Muñoz I. et al., 2008), así como algunas de sus características morfológicas, como la reacción desmoplásica (Ohlund D. et al., 2009) o el alto componente inflamatorio (Thomas R.P. et al., 2002). En los últimos años se ha propuesto, sobre las bases de análisis morfológicos y genéticos, un modelo de progresión del tumor en el que participarían lesiones intraductales preinvasivas, denominadas Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN). Se ha

propuesto que las lesiones de PanIN progresan hacia estadios histológicos de mayor atipia y con acumulación clonal de cambios genéticos, sugiriendo que son precursores del ADP (Ahlgren J.D., 1996; Hruban R.H. et al., 2000).

Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen bajo mutaciones y alteraciones específicas, que dan lugar a la extrema agresividad del ADP, todavía se desconocen. Sería ideal disponer de biomarcadores que permitan identificar aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de recurrencia y metástasis, así como los que se beneficiarían de una resección quirúrgica ampliada. Asimismo sería deseable el desarrollo de biomarcadores que permitan la identificación de pacientes que van a responder a tratamientos específicos y que, a su vez, permitan monitorizar la respuesta a estos tratamientos (Ujiki M.B. y Talamonti M.S., 2005; Ghaneh P. et al., 2007; Misek D.E. et al., 2007)

1.1.1 CONCEPTO DE ADP. REVISIÓN HISTÓRICA

El ADP infiltrante es una neoplasia epitelial invasiva con diferenciación glandular (ductal) y con mayor o menor respuesta desmoplásica y/o inflamatoria. Existen sinónimos: *adenocarcinoma de células ductales*, *adenocarcinoma de tipo tubular*, *carcinoma de células ductales* o simplemente *carcinoma pancreático*.

La primera descripción del cáncer pancreático se le atribuye a Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) en 1769. No fue hasta 1898, cien años después, cuando William Stuart Halsted realizó con éxito la primera ampulectomía para un cáncer de ampulla, dando comienzo a la era de la cirugía moderna en el tratamiento de las enfermedades malignas periampulares.

En 1918, el médico italiano Ottorino Tenani publicó la primera duodenopancreatectomía practicada con éxito, y en 1935 Allan Oldfather Whipple popularizó la cirugía que ahora lleva su nombre. Actualmente, miles de duodenopancreatectomías cefálicas (cirugía de Whipple) se realizan cada año y el conocimiento sobre la patología del cáncer de páncreas sigue creciendo. A pesar de ello, el adenocarcinoma ductal infiltrante, la neoplasia más frecuente de páncreas, sigue siendo una enfermedad casi siempre letal.

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DEL ADP

Desde el punto de vista global el cáncer de páncreas (CP) no es uno de los tumores malignos más frecuentes (el 13º: 2-3% del total de los tumores). En Europa se estima una incidencia de 78.000 casos y en Estados Unidos de 32.000. Sin embargo, dicha neoplasia se sitúa en el 4º-5º lugar en el ranking de mortalidad por cáncer (4-5% de la mortalidad por cáncer en nuestro país). Esto es así porque es el tumor de menor supervivencia, de entre todos los tumores malignos, entre 4 y 6 meses. De tal manera que su incidencia es similar a su letalidad (Fundación AECC. El cáncer de páncreas en citas. 2007). El cáncer de

páncreas es el noveno tipo de cáncer más común en las mujeres y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en hombres y mujeres. En España cada año mueren alrededor de 2.400 varones y 2.000 mujeres por esta enfermedad.

Sabiendo que la tasa de supervivencia a un año se define como el porcentaje de pacientes que sobrevive al menos un año después de detectado el cáncer, sin contar aquellos que fallecen debido a otras enfermedades, la tasa de supervivencia global a un año de las personas que padecen cáncer de páncreas es del 27%; y la tasa de supervivencia a cinco años es de aproximadamente el 5-6%. Si el cáncer se detecta en los primeros estadios, cuando la extirpación quirúrgica del tumor es posible, la tasa de supervivencia relativa a cinco años es de aproximadamente el 24% (Cáncer.net, revisión Oct. del 2013).

La incidencia del CP es mayor en países desarrollados. Dicha incidencia está comenzando a disminuir en algunos países del Norte de Europa y Estados Unidos, debido a la disminución en el consumo tabáquico. La incidencia de cáncer pancreático se triplicó desde 1920s hasta 1970s, pero parece permanecer relativamente estable desde entonces (Ahlgren J.D., 1996). Las causas del aumento parecían tener relación con el aumento del consumo de tabaco, así como por los avances tecnológicos en el diagnóstico, que permitieron un diagnóstico más preciso, mejorando la identificación del tumor de origen. Muchas neoplasias previamente denominadas “enfermedad abdominal” o “cáncer gástrico” eran en realidad neoplasias pancreáticas.

En España la incidencia es intermedia: aproximadamente se diagnostican 3.800-4.000 casos anuales, cifra similar a la letalidad anual de dicho tumor (Fundación AECC. El cáncer de páncreas en citas. 2007). Dicha incidencia está en ascenso desde los años 50 y continúa ascendiendo en la actualidad.

En cuanto a factores de riesgo, no se ha determinado una etiología clara. Se han postulado múltiples posibles factores de riesgo para la aparición del CP y se clasifican en tres tipos: a) demográficos, b) medioambientales y c) relativos al huésped. Se resumen en la tabla 1 al final de este apartado.

- Sexo y raza: el CP es más frecuente en hombres que en mujeres (ratio hombre-mujer, 1'30 a 1'10) y esta predominancia sexual se ve en todos los grupos raciales. La incidencia es mayor en judíos y en raza negra (Newill V.A., 1961).
- Edad: la edad es un factor de riesgo importante para el CP. El pico de incidencia está en la 7ª y 8ª década de la vida y, la mayoría de los casos (80%) ocurre entre los 60 y 80 años (Matsuno S. et al., 2004). El CP es raro antes de los 40 años y extremadamente raro antes de los 20 años (Lüttges J. et al., 1998), en cuyos casos se debe descartar la asociación con una alteración genética.

- Tabaco: el consumo de tabaco se ha identificado como factor de riesgo para el CP (Coughlin S.S., 2000). En la mayoría de estudios, el consumo de cigarrillos aumenta al doble el riesgo de cáncer pancreático (riesgo relativo=2). En pacientes con pancreatitis hereditaria, el fumar cigarrillos condiciona un aumento del riesgo de CP y determina una aparición 20 años más temprana de cáncer pancreático.

El riesgo de desarrollar CP disminuye cuando se deja de fumar, consiguiendo un riesgo similar a los no fumadores a los 20 años del cese del consumo (World Cancer Report 2014. WHO, 2014, Capítulo 5.7).

- Diabetes mellitus: hasta el 80% de los pacientes diagnosticados de CP tienen Diabetes Mellitus (DM) o una intolerancia a la glucosa, aunque se desconoce si la diabetes es causa o consecuencia del cáncer (Everhart J. & Wright D., 1995). Se sabe que la diabetes puede ser una manifestación precoz del CP. El 1% de las DM que aparecen en personas >50 años son debidas a un CP. Por ello, se debe pensar en dicha asociación en aquellas DM atípicas, como las no asociadas a obesidad, sin antecedentes familiares o que progresan rápidamente (Chari S.T. et al., 2005)

- Pancreatitis crónica: la Pancreatitis crónica (PC) tiene diversas causas, pero la más común en Occidente es la sobreingesta de alcohol. No obstante, todos los tipos de PC se han asociado con un mayor riesgo de desarrollo de CP (RR: 2'3-18'5). El riesgo acumulado de CP oscila entre 1'8% a los 10 años y un 4% a los 20 años del diagnóstico de PC (Lowenfels A.B. et al., 1993). El riesgo de CP en personas con pancreatitis familiar es particularmente alto (Wolfgang C.L. et al., 2013).

- Predisposición genética: aproximadamente el 10% de pacientes diagnosticados de CP tiene antecedentes de uno o más familiares de primer o segundo grado afectados (Brand R.E. et al., 2007, Norton I.D. et al., 1998). Su aparición precoz es una característica de los tumores pancreáticos hereditarios. Además, algunos de estos CP familiares (10-20%) aparecen en el contexto de síndromes de cáncer hereditario (Vasen H.F. et al., 2000; Neglia J.P. et al., 1995; Teich N. et al., 2008), como se detalla en la tabla adjunta, o con mutaciones en el gen BRCA-1 y BRCA-2 (entre el 4-7% de los pacientes con cáncer de páncreas).

En los pacientes con pancreatitis hereditaria, el riesgo de CP es 50 veces superior al de la población control, con un riesgo acumulado de desarrollar CP del 40% a los 70 años de vida (Lowenfels A.B. et al., 1997). Como ya se ha comentado en párrafos anteriores, el consumo de tabaco en estos pacientes aumenta el riesgo de CP.

Tabla 1: Factores de riesgo del Cáncer de Páncreas (CP)

Alcohol
Café
Dieta rica en carne roja
Exposición ocupacional (pesticidas arsenicales)
Factores relativos al huésped
Pancreatitis crónica
Diabetes Mellitus
Obesidad
Cáncer de páncreas hereditario
Síndrome de cáncer familiar
Sd. de Cáncer de Mama y Ovario Familiar
Sd. de Nevus Melanocítico Múltiple Familiar Atípico (FAMMM)
Sd. De Peutz-Jehgers
Sd. De Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (SD. Lynch)
Sd. Li-Fraumeni
Ataxia-Telangiectasia
Mutación Gen Palladín
Condiciones hereditarias asociadas con aumento del riesgo de CP
Fibrosis Quística
Pancreatitis hereditaria
Cáncer de Páncreas Familiar
Infecciosos: Helicobacter Pylori
Alergias (protector)
Colelitiasis/colecistectomía
Gastrectomía
Úlcera gástrica
Polimorfismos genéticos
Otros tumores

1.1.3. CLÍNICA DEL ADP

Desafortunadamente, el ADP suele tener una clínica de presentación inespecífica y la mayoría de los pacientes no están adecuadamente diagnosticados durante meses o incluso años desde la primera aparición de los síntomas.

El síntoma más común asociado al carcinoma localizado en la cabeza del páncreas es el dolor epigástrico que irradia hacia la espalda (Cubilla A.L. y Fitzgerald P.J., 1979; Okusaka T. et al., 2001). Los pacientes con cáncer de páncreas presentan pérdida de peso, cuadro obstructivo biliar con ictericia no dolorosa, heces acólicas, orina oscura, prurito y náuseas y el 10% desarrolla trombosis que aparece y desaparece espontáneamente (Cubilla A.L. y Fitzgerald P.J., 1979). El médico Francés Armand Trousseau describió por primera vez, en 1861, la asociación del cáncer pancreático con la tromboflebitis migratoria, conocido actualmente como el Síndrome de Trousseau. Irónicamente, Trousseau se diagnosticó a sí mismo cáncer pancreático al desarrollar una tromboflebitis migratoria. Más de un tercio de los pacientes desarrollan una distensión palpable de la vesícula biliar, denominado signo de Courvoisier por ser descrita por el cirujano suizo del mismo nombre (1843 a 1918) (Howard J.M. et al., 2002).

Presentaciones menos frecuentes incluyen pancreatitis aguda, hipoglicemia, hipercalcemia, carcinoma metastásico de primario desconocido y endocarditis.

Pacientes con carcinoma localizado en cuerpo o cola de páncreas se presentan frecuentemente con pérdida de peso, dolor abdominal y/o de espalda o metástasis a distancia (Cubilla A.L. y Fitzgerald P.J., 1979). En pacientes con enfermedad metastásica avanzada se pueden encontrar nódulos periumbilicales palpables. Este hallazgo se denomina el signo de la Hermana Mary Joseph, observado por la asistente de cirugía del Doctor William Mayo, que asoció nódulos periumbilicales palpables a una enfermedad maligna abdominal metastásica (Howard J.M. et al., 2002).

Como se ha comentado anteriormente, la Diabetes Mellitus no solo aumenta el riesgo de CP, sino que también es una complicación de la lesión. Más del 70% de los pacientes con CP tienen niveles de glucosa en sangre por encima de 120 mg/dL en el momento de la presentación de la enfermedad. De la misma forma, la pancreatitis crónica puede contribuir al desarrollo y, al mismo tiempo, ser consecuencia de la enfermedad, a causa de la destrucción tisular y la obstrucción ductal por la neoplasia.

La depresión es frecuente en estos pacientes (Carney C.P. et al., 2003), aunque en muchos casos el conocimiento del pronóstico del propio CP por los pacientes puede contribuir al desarrollo de la misma.

1.1.4. DIAGNÓSTICO DEL ADP

El diagnóstico del ADP actualmente se realiza a partir del estudio conjunto de una analítica de sangre, de técnicas de imagen como son la ecografía, el TAC o la RM y de la biopsia pancreática.

1.1.4.1. ESTUDIO BIOQUÍMICO:

No existen unos criterios analíticos para el diagnóstico de cáncer de páncreas. Ante la sospecha clínica de un cáncer de páncreas se realiza una analítica de sangre general que nos permite detectar si existen o no alteraciones en diversas determinaciones, como pueden ser una alteración en la eliminación de la bilirrubina, o la alteración de las cifras de glucosa en sangre.

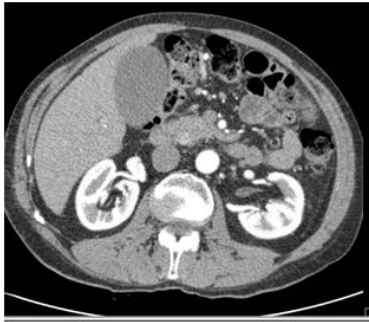
Otro marcador reflejado en las analíticas es el CA19.9, marcador tumoral más común en el ADP. El grado de elevación de Ca19.9, tanto en la presentación inicial como tras la cirugía se asocia con el pronóstico a largo plazo (Barton J.G. et al., 2009; Distler M. et al., 2013). Además, puede predecir la presencia de metástasis radiológicamente ocultas. Sin embargo, mientras que los niveles de Ca19.9 pueden servir de ayuda para seleccionar a los pacientes que se beneficien de una resección quirúrgica, la Guía ASCO no lo recomienda como criterio de inoperabilidad. La mayor utilidad de este marcador es en el seguimiento de los pacientes operados y en la valoración de la respuesta a los tratamientos.

El CEA también puede estar elevado y en ese caso puede ser útil en el manejo de estos pacientes.

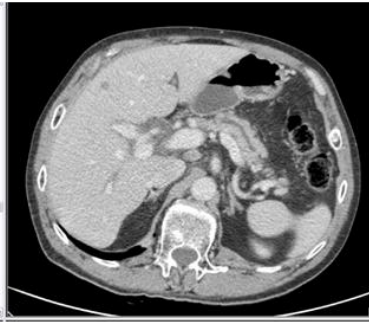
1.1.4.2. ESTUDIO RADIOLÓGICO:

Tanto la ecografía (ya sea su variante transabdominal como endoscópica) como la tomografía computerizada (TC) la resonancia magnética (RM), la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) o la tomografía por emisión de positrones (PET) son técnicas de imagen que se utilizan para el estudio de masas pancreáticas (Paspulati R.M., 2005; Keppke A.L. et al., 2005; Rizk M.K. et al., 2007).

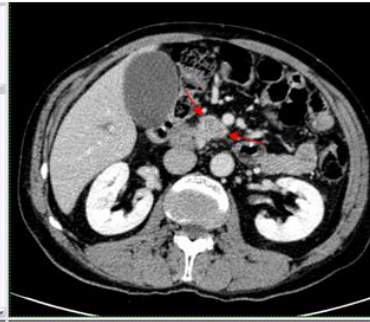
La TC con contraste endovenoso es la técnica más frecuentemente utilizada tanto para el diagnóstico como para el estadiaje, y de gran ayuda en la decisión del manejo terapéutico (categorizando el tumor como “resecable”, “irresecable” o “borderline”) (Al-Hawary M.M. et al., 2014), básicamente en función de la existencia o no de afectación vascular. La técnica de TC ha mejorado mucho en las últimas décadas, llegando a diagnósticos con una exactitud del 90% (Valls C. et al., 2002; Park D.I. et al., 2001). El ADP en la TC se presenta como una masa hipodensa que deforma el tamaño y los contornos normales de la glándula. Con frecuencia se observa un área central de señal más atenuada y suelen presentar unos márgenes poco definidos. Si la neoplasia afecta la cabeza del páncreas, la cola pancreática suele mostrar cambios radiológicos de pancreatitis obstructiva (conducto pancreático dilatado con atrofia del parénquima). El signo del “doble ducto”, que se refiere a la dilatación tanto del conducto biliar como del pancreático, es una característica del ADP localizado en cabeza de páncreas. Signos tempranos en el TAC incluyen la dilatación del conducto pancreático y un stop abrupto del mismo (Gangi S. et al., 2004).



TC CON CONTRASTE (FASE ARTERIAL)
Masa hipodensa cabeza pancreática (signo primario)

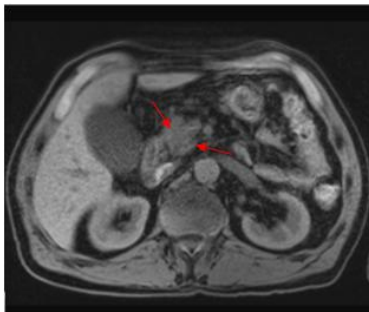


TC CON CONTRASTE (FASE PORTAL o venosa)
Dilatación Wirsung (signo secundario)

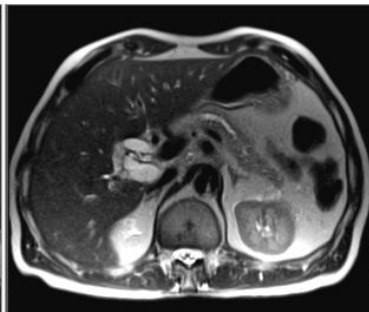


TC CON CONTRASTE (FASE PORTAL o venosa)
Masa hipodensa cabeza pancreática (signo primario)

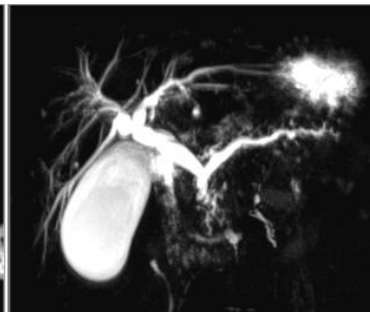
En el estudio con RM, el ADP suele aparecer como una masa mal definida hipointensa en secuencias potenciadas en T1 y con intensidad de señal variable en secuencias potenciadas en T2, normalmente hipovascular tras la administración de contraste endovenoso (Tamm E.P. et al., 2007).



RM (Secuencia T1-FAT SAT SIN CONTRASTE)
Masa hipointensa en cabeza pancreática
(signo primario)



RM (Secuencia T2 SIN CONTRASTE)
Dilatación Wirsung y atrofia de cuerpo-cola
pancreáticas. Dilatación vía biliar principal
(signos secundarios)



COLANGIORM
Signo del "doble conducto" : Dilatación Wirsung y
biliar

La CPRE se suele utilizar para visualizar el conducto pancreático y, por consiguiente, sirve para demostrar la localización de cualquier lesión ductal.

La EUS (Ecoendoscopia) permite realizar la toma de muestra, tanto de la tumoración como de ganglios linfáticos, en el mismo acto, mediante una punción aspiración con aguja fina (PAAF) y/o una biopsia con aguja gruesa (BAG)

La CPRE visualiza el sistema ductal pancreático. EL ADP puede diagnosticarse indirectamente a partir de la interpretación de los cambios en la arquitectura del árbol ductal. Es una técnica más invasiva que las anteriores y se asocia a un 2% de complicaciones, por lo que no es una técnica de primera línea para la evaluación de las neoplasias pancreáticas.

1.1.4.3. ESTUDIO MORFOLÓGICO:

Hoy en día los criterios morfológicos siguen siendo claves en la clasificación de los tumores pancreáticos. Pero para ello, con frecuencia, se requiere aplicar técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas e incluso de biología molecular.

1.1.4.3a. Características macroscópicas

La mayor parte de los cánceres pancreáticos asientan en cabeza pancreática (60-70%), pudiéndose originar también en el cuerpo (15-20%), en la cola (5%) o afectar difusamente a toda la glándula (20%) (Hruban R.H. et al., 2007). Los carcinomas que se originan en la cabeza del páncreas son más tributarios de resección que los que se localizan en cuerpo o cola, y por ello están sobrerrepresentados en la mayoría de las series quirúrgicas. La gran mayoría de los carcinomas pancreáticos se presentan como tumor único, pero se pueden dar formas multifocales. Excepcionalmente se han descrito cánceres originados en tejido ectópico pancreático.

El tamaño de los ADP es muy variable, pudiendo ir desde lesiones microscópicas hasta masas de gran tamaño (pueden alcanzar hasta 10 cm). El tamaño medio de los carcinomas resecados en la cabeza del páncreas es de 3 cm, mientras que carcinomas localizados en cola de páncreas tienden a ser más grandes, con una media de 5 cm en el momento del diagnóstico. Normalmente, el cáncer de páncreas se acompaña de aumento del tamaño de la glándula

Al corte la masa tumoral es firme, de límites mal definidos, estrellados, de coloración blanquecino-amarillenta y altera la arquitectura normal del páncreas. En algunos casos, el carcinoma puede ser prácticamente indistinguible de las áreas fibrosas adyacentes, correspondientes a pancreatitis crónica, haciendo difícil establecer las dimensiones exactas del mismo. Las zonas infiltradas por el carcinoma suelen tener una textura más granular que los focos de pancreatitis.

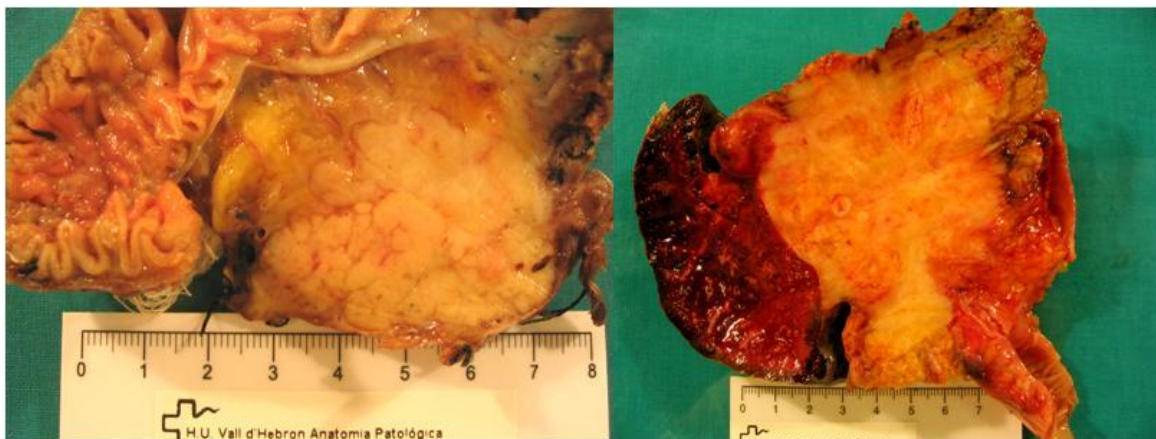


Fig.1 Ejemplos de visión macroscópica de carcinomas de páncreas. A. Tumor localizado en cabeza de páncreas de límites mal definidos, estrellados, de coloración blanquecino-amarillenta; B) tumor localizado en cuerpo-cola de páncreas, de gran tamaño, con infiltración de asas intestinales, tejido adiposo peripancreático e hilio esplénico.

La mayoría de los carcinomas de páncreas son sólidos, pero algunos, particularmente los de mayor tamaño, pueden presentar focos de quistificación. Los cambios quísticos pueden deberse a necrosis tumoral y, en tal caso, se observa un gran quiste degenerativo en el centro de la neoplasia; en otros casos, los quistes se observan adyacentes al carcinoma a causa de la dilatación de ductos obstruidos (quistes de retención). Finalmente, algunos carcinomas pancreáticos contienen glándulas neoplásicas dilatadas, lo suficientemente grandes como para poderlas apreciar al examen macroscópico.

El parénquima pancreático no neoplásico adyacente al carcinoma, normalmente presenta consistencia firme y aspecto atrófico, debido a una pancreatitis crónica. En contraste con las neoplasias mucinosas papilares intraductales, los ductos pancreáticos dilatados por un carcinoma pancreático obstructivo tienen un revestimiento liso y contienen líquido fluido más que moco denso. Carcinomas localizados en la cabeza de la glándula provocan con frecuencia estenosis del conducto biliar intrapancreático con dilatación del resto de conducto proximal que, a su vez, presenta paredes engrosadas. Existen carcinomas difusos que, al examen macroscópico de la pieza, pueden tener aspecto de pancreatitis crónicas.

La mayoría de los carcinomas pancreáticos infiltran más allá de la glándula. La zona más peligrosa, por su proximidad a la vena mesentérica, es el proceso uncinado, el cual debe pintarse con tinta china para su valoración microscópica posterior. La invasión de grandes vasos, con estenosis y trombosis, es frecuente, así como la infiltración de la ampolla de Vater o de la pared duodenal.

Debido a que los carcinomas periampulares envuelven múltiples estructuras anatómicas, el examen macroscópico, en ocasiones, es imposible de determinar el verdadero origen del proceso neoplásico. Neoplasias de gran tamaño pueden invadir duodeno, peritoneo, estómago, colon transverso, yeyuno, glándula suprarrenal, riñón, uréter e incluso, vesícula biliar.

Los carcinomas de cola de páncreas, debido a su estado más avanzado de progresión en el momento del diagnóstico, infiltran frecuentemente retroperitoneo, bazo, glándula suprarrenal izquierda e intestino (Cubilla A.L. y Fitzgerald P.J., 1978).

1.1.4.3b. Características microscópicas:

El adenocarcinoma ductal infiltrante del páncreas es una neoplasia epitelial invasiva, que forma glándulas productoras de mucinas y produce una intensa reacción desmoplásica. El grado de diferenciación varía desde un ADP bien diferenciado, con glándulas bien formadas, productoras de moco, en ocasiones difícil de distinguir de glándulas reactivas, hasta glándulas con una celularidad pobremente diferenciada, productora focal de mucina intracelular, que infiltra de forma individual o en nidos sólidos.

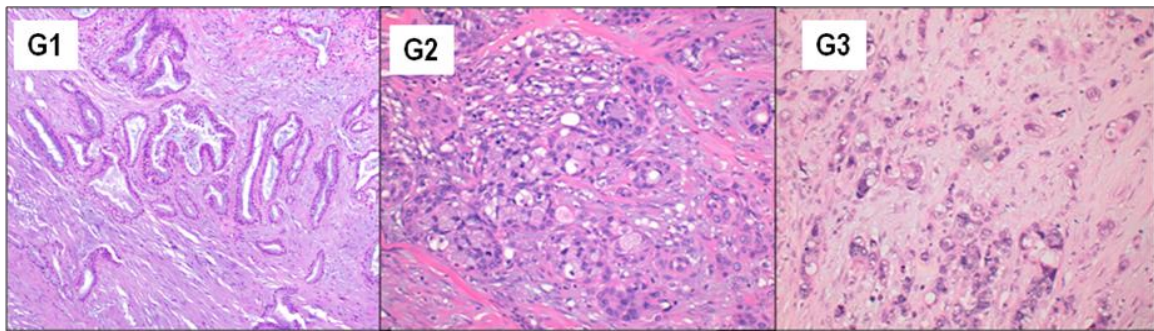


Fig. 2 Fotografías microscópicas de los diferentes grados histológicos de diferenciación tumoral

Las glándulas neoplásicas se distribuyen de forma desorganizada, lo que las diferencia de los ductos pancreáticos normales y de los atróficos benignos, que presentan una estructura lobular ramificada bien desarrollada y preservada, aún cuando existan cambios de pancreatitis crónica.

Así mismo, en el páncreas normal los ductos de pequeño y mediano tamaño están presentes en el centro de los lóbulos, mientras que las arterias corren en el tejido conectivo en la periferia de los lobulillos. Así observamos que los ductos están rodeados por acinos separados anatómicamente de las estructuras vasculares. Las glándulas neoplásicas alteran esta organización arquitectural y se pueden encontrar inmediatamente adyacentes a las estructuras vasculares, sin que intervengan acinos o estroma, observación muy útil y a tener en cuenta en los estudios intraoperatorios ante la sospecha de adenocarcinoma.

Virtualmente todos los ADP provocan una intensa reacción desmoplásica del estroma adyacente, en la que están presentes colágeno, miofibroblastos, linfocitos y otras células inflamatorias. Esta reacción desmoplásica es la que confiere la consistencia firme a la mayoría de los carcinomas pancreáticos. Estructuras pancreáticas normales, incluyendo islotes de Langerhans, se encuentran con frecuencia atrapadas en esta reacción desmoplásica. Como consecuencia de ello, en la mayoría de los cánceres pancreáticos, el componente epitelial neoplásico comprende sólo una pequeña proporción del volumen del tumor. Se pueden observar focos de hemorragia, necrosis central y degeneración quística, sobre todo en carcinomas de gran tamaño.

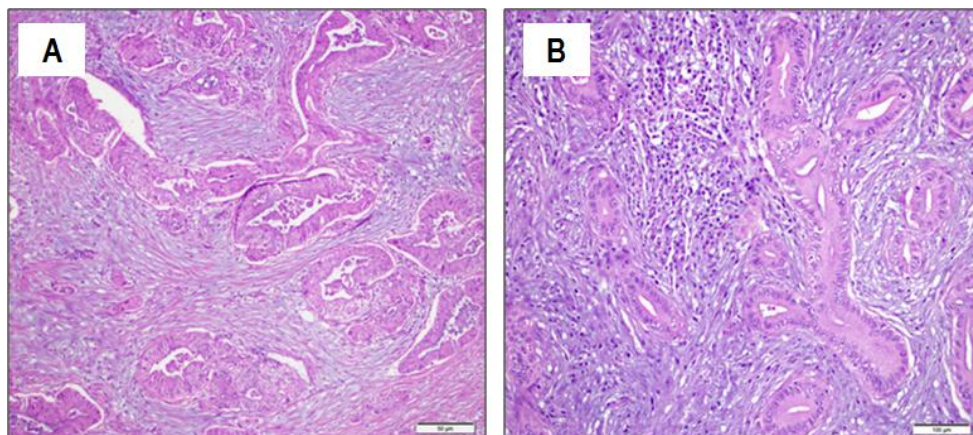


Fig. 3. Fotografías microscópicas de la reacción A) desmoplásica y B) inflamatoria que suelen acompañar al ADP.

Los ADP son neoplasias extraordinariamente invasivas. No solamente infiltran el tejido conectivo estromal pancreático sino que también lo hacen a través y a lo largo de estructuras preexistentes. El 70% de los ADP crecen a través y a lo largo de ductos pancreáticos normales, particularmente de ramas de gran calibre, imitando una neoplasia intraepitelial pancreática, y el 75% de los casos lo hacen a lo largo de nervios (espacios perineurales), localizados en el interior de la masa neoplásica, en los márgenes de la misma o en el páncreas no neoplásico, siguiendo el patrón de distribución de los nervios retroperitoneales a lo largo de la glándula. Se han descrito casos excepcionales de presencia de glándulas benignas en el perineuro, pero son fenómenos muy poco frecuentes.

Los ADP infiltran con frecuencia linfáticos y vasos sanguíneos. En la estructura normal del páncreas, los vasos linfáticos discurren junto con los sanguíneos y la invasión de ambas estructuras, mayoritariamente de las estructuras venosas, se ve en gran parte de los casos. Éstas, mal definidas en la tinción de HE, deben ponerse de manifiesto con tinción histoquímica de fibras elásticas. La invasión linfática está asociada a metástasis ganglionares.

La invasión del duodeno y de la grasa peripancreática también es frecuente. Cuando el adenocarcinoma infiltra epitelios pre-existentes, como los ductales o el duodenal, las células neoplásicas normalmente crecen a lo largo de la membrana basal epitelial, patrón de crecimiento que puede imitar un carcinoma in situ ductal biliar o un adenoma de duodeno o ampula. En estos casos una transición abrupta entre el epitelio normal y el invasor es la clave para diagnosticar un adenocarcinoma invasor.

1.1.4.3c. Gradación histológica:

Se desarrollaron diferentes sistemas para graduar el adenocarcinoma de páncreas. Klöppel (Klöppel G. et al., 1985) desarrolló un sistema bien definido que incorporaba el grado de diferenciación glandular, la producción de mucina, la atipia nuclear y el conteo mitótico (tabla 2).

Tabla 2. Gradación histológica del cáncer pancreático (Klöppel H. et al., 1996; Hruban R.H. et al., 2007)

Grado tumoral	Diferenciación glandular	Producción de mucina	Mitosis (x10CGA)	Atipia nuclear
1	Glándulas ductal-like bien diferenciadas	Intensa	≤ a 5	Polarización, pleomorfismo leve
2	Estructuras ductal-like moderadamente diferenciadas y glándulas tubulares	Irregular	6-10	Pleomorfismo moderado
3	Glándulas poco diferenciadas, estructuras mucoepidermoides y pleomórficas	Escasa	>10	Pleomorfismo marcado y aumento del núcleo

Actualmente, se utilizan sistemas más simples, como el TNM (T (tumor) N (ganglios) M (metástasis)), estadiaje formulado po la American Joint Committee Cancer (AJCC Staging. Séptima edición) junto con la Union for International Cancer Control (UICC), que se correlacionan muy bien con el propuesto por Klöppel y son más prácticos a la hora de utilizarlos.

T: tumor primario:

Tx: no puede asegurarse.

T0: no evidencia de tumor primario.

Tis: carcinoma in situ.

T1: tumor limitado al páncreas, de 2 cm ó menos.

T2: tumor limitado al páncreas, mayor de 2 cm.

T3: tumor extendido más allá del páncreas pero sin afectación de TC o AMS.

T4: tumor afecta a TC o AMS (irresecable).

N: ganglios regionales:

Nx: desconocido.

N0: no ganglios afectados.

N1: ganglios afectados.

M: metástasis a distancia:

M0: no hay metástasis a distancia.

M1: metástasis a distancia.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio II A	T3	N0	M0
Estadio II B	T1 – T3	N1	M0
Estadio III	T4	Cualquier N	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

En el informe anatomopatológico, a parte del TNM, debe constar el grado de diferenciación tumoral (G1: bien diferenciado, más del 95% del tumor constituido por glándulas; G2: moderadamente diferenciado, del 50 % al 95% del tumor constituido por glándulas; G3: pobremente diferenciado, del 5% al 49% del tumor constituido por glándulas; G4: indiferenciado, menos del 5% del tumor constituido por glándulas). Muy frecuentemente se observan combinaciones de diferentes grados de diferenciación. En estos casos, el grado asignado al carcinoma debe ser el que refleje el peor grado representado en un porcentaje significativo del carcinoma.

1.1.5. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA ACTUAL DEL ADP

1.1.5.1 ADENOCARCINOMA DUCTAL CONVENCIONAL.

1.1.5.2. VARIANTES DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

- Carcinoma adenoescamoso
- Carcinoma coloide (mucinoso quístico)
- Carcinoma hepatoide
- Carcinoma medular
- Carcinoma en anillo de sello
- Carcinoma indiferenciado
- Carcinoma indiferenciado con células gigantes osteoclasto-like

Tabla 3. Resumen de las características de las variantes histológicas del ADP

Variantes histológicas	Características
Adenocarcinoma ductal convencional	- Comprende el 85% de los carcinomas exocrinos de páncreas - Características descritas en los anteriores apartados - Supervivencia media: 10 meses
Carcinoma adenoescamoso (1)	- Comprende el 3-4% de los carcinomas exocrinos de páncreas - Edad media al diagnóstico: 63 años, más frecuente en hombres - Presentación clínica y localización similares al ADP convencional - El componente escamoso debe comprender al menos el 30% de la neoplasia - Inmunofenotipo del componente glandular similar al ADP; el componente escamoso expresa CK5/6, CK13 y CD44 - La mayoría presentan mutación del gen KRAS - Peor pronóstico que el ADP, con supervivencia media de 6 meses durante el primer año tras el diagnóstico.
Carcinoma coloide (carcinoma mucinoso quístico)	- Comprende el 1-3% de los carcinomas exocrinos de páncreas - Edad media al diagnóstico: 65 años, el 55% en hombres - Presentan mayor tamaño que el ADP, tamaño medio 4'5 cm (rango, 1 a 16 cm). Se asocia a tromboflebitis migratoria (Síndrome de Trousseau) - Caracterizado por la presencia de células neoplásicas productoras de moco suspendidas ("flotando") en lagos de mucina extracelular - El componente coloide debe comprender al menos el 80% de la neoplasia - La mayoría presentan mutación del gen KRAS y el 25% mutación de p53
Carcinoma hepatoide (2)	- Muy pocos casos descritos en la literatura - Caracterizado por presentar un componente significativo de la neoplasia con diferenciación hepatocelular, con inmunofenotipo positivo para Hep Par-1, CEA, CD10 y alfa-FP - Pronóstico no definido por la baja incidencia
Carcinoma medular	- Reconocido a raíz de un estudio de inestabilidad de microsatélites en carcinoma de páncreas

	<ul style="list-style-type: none"> - Edad media al diagnóstico: 68 años, más frecuente en hombres - Mejor circunscrito que el ADP, con una consistencia blanda - Caracterizado por nidos celulares poco diferenciados, con bordes bien definidos, patrón de crecimiento sincitial y necrosis - Asociados a inestabilidad de microsatélites (hipermetilación del promotor de MLH1) - Mejor pronóstico que el ADP convencional, con supervivencia media de 62 meses.
Carcinoma en anillo de sello (3)	<ul style="list-style-type: none"> - Son muy raros, con muy pocos casos descritos en la literatura. - El componente predominante se caracteriza por la presencia de células neoplásicas infiltrantes, redondas, no cohesivas, que contienen mucina intracitoplasmática. Se asocian a mucina extracelular, pero no forman grandes lagos como en el caso del carcinoma coloide. - La mayoría de las células expresan CEA y CKs de forma intensa. - Algunos pacientes presentan unos niveles muy elevados de CEA en sangre. - Pronóstico no definido por la baja incidencia
Carcinoma indiferenciado	<ul style="list-style-type: none"> - Comprende el 0'3-10% de los carcinomas exocrinos de páncreas - Edad media al diagnóstico: 63 años, mucho más frecuente en hombres (ratio H:M: 3:1) - Presentan un gran tamaño, tamaño medio 9'5 cm (rango, 2'5 a 20 cm). - Un componente significativo de la neoplasia no presenta estructura glandular u otra característica de diferenciación específica - El 80% de los carcinomas expresan CKs (CK7, 18, 19), Vimentina, CEA y Ca19.9 - La mayoría presentan mutación del gen KRAS y el 70% mutación de p53 - Muy mal pronóstico, con supervivencia media de 5'2 meses tras el diagnóstico
Carcinoma indiferenciado con células gigantes osteoclasto-like	<ul style="list-style-type: none"> - Mínima incidencia - Edad media al diagnóstico: 62 años, el 55% en hombres - Presentan un tamaño variable, (de 3 a 17 cm). - Caracterizado por la presencia de células gigantes multinucleadas de apariencia benigna entremezcladas con células mononucleadas atípicas - El componente mononuclear expresa Vimentina y unas pocas células CK, CEA, EMA. A veces son negativas para los marcadores epiteliales. Las células multinucleadas expresan CD68, CD45, Vimentina y Alfa1-AT y son negativas para CK, CEA y EMA. - El 90% presentan mutación del gen KRAS - Mal pronóstico, con supervivencia media de 12 meses tras el diagnóstico

(1) Cameron J.L. et al., 2006; (2) Cubilla A.L. y Fitzgerald P.J., 1979; (3) Andea A. et al., 2003

1.1.6. ESPECTRO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL ADP

No existe un único marcador 100% sensible y específico. Por ello se desarrollan paneles de marcadores que, cuando se dan juntos, pueden ser herramientas útiles para identificar y clasificar los cánceres pancreáticos.

Tabla 4. Inmunofenotipo en el diagnóstico del ADP

Marcador IHQ	% de casos de ADP
Citoqueratinas 7, 8, 13, 18 y 19	La mayoría, 90-100%
CK17 y CK20	50% y <20%, respectivamente
CEA, CA19.9, B72.3 (TAG-72), CA125 y DUPAN-2.	80-92%
MUC1 (mucina pan-epitelial), MUC3, MUC4 y MUC5AC (mucina gástrica foveolar)	90-95%
MUC6 (mucina de glándula pilórica)	25%
MUC2	< 10%
Mesotelina, APCM, Claudina	90-100%, 60% y 100%, respectivamente
Fascina, S-100A4, S-100A6 y S-100P	95%
Survivina (proteína antiapoptótica)	75%
Cyclooxygenasa-2, 5-lipooxigenasa y el receptor del Leucotrieno B4	70-90%
Pérdida completa de Smad4 (Dpc4), p16	55% y >90%, respectivamente
Acúmulo nuclear anormal de p53 (expresión anormal: reactividad en >20% de los núcleos)	50-75%
Vimentina, Tripsina, Quimotripsina, Lipasa	No se expresan

(Rosty C. et al., 2002; Van Heek T. et al., 2002; Lee M.J. et al, 2003; Swierczynski S.L. et al., 2004; Qiao J.G. et al., 2004).

1.1.7. COMPORTAMIENTO DEL ADP

Como ya se ha comentado anteriormente, la mayoría de ADP se encuentra en estadios avanzados en el momento del diagnóstico. Sólo un 10-20% son resecables quirúrgicamente y, en el momento de la cirugía, muchos han metastatizado a ganglios regionales (Conlon K.C. et al., 1996; Nagakawa T. et al., 1993; Niederhuber J.E. et al., 1995; Sener S.F. et al., 1999).

En la mayoría de los casos se observa invasión perineural y linfática, establecidos como factores de mal pronóstico. En 3/4 de los ADP resecados se asocia invasión perineural en el plexo nervioso perineural

extrapancreático (Hirai I. et al., 2002; Takahashi S. et al., 2001). Este hallazgo está presente en el 60% de las resecciones de ADP de cabeza. La invasión linfática se identifica en la mayoría de los casos y está asociada a metástasis de ganglios linfáticos, presente en el 70% de los ADP resecados de cabeza y en el 80% de ADP resecados de cuerpo y cola (Hruban R.H., 2007). La afectación linfática está presente incluso cuando el carcinoma primario es pequeño (menor a 2 cm).

El ADP frecuentemente se extiende a estructuras vasculares peripancreáticas. Estos incluyen vasos del axis celíaco y la AMS. La invasión venosa portal se ve en una cuarta parte de dichos tumores. La afectación de grandes vasos puede hacer irresecable el tumor.

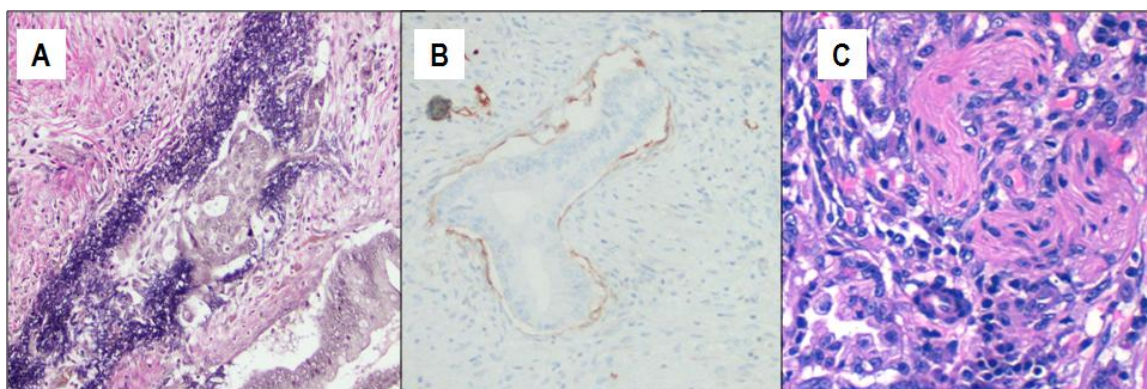


Fig. 4. Fotografías microscópicas de (A) invasión vascular, marcado con HQ para fibras elásticas, (B) invasión linfática, marcado con IHQ para D2-40, (C) invasión perineural.

La mayoría de ADP invade el peritoneo y se observa citología peritoneal positiva en el 15% de los pacientes con neoplasias radiológicamente resecables (Merchant N.B. et al., 1999).

Las metástasis a distancia son frecuentes. Las localizaciones más frecuentes, en orden decreciente, son el hígado (65% de los pacientes con ADP en estudios autópsicos), establecido como factor de mal pronóstico, el pulmón (35% de los pacientes con ADP en estudios autópsicos), glándulas suprarrenales y la piel. También se han descrito en otros órganos (hueso, cerebro, corazón, riñón, ovarios, etc). Destacar que de un 25% a un 50% de los pacientes con ADP resecables tienen células epiteliales atípicas en médula ósea. (Roder J.D. et al., 2003).

1.1.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL ADP

El diagnóstico del cáncer pancreático tiene una gran importancia clínica ya que, el carcinoma pancreático bien diferenciado puede simular una amplia variedad de procesos completamente benignos. Así mismo, la localización retroperitoneal del páncreas hace dificultoso su acceso para obtener una muestra biopsica y, como resultado de ello, las muestras suelen ser escasas o inadecuadas para el diagnóstico. La

realización de técnicas específicas, como la ecoendoscopia, permite la toma dirigida de muestras y un mejor estudio diagnóstico. La aplicación meticulosa de criterios diagnósticos bien establecidos es la única vía para evitar errores graves.

Tabla 5. Diagnóstico Diferencial del ADP

Entidad	Diferencias con el ADP
Pancreatitis crónica (1)	Proceso inflamatorio, con glándulas que mantienen arquitectura lobular, con nucléolo único, regular. No necrosis luminal. No invasión perineural ni vascular. Puede simular clínica-, macroscópica- y microscópicamente el ADP. IHQ: todas expresan la proteína Dpc4 y la mayoría de las glándulas reactivas no expresan CEA, B72.3, CA125 o p53.
Carcinoma pancreático de células acinares	Neoplasia exocrina pancreática, hiper celular, con formación de acinos, núcleo con polarización basal, citoplasma granular y nucléolo único prominente. IHQ: expresan CAM5.2, Tripsina y Quimotripsina, alfa-1-A; focal Cromogranina, Sinaptofisina y CD56; no expresan CK7, CK19, Ca19.9 ni CEA en la mayoría de los casos.
Pancreatoblastoma (PB)	Aunque la mayoría de PB se da en niños, más de 1/3 de los PB se dan en adultos. Presencia de nidos escamoides y diferenciación acinar. Nucleolo prominente. Estroma +/- abundante. IHQ: expresan CAM5.2, CK19, Ca19.9, Tripsina y Quimotripsina, alfa-1-AT, Cromogranina, Sinaptofisina y CD56.
Neoplasias sólidas pseudopapilares	Se presentan en mujeres en la 2ª década, hecho que los distingue del ADP. Formación de pseudopapilas sin formar verdaderas glándulas, con células poligonales uniformes. Hendiduras nucleares. Presencia de glóbulos hialinos y cristales de colesterol. IHQ: expresan vimentina, CD10 y alfa-1-AT.
Neoplasia endocrina bien diferenciada	Neoplasias de páncreas endocrino, sólidas. Patrón de crecimiento organoide en nidos, trabecular o cribiforme. Cromatina nuclear en "sal y pimienta" IHQ: expresión (+) para Cromogranina, Leu-7, Sinaptofisina y ENS (se puede observar expresión de estos marcadores en la base de las células epiteliales neoplásicas en ¼ hasta 1/3 de los ADP, pero raramente la expresión es difusa). También expresan CAM5.2, CK19, Ca19.9, alfa-1-AT y CD56.
Carcinoma renal de células claras metastásico (2)	Células con citoplasma con varias vacuolas (en ADP, vacuola única), con núcleo redondo y central y nucléolo prominente. IHQ: expresan Vimentina, CD10 y no CK7
Carcinoma gástrico de células en anillo de sello metastásico	Presencia de células en anillo de sello IHQ: CK20 (+) y CK7(-).
Carcinoma lobulillar de mama metastásico	Células no cohesivas, individuales, en hilera IHQ: expresan receptores hormonales
Melanoma metastásico	Presencia de pigmento pardo. IHQ: expresan marcadores melanocíticos (S-100, Melan A, HMB45, Tirosina).

(1) Thompson L.D. y Heffess C.S., 2000; (2) Adsay N.V. et al., 2004.

1.1.9. TRATAMIENTO DEL ADP

Como ya se ha comentado anteriormente, el adenocarcinoma ductal de páncreas es un importante problema de salud en nuestro medio, tanto por su creciente incidencia como por su elevada mortalidad. El factor más importante que determina el pronóstico del paciente es la resecabilidad del tumor (Kuhlmann K.F. et al., 2004; Neoptolemus J.P. et al., 2004).

Para la toma de decisiones clínicas, el cáncer de páncreas se clasifica en resecable, localmente avanzado y metastásico.

1.1.9.1. PRINCIPIOS DE TRATAMIENTO QUIRÚRGICO:

La cirugía requerida para tratar el cáncer de páncreas es agresiva. Para optimizar sus resultados, es necesario seguir una serie de criterios de forma estricta:

- CRITERIOS DE INOPERABILIDAD:

Son criterios aceptados de inoperabilidad: ASA IV (Paciente con enfermedad sistémica grave e incapacitante, que supone una amenaza vital), hepatopatía, enfermedad psiquiátrica grave, enfermedad cardiopulmonar significativa y cualquier otro tipo de comorbilidad severa. La edad por sí sola no es una contraindicación absoluta, pero hay que tener en cuenta que la reserva fisiológica de los pacientes mayores de 75 años está disminuida.

- CRITERIOS DE RESECABILIDAD:

a. Tumores resecables:

Se consideran tumores resecables aquellos que cumplen los siguientes criterios:

- a) Ausencia de enfermedad extrapancreática.
- b) No evidencia de afectación en arteria mesentérica superior (AMS), tronco celiaco (TC) ó arteria hepática (AH), definida como la presencia de tejido normal en el plano entre el tumor y las arterias.
- c) La afectación de la confluencia entre vena mesentérica superior- vena porta (VMS-VP), si la resección y reconstrucción son posibles, no es criterio de irresecabilidad. La American Hepato-Biliary Association (AHPBA/SSO) define en su consenso como tumor resecable aquellos que en la TAC no hay evidencia de contacto, distorsión, trombo o englobamiento de VMS o VP.

b. Tumores irresecables:

Se consideran irresecables los tumores que presenten alguna de las siguientes características:

- a) Infiltración extrapancreática incluyendo tejido linfático, ganglios y tejidos peripancreáticos y/o metástasis a distancia.

- b) Afectación de más de la mitad de la circunferencia u oclusión/trombosis de VMS o la confluencia con VP, sin posibilidades de reconstrucción.
- c) Afectación de arteria mesentérica superior (AMS), cava inferior, aorta, tronco celíaco (TC) ó arteria hepática (AH), definido como la ausencia del tejido graso normal (hipodenso en el TC) en el plano de separación entre el tumor y la arteria.

Se recomienda la concordancia de 2 pruebas radiológicas para valorar un tumor como irresecable.

c. Enfermedad resecable borderline:

En los últimos años se ha definido un grupo de pacientes con entidad propia, los que tienen características de resecabilidad borderline que, si bien es pequeño en números absolutos, puede alcanzar supervivencias largas, de hasta 40 meses según la serie más numerosa, si reciben un tratamiento multidisciplinar.

La definición de enfermedad de resecabilidad borderline es variable. Algunos autores reservan este término para casos con afectación tumoral focal (menos del 50% de la circunferencia) de arterias viscerales, ó segmento corto de VMS, ó la confluencia de VMS – VP, ó arteria hepática. La clasificación más aplicable en nuestro medio es la definida por la American Hepato-Biliary Association (AHBPA/SSO), según la cual se consideran de resecabilidad borderline los tumores con:

- Afectación venosa de VMS/VP por tumor en proximidad, con o sin contacto y estrechamiento de la luz, englobamiento de VMS/VP pero sin afectar las arterias, ó segmento corto ocluido por trombo ó infiltración.
- Afectación de arteria gastroduodenal ó hepática en un segmento corto sin extensión al tronco celíaco.
- Afectación de AMS que no exceda $> 180^\circ$ de su circunferencia.
- Tumores de cola-cuerpo con menos de 180° de afectación de la circunferencia de TC ó AMS.

1.1.9.2. TRATAMIENTO:

El único tratamiento curativo para el cáncer de páncreas es la cirugía, pero sólo el 15-20% de los tumores son resecables en el momento del diagnóstico. Tras la cirugía, la supervivencia a 5 años es de 25-30% para los pacientes sin afectación ganglionar y del 10% para los que presentan afectación ganglionar. Más de la mitad de las recurrencias son locorregionales sin metástasis a distancia, por lo que el tratamiento adyuvante estudiado incluye radioterapia y/o quimioterapia. El porcentaje de casos subsidiarios a cirugía es aún menor en aquellos de cuerpo y cola (American Cancer Society, Cancer facts 2014), beneficiándose de cirugías de gran complejidad y morbilidad, y de tratamientos adyuvantes o neoadyuvantes con quimioterapia y radioterapia.

1.1.9.2a TUMOR LOCALIZADO RESECABLE

a.1. Cirugía

La duodenopancreatectomía cefálica (DPC) es la técnica más ampliamente utilizada. Obtiene cifras de supervivencia a 5 años del 10–25%. El factor pronóstico más importante es la afectación ganglionar que modifica la supervivencia de un 25-30% (N0) a un 10% (N1). La supervivencia mediana es de 17-23 meses. Otros factores que influyen en la supervivencia son: tumor < 3 cm; márgenes negativos; bien diferenciado; localización en cabeza; pérdidas hemáticas intraoperatorias < 750 ml (Orr R.K., 2010; Fernandez-Cruz L. et al., 2012).

- DPC o intervención de Kausch-Whipple: se resecan el antro gástrico, duodeno, cabeza pancreática, primera asa yeyunal y porción distal de colédoco y vesícula biliar. El remanente de cuerpo y cola de páncreas se anastomosa al yeyuno T-L, ó T-T o al esófago. Se realiza la hepático-yeyunostomía y la gastroyeyunostomía. En los últimos años, esta técnica ha conseguido resultados de supervivencias a los 5 años del 3 – 24%. Cuando el tumor presenta características favorables (menor de 3 cm, márgenes negativos, no afectación linfática y diploidía tumoral) la supervivencia alcanza el 40%.

- DPC con preservación pilórica (Traverso-Longmire): Descrita en 1944 por Watson, consiste en conservar el antro, píloro y unos centímetros de duodeno, para disminuir la incidencia de úlceras de boca anastomótica y mejorar el estado nutricional. En 1978 Traverso y Longmire le dieron mayor difusión y aunque se emplea sobre todo para lesiones benignas, también se usa en procesos malignos.

Se han realizado estudios comparando ambas técnicas, desde el punto de vista oncológico, con resultados similares. La preservación pilórica tiene la ventaja de que los enfermos ganan peso y su estado nutricional es mejor y la desventaja es el retraso del vaciamiento gástrico, que no es tan diferente de la DPC de Whipple (37% para la preservación y 34% para el Whipple); por tanto, hay muchos autores que la prefieren actualmente (Martin R.F. y Zuberi K.A., 2010).

- Pancreatoduodenectomía total, descrita por Ross y Porter. Presenta la ventaja de no tener que realizar la anastomosis pancreática, la extirpación de posibles focos multicéntricos y un mejor vaciamiento ganglionar; pero la mortalidad es similar a la DPC. Se asocia con importantes complicaciones nutricionales y metabólicas (diabetes lábil, osteopenia e hígado graso). Por ello está sólo indicada cuando se conoce que la lesión es multifocal o la sección del cuerpo pancreático está afectada por el tumor.

Según la localización del tumor, la cirugía puede ser diferente:

- Carcinoma de la cabeza de páncreas:

La DPC es la técnica de elección. La linfadenectomía se clasifica en estándar, radical y radical extensa.

- Carcinoma de cuerpo y cola de páncreas:

La resección incluye la sección del páncreas (a la derecha del eje esplenoportal), sección de arteria esplénica en el origen, y de venas mesentérica inferior y esplénica en su origen en la desembocadura de la porta. Se reseca el tejido conectivo del tronco celíaco. Dependiendo de la linfadenectomía se clasifica en estándar o radical.

a.2.Tratamiento adyuvante

El primer tratamiento adyuvante que demostró beneficio en términos de supervivencia fue la quimioterapia con 5-fluorouracilo (425 mg/m²) y leucovorín (20 mg/m²). Los resultados en términos de supervivencia y en relación a los enfermos que no reciben quimioterapia son los siguientes (estudio ESPAC-1):

- Supervivencia mediana: 20.1 meses versus 15.5 meses (p=0.009).
- Supervivencia a 2 años: 40% versus 30% (p=0.009).
- Supervivencia a 5 años: 21% versus 8% (p=0.009).

Posteriormente, se han publicado datos de tratamiento adyuvante con Gemcitabina en cáncer de páncreas (estudio CONKO y ESPAC3). El tratamiento con Gemcitabina aumenta la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en relación a los no tratados (13.4 frente a 6.9 meses), tanto en pacientes con ganglios afectados y no afectados y en márgenes positivos y negativos. También mejora discretamente la supervivencia global (SG) (22.8 frente a 20.2 meses y SG a 5 años: 21% frente a 9%). En comparación con el tratamiento con 5-FU (estudio ESPAC3), ambos muestran supervivencias globales similares (23.6% vs 23%). Sin embargo, el tratamiento con 5-FU provoca más toxicidad (mucositis, diarrea y hospitalizaciones).

Basado en todo ello, algunos grupos recomiendan ofrecer quimioterapia complementaria con Gemcitabina a los pacientes intervenidos de adenocarcinoma de páncreas con resección macro y microscópicamente completa, con un índice de Karnofsky mayor o igual al 70% y en los que no haya contraindicación para la quimioterapia.

Asimismo, algunas guías de tratamiento recomiendan reevaluar la ausencia de diseminación tumoral antes del inicio del tratamiento adyuvante, particularmente en los pacientes que han tenido un postoperatorio prolongado a causa de diversas complicaciones. Con este fin, se aconseja realizar un TAC abdominopélvico y un análisis de Ca 19.9 antes de iniciar el tratamiento adyuvante. Si estos estudios indican enfermedad diseminada o persistente el paciente obtendría mayor beneficio de un enfoque paliativo de su tratamiento.

El tratamiento con radioterapia asociada a quimioterapia no ha demostrado beneficio en supervivencia e incluso puede ser perjudicial para los pacientes intervenidos de adenocarcinoma

de páncreas, a pesar de que es un tratamiento ampliamente aceptado en USA. Los tres grandes ensayos clínicos randomizados publicados hasta la actualidad en los que se comparan QT-RT frente a QT en el tratamiento adyuvante [GIST, ESPAC-1, EORTC], presentan resultados contradictorios, grandes sesgos en la randomización, dosis inadecuadas de Radioterapia, son estudios mal diseñados, y realizados con técnicas de irradiación obsoletas en la actualidad. En los últimos 25 años, ha habido grandes avances tecnológicos en las técnicas de Radioterapia tales como la planificación 3D, el abandono de esquemas obsoletos de split-course y el conocimiento actual de la dosis óptima de tratamiento en los tumores del aparato digestivo superior [50,4 – 54 Gys].

1.1.9.2b.TUMOR LOCALIZADO POTENCIALMENTE RESECABLE (BORDERLINE)

Es muy importante identificar este grupo antes de plantear el tratamiento.

b.1.Tratamiento neoadyuvante

El uso del tratamiento neoadyuvante en enfermedad con resecabilidad borderline permanece en debate. Aunque no se tiene un alto grado de evidencia, la mayoría de los centros adscritos a la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) lo incluyen dentro de sus protocolos debido a los resultados favorables presentados por numerosos ensayos clínicos Fase I/II o retrospectivos en los que la resecabilidad completa (R0) se consigue entre un 15 – 35% (McClaine R.J.et al., 2010; NCCN Guidelines, 2011).

El tratamiento que recomiendan algunos grupos es:

- 1º. Tratamiento sistémico con Gemcitabina + oxaliplatino durante 2 meses.
- 2º. Si no hay progresión, RT + QT basada en fluoropirimidinas.
- 3º. Si no hay progresión, cirugía a las 6 semanas.
- 4º. Gemcitabina durante 2 meses.

b.2.Cirugía

Además de la DPC descrita en los tumores resecables, la gran diferencia en estos casos es la resección venosa, ya que algunos grupos no consideran resecable la afectación arterial.

1.1.9.2c.TUMOR LOCALMENTE AVANZADO IRRESECABLE

La mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas presentan enfermedad localmente avanzada irresecable (CPLA) o metastásica (CPM) en el momento del diagnóstico. La mediana de supervivencia es de 8 a 12 meses en el CPLA y de 3 a 6 meses en el CPM. El objetivo del tratamiento no es curativo, sino sintomático paliativo.

El tratamiento en estos pacientes es controvertido, porque la mayoría de los ensayos están realizados en poblaciones heterogéneas. Tanto el esquema de inicio más apropiado, como el papel de la RT en este grupo de pacientes y la cirugía en pacientes con buena respuesta siguen siendo temas de debate.

En los centros de mayor experiencia se recomienda iniciar el tratamiento con QT basada en Gemcitabina durante 2-3 meses, seguida de QT-RT con 5-FU en infusión continua o Capecitabina en aquellos cuya enfermedad no progresa, y posteriormente seguir tratamiento con quimioterapia basada en Gemcitabina. La cirugía sólo está indicada en casos muy seleccionados.

En enfermedad localmente avanzada irresecable o borderline, la dosis a administrar de Radioterapia es similar a los tratamientos adyuvantes.

1.1.9.2d. ENFERMEDAD METASTÁTICA (O PACIENTES INOPERABLES)

El tratamiento del cáncer de páncreas metastásico es con Quimioterapia. El tratamiento con quimioterapia sistémica y agentes biológicos se ha mostrado eficaz en el control de los síntomas y en la mejoría de la supervivencia frente al mejor tratamiento de soporte (Krishnan S. et al., 2007). Otras técnicas para el manejo de los síntomas son: los stents, la analgesia. Para la valoración de la respuesta, además de la valoración del control de síntomas, se emplean la TAC, que valora mejor las lesiones metastásicas que el tumor primario, y los niveles séricos de Ca19.9. Sin embargo, la elevación del Ca19.9 por sí sola no indica progresión de la enfermedad, sino que habría que confirmarlo radiológicamente.

Esquemas de quimioterapia:

- Gemcitabina en monoterapia
- Gemcitabina asociado a capecitabina
- Gemcitabina asociado a oxaliplatino

Las asociaciones de quimioterapia en general no han demostrado un beneficio claro en supervivencia libre de progresión ni en supervivencia global, por lo que iniciar con uno u otro esquema depende de la extensión de la enfermedad y de la situación del paciente.

Si la enfermedad progresa tras uno de los esquemas y el paciente mantiene un estado general aceptable, se puede proponer una segunda línea de quimioterapia con otro esquema distinto.

1.1.9.3. NUEVAS TERAPIAS:

En una reciente publicación, el esquema FOLFIRINOX (irinotecán, oxaliplatino y 5-FU en infusión) se ha mostrado más eficaz en la tasa de respuestas, la mejoría de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global frente a gemcitabina en monoterapia, pero es más tóxico (Conroy T. et al., 2011). En un estudio francés (ACCORD 11) esta combinación demostró un aumento de supervivencia (11'1 meses vs 6'8 meses), de supervivencia libre de progresión (6'4 meses vs 3'3 meses) y de la tasa de respuesta (31'6% vs 9'4%) respecto al brazo control con Gemcitabina. En los pacientes con un cáncer de páncreas metastásico y buen estado general es un tratamiento a considerar.

Así mismo, ya se han publicado los resultados del un ensayo con nab-paclitaxel en pacientes con cáncer de páncreas diseminado (von Hoff D.D. et al., 2013). Los pacientes tratados con la combinación alcanzaron una mayor supervivencia (8'5 meses vs 6'7 meses), una mayor supervivencia libre de progresión (5'5 meses vs 3'7 meses) y mayor tasa de respuesta (23% vs 7%). Tras los resultados de este estudio, las nuevas combinaciones se testan sobre esta combinación, de gemcitabina con nab-paclitaxel, y se considera otra nueva opción en el tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas metastásico con un buen estado general.

En un ensayo fase III la asociación de erlotinib a la gemcitabina mostró una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia global (Moore M.J. et al., 2007). Pero se cuestiona si ello es clínicamente significativo y si el aumento en coste por año de vida ganado justifica su uso habitual. Ello no quita que en casos excepcionales se pueda utilizar. Se han realizado numerosos estudios con otros agentes biológicos sin que se hayan mejorado las respuestas respecto a los tratamientos convencionales.

Comentario a los diferentes agentes quimioterápicos:

- **Gemcitabina:** pertenece a la categoría de los fármacos llamados antimetabolito, sustancias muy similares a las sustancias normales que encontramos dentro de las células. Cuando las células incorporan esta sustancia a su metabolismo pierden la capacidad de división. Los antimetabolitos son específicos al ciclo celular, ya que destruyen las células sólo durante la división. Los fármacos antimetabolito se clasifican según las sustancias con las que interfieren. En el caso de la Gemcitabina es un antimetabolito antagonista de la pirimidina, como la capecitabina o la citarabina.
- **5-Fluorouracilo:** también pertenece a la familia de los fármacos antimetabolito y actúa como antagonista de la pirimidina.
- **Oxaliplatino:** se clasifica como un agente alquilante y alcanza su mayor nivel de actividad durante la fase de reposo celular. Por consiguiente, los fármacos de tipo alquilante no son específicos al ciclo. Existen varios tipos de agentes alquilantes y el oxaliplatino corresponde a sales de metal, al igual que el carboplatino y el cisplatino.
- **Irinotecán:** pertenece a una clase de fármacos llamados "alcaloides vegetales", ya que se obtienen de determinado tipo de plantas. Son específicos al ciclo celular. El Irinotecán pertenece al grupo de análogos de la camptotecina, que actúan como inhibidores de las topoisomerasas, interfiriendo en la acción de las enzimas topoisomerasas I y II, encargadas de controlar la manipulación de la estructura del ADN necesaria para la replicación. En concreto, el Irinotecán actúa inhibiendo la topoisomerasa I.
- **Paclitaxel:** también pertenece a una clase de fármacos llamados "alcaloides vegetales", pero corresponde al grupo de taxanos, que se producen a partir de la cabeza del árbol tejo del Pacífico (Taxus).

- **Nab-paclitaxel:** El nab-paclitaxel es una variante del paclitaxel en la cual el taxano está unido a albúmina formando nanopartículas de un tamaño aproximado de 130 nanómetros. En las partículas, el paclitaxel existe en estado amorfo, no cristalino. La eficacia terapéutica del nab-paclitaxel es mayor y su toxicidad menor que las del paclitaxel. El paclitaxel es un fármaco antimicrotúbulos que estimula el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos impidiendo su despolimerización. Esta estabilización inhibe la dinámica de reorganización normal de la red de microtúbulos, esencial para las funciones celulares vitales en las fases mitótica e interfase

- **Erlotinib:** inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico/de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR, también conocido como HER1). Inhibe la fosforilación intracelular del EGFR, que da lugar a que la célula quede en fase de equilibrio y/o conduce a la muerte celular.

1.1.10.PRONÓSTICO:

El pronóstico del ADP es malo, con tasas de supervivencia global inferiores al 20% al cabo de un año del diagnóstico y del 5% al cabo de cinco años. Ello se debe a la precoz diseminación vascular, linfática y perineural, que hace que un 85% de los pacientes presenten enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico, siendo incurables y únicamente subsidiarios de tratamiento paliativo.

Como ya se ha comentado, el factor más importante que determina el pronóstico del paciente es la resecabilidad del tumor en el momento del diagnóstico. La mayoría no son resecables porque se presentan con metástasis a distancia o afectando grandes vasos. La supervivencia media en pacientes con tumor irreseccable es de 5 meses y el ratio llega a rozar el 0% a los 5 años, a diferencia de aquellos pacientes con ADP en cabeza pancreática a los que se les ha practicado duodenopancreatectomía, con una supervivencia media de 15 meses y ratios de supervivencia al año-, 2-, 3- y 5 años de 45%, 30%, 25% y 15% respectivamente. En algunas series demostraron que algunos pacientes morían por su enfermedad más de 5 años después de la resección (Conlon K.C. et al., 1996).

El estadio y la afectación del margen quirúrgico son los factores pronóstico más importantes en pacientes sometidos a cirugía (Benassai G. et al., 2000; Han H. y von Hoff D.D., 2013). Pacientes con márgenes libres al examen macro- y microscópico tienen una supervivencia media cercana a 20 meses, comparados con los 10-12 meses en pacientes con márgenes afectados.

Otros factores pronóstico importantes incluyen el tamaño tumoral, la afectación de vasos de gran calibre, el grado de diferenciación y el estatus de afectación ganglionar (Benassai G. et al., 2000; Gebhardt C. et al., 2000; Kuhlmann K.F. et al., 2004; Lim J.E. et al., 2003). Pacientes con resección quirúrgica sin

metástasis ganglionares tienen una supervivencia del 25-40% a los 5 años comparado con una supervivencia de 0-8% en aquellos pacientes con ganglios positivos.

Otros indicadores de mal pronóstico descritos en la literatura en pacientes con carcinomas de páncreas resecados incluyen un índice mitótico elevado, invasión perineural (particularmente la afectación de estructuras nerviosas extrapancreáticas), invasión vascular, progresión a metástasis hepática (Kim H.W. et al, 2015). aneuploidia, citología peritoneal positiva, pérdida de la expresión de Dpc4 y expresión nuclear de S100A6 (Calcyclina) (Merchant N.B. et al., 1999; Tascilar M. et al., 2001; Hruban R.H., 2007).

Pacientes con carcinoma en cuerpo y cola del páncreas tienen un curso peor que los localizados en cabeza, ya que tienden a presentarse en estadios más avanzados y, aun siendo tributarios de resección, la supervivencia a los 5 años es de tan solo el 12.5%.

Carcinomas de pequeño tamaño, especialmente los localizados en cola de páncreas, se han de considerar en pacientes con adenocarcinoma metastásico de origen desconocido.

1.2. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PANCREÁTICA

1.2.1. CONCEPTO DE LESIONES PRECURSORAS. REVISIÓN HISTÓRICA.

Se han identificado tres lesiones precursora del ADP: la Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN), la Neoplasia Mucinoso Papilar Intraductal (NMPI) y la Neoplasia Mucinoso Quística (NMQ). Cada precursor representa una ruta alternativa al desarrollo de ADP, con una presentación clínico-patológica determinada y unos eventos genéticos distintivos.

Dos de ellas, la NMPI y la NMQ, son raras, radiológicamente detectables y se pueden curar si se tratan en estadio preinvasivo. Por ello nos centraremos en la Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN).

Se postula que los ADP se originan de células acinares maduras que se diferencian a células ductales-like, un proceso conocido como metaplasia acinar-ductal (MAD). (A. Maitra, et al., 2012; R.H. Hruban et al., 2000). Dicha metaplasia puede ser inducida por mutaciones oncogénicas pancreáticas o por pancreatitis (Guerra C & Barbacid M., 2013; SR Hingorani, et al., 2003). Así mismo, se ha visto que la mayoría de los adenocarcinomas infiltrantes se asocian a proliferaciones no invasivas (PanIN) en los ductos de menor tamaño. Estas lesiones llevan describiéndose muchos años y, en la actualidad, existen evidencias que sugieren que el PanIN es una lesión neoplásica y puede progresar hacia ADP infiltrante (Hruban RH et al, 2000).

Esta evidencia se basa en la asociación morfológica entre PanIN y adenocarcinomas infiltrantes, en casos anecdóticos publicados en los cuales los pacientes con diagnóstico histológico previo de PanIN desarrollaban a posteriori adenocarcinomas infiltrantes de páncreas, así como en análisis moleculares que demuestran que las lesiones de PanIN contienen las mismas alteraciones genéticas que el adenocarcinoma infiltrante. La progresión MAD-PanIN-ADP se ha descrito utilizando modelos animales genéticamente modulados, en los cuales la expresión endógena de Kras mutado es inducida en el páncreas en desarrollo, sólo o en conjunto con la inactivación de genes supresores mutados ampliamente conocidos, como p53, p16 y smad4. (Guerra C & Barbacid M., 2013; SR Hingorani, et al., 2003).

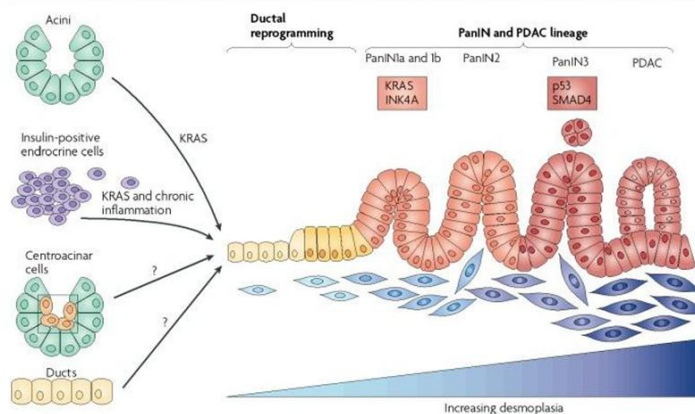


Fig 5. Imagen obtenida de Nat Rev Cancer © 2010 Nature Publishing Group

Anteriormente las lesiones de PanIN habían recibido otras denominaciones: *hiperplasia ductal*, *hipertrofia*, *metaplasia*, *displasia*, *lesión ductal* y *carcinoma in situ* (Hruban RH, 2001).

1.2.2. DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE LOS PanIN

En el año 1990 se unificó la clasificación de lesiones precursoras del CP, denominándose como “neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanINs)”. La clasificación considera cuatro grupos que reflejan los cambios histológicos progresivos desde el epitelio normal hasta el adenocarcinoma (Hruban RH et al, 2004).

Las lesiones de PanIN 1A consisten en lesiones del epitelio compuestas por células cilíndricas uniformes, con núcleo regular, redondo u oval, localizado en la base. Los núcleos están orientados perpendiculares a la membrana basal y las células pueden contener abundante mucina (Fig. 6). A pesar de que estudios moleculares han reconocido que muchas de las lesiones con dicha morfología son neoplásicas, algunas de ellas no lo son. Por ello, la modificación añadida de “L” (“like”) para esta lesión está aceptada (PanIN 1A/L).

Las lesiones de PanIN1B tiene idéntica morfología al PanIN 1A, pero el epitelio adopta un patrón papilar o micropapilar. Se considera una lesión de bajo grado.

Las lesiones de PanIN 2, por definición, tienen alguna alteración nuclear. La mayoría son papilares, pero algunas pueden presentarse con epitelio bajo. Las anomalías nucleares incluyen cierta pérdida de la polaridad, aumento del tamaño, pseudoestratificación e hiper cromasia. Las mitosis se ven muy raramente y cuando se hallan presentes, son basales y morfológicamente normales. Se considera una lesión de bajo grado o grado intermedio.

Las lesiones de PanIN 3 se caracterizan por presentar importante atipia citológica y arquitectural. Estas lesiones son normalmente papilares o micropapilares y muy raramente de epitelio bajo. Puede observarse patrón cribiforme, acúmulo de células hacia el interior de la luz y necrosis luminal, junto con anomalías citológicas. El núcleo está aumentado de tamaño, con pérdida de la relación núcleo/citoplasma, con hiper cromasia, pérdida de la orientación y distribución irregular de los mismos, alcanzando la superficie de la papila. Se pueden observar células globosas y mitosis, algunas de ellas luminales y atípicas. Se considera una lesión de alto grado.

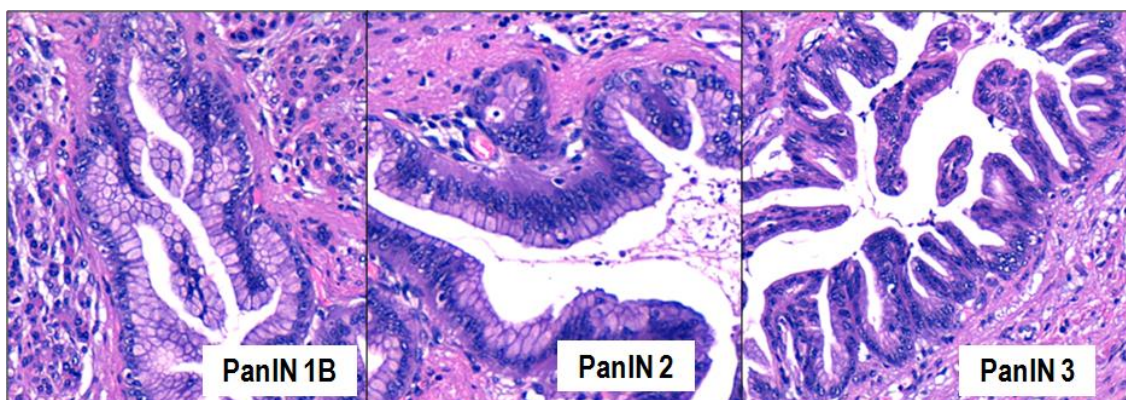


Fig. 6. Fotografías microscópicas de los diferentes grados de PanIN

Se han propuesto variantes oncocíticas e intestinales de los PanIN. Se ha sugerido que la variante oncocítica puede progresar a Neoplasia Papilar Oncocítica Intraductal y la variante intestinal a Neoplasia Papilar Mucinosas Intraductal. Aunque estas lesiones, a diferencia de los PanIN clásicos, no se han descrito en ausencia de sus correspondientes lesiones neoplásicas. Así mismo, epitelios con características oncocíticas se puede encontrar en pequeños ductos pero no se han visto asociadas alteraciones genéticas detectadas en neoplasias. Por ello se describen simplemente como metaplasia oncocítica.

1.2.3. ESPECTRO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS PanIN

El patrón inmunohistoquímico de las lesiones de PanIN es paralelo al de los ADP. La mayoría de lesiones no expresan MUC2, pero sí MUC1, MUC4, MUC5AC y MUC6, sobre todo en los PanIN de alto grado (PanIN 3). El patrón de expresión observado en PanINs, incluyendo la expresión de las MUCs, sugiere que los PanINs, particularmente los de bajo grado, muestran diferenciación gástrica. Un tercio de los PanIN expresan Ciclooxygenasa-2 (Maitra A et al., 2002). El análisis global de la expresión génica revela la expresión de múltiples marcadores epiteliales gástricos, así como el efecto de la activación de la vía de señalización Hedge-hog (Prasad NB et al., 2005).

1.2.4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LOS PanIN

Las lesiones de PanIN han de diferenciarse de otras lesiones de los ductos pancreáticos, como son la metaplasia escamosa, cambios reactivos, “cancerización” de los ductos y Neoplasias Papilares Mucinosas Intraductales (NPMI). (Tabla 6).

Existen clínicas paralelas entre el PanIN y el carcinoma infiltrante. Las lesiones de PanIN, particularmente las lesiones de alto grado (PanIN 3), se observan más frecuentemente en páncreas con carcinoma infiltrante que en aquellos que no tienen cáncer (Andrea A, 2003; Cubilla AL, 1976). Como pasa con el adenocarcinoma infiltrante, la prevalencia del PanIN aumenta con la edad y se ha descrito más

frecuentemente afectando a cabeza pancreática. Las lesiones de PanIN de bajo grado son frecuentes, descritas en más del 45% de los páncreas de personas adultas en estudios autopsicos (Mukada T, 1982). También se han observado asociadas con frecuencia, de forma incidental, a otras neoplasias pancreáticas distintas al ADP, como son las neoplasias endocrinas pancreáticas bien diferenciadas o el cistadenoma seroso (Stelow EB, 2006).

Tabla 6. Diagnóstico Diferencial de las lesiones de PanIN (HRuban RH, 2000 y 2001; Andea A, 2003)

Entidad	Diferencias con las lesiones de PanIN.
Metaplasia escamosa del epitelio ductal	Es un proceso adaptativo a causa del daño repetido sobre el epitelio. Suele observarse en las pancreatitis crónicas. Las células cuboidales normales son reemplazadas por epitelio estratificado maduro o pseudo-estratificado transicional, sin atipia significativa.
Cambios reactivos	Causados por una marcada inflamación ductal. Se observa aumento nuclear o nucleolar y es mucho más uniforme que en el caso de las lesiones de PanIN. Se debe dar con precaución el diagnóstico de PanIN en el contexto de una inflamación.
“Cancerización de los ductos” por el ADP	Dos hallazgos son de ayuda para diagnosticarla: 1. presencia de carcinoma invasivo en el tejido conectivo inmediatamente adyacente a la lesión ductal; 2. transición abrupta de epitelio normal a epitelio con atipia significativa. El PanIN de alto grado frecuentemente muestra transición a PanIN de bajo grado y no a epitelio ductal normal.
Neoplasias Papilares Mucinosas Intraductales (NPMI)	Las diferencias se basan en el tamaño y la morfología de las papilas: Las papilas en las NPMIs son más altas y más complejas. La mayoría de las lesiones de PanIN no se pueden apreciar al examen macroscópico y son menores de 0'5 cm; contrariamente, las lesiones de NPMI son mayores de 1cm y pueden apreciarse macroscópicamente y en los exámenes radiológicos (determinar el punto de corte en tamaños de 0'5 y 1cm es muy útil, ya que se cumple en la mayoría de los casos). La presencia de abundante mucina intraluminal y la expresión de MUC-2 sugieren el diagnóstico de NPMI.

1.2.5. TRATAMIENTO DE LOS PanIN

El tratamiento más adecuado de estas lesiones todavía no está establecido y, a pesar de saber que algunas de estas lesiones progresan a carcinoma infiltrante, no se sabe que porcentaje lo hace y la rapidez con que lo hacen.

Con los avances en el estudio de la carcinogénesis del adenocarcinoma de páncreas se han abierto nuevas vías para el diagnóstico y quimioprevención. A pesar de ello, el acceso al páncreas es limitado, los tests moleculares están en estadios iniciales y no se conoce lo suficiente sobre la historia natural de

las lesiones precoces de PanIN como para justificar una resección y los screenings sólo se centran en personas de alto riesgo (Haugk B., 2010).

Está generalmente aceptado que no se necesita tratamiento para lesiones de PanIN 1 y PanIN 2. Hay casos anecdóticos publicados de lesiones de PanIN 3 que progresan a ADP (Brat DJ et al., 1998). En este sentido, algunos autores postulan y justifican la ampliación de margen de resección si éste presenta lesiones de PanIN 3, siempre teniendo en cuenta la situación clínica del paciente a la hora de proponer una resección adicional del parénquima pancreático. Si el paciente presenta una gran masa infiltrante con múltiples metástasis ganglionares, dado que su lesión invasiva necesita un tratamiento mayor que la de PanIN 3, se recomienda no reseccionar más parénquima. Por el contrario, si el paciente es joven y tiene una masa neoplásica infiltrante pequeña o una lesión benigna, está justificada la ampliación de márgenes.

1.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR. CONCEPTO

Las células de organismos pluricelulares están en permanente intercomunicación a través de señales de todo tipo (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, pequeños péptidos, etc.) que regulan la proliferación, diferenciación, el metabolismo, el comportamiento celular, e incluso la muerte celular programada (apoptosis). Estas señales llegan a las células diana, interaccionan con sus respectivos receptores y se produce la activación de rutas específicas de transducción de señales. Seguidamente, las señales son transmitidas hacia el interior de la célula, hasta los puntos en que se regula el metabolismo, la transcripción de genes, etc, para generar la respuesta adecuada. Cada señal extracelular es transducida a través de múltiples rutas, o cascadas de señalización, en las que intervienen numerosas proteínas que ganan y/o pierden su actividad biológica mediante diversas modificaciones tales como fosforilación, desfosforilación, acetilación, metilación, etc. (Figura XX).

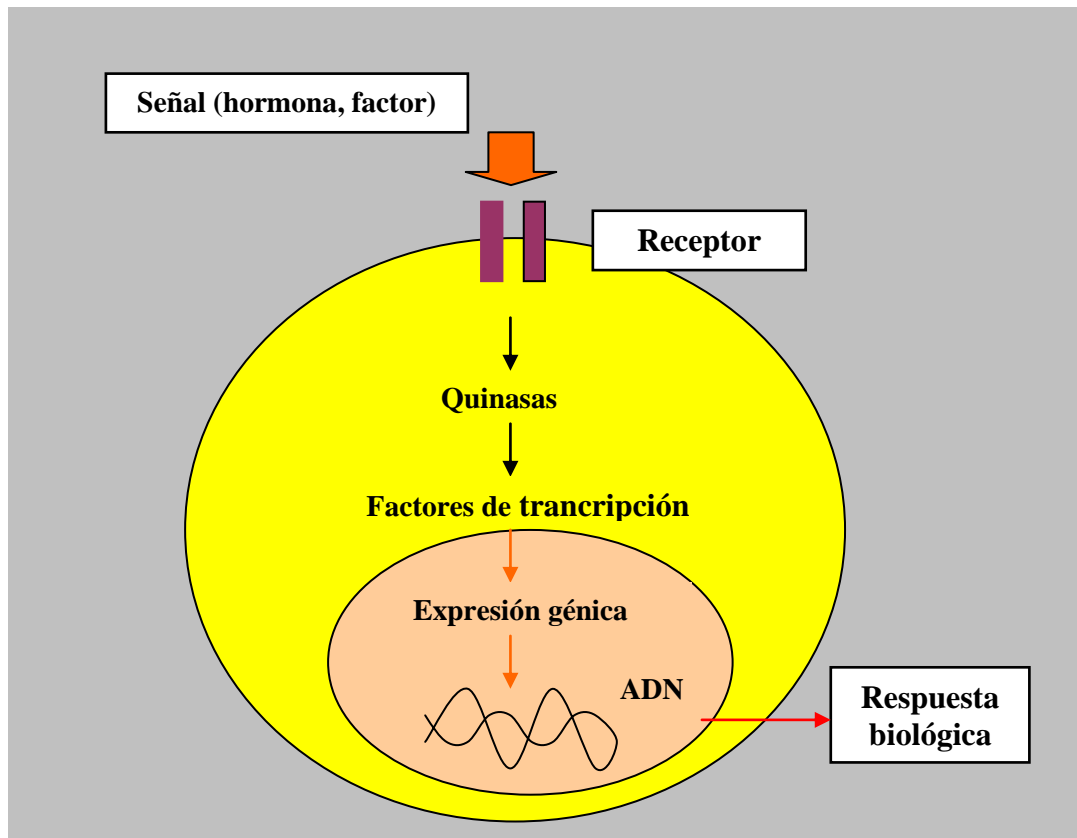


Fig. 7: Esquema de la respuesta biológica de una célula ante una señal extracelular

Las cascadas de transducción de señales intervienen en la detección y el procesamiento del estímulo. Estos circuitos moleculares detectan, amplifican e integran diversas señales externas para generar diferentes tipos de respuestas como son: cambios de actividad enzimática, cambios en la expresión génica o el aumento de actividad de los canales de iones.

Los *receptores de membrana* transfieren información desde el exterior al interior de la célula. El receptor es una proteína intrínseca de membrana que tiene un dominio intracelular y otro extracelular. Una zona del dominio extracelular reconoce específicamente la molécula de señalización (llamada ligando). La interacción entre el ligando y el receptor altera la estructura terciaria y cuaternaria del receptor, incluyendo el dominio intracelular, y la posterior activación de las cascadas de señalización intracelulares.

Los estudios del Proyecto del Genoma Humano han revelado que, de los aproximadamente 22.000 genes identificados, un 20% codifican proteínas involucradas en los procesos de transducción de señales, incluyendo receptores tirosina quinasa, subunidades de proteínas G y enzimas generadores de señales. Ello nos indica que las células han diseñado un complejo entramado de vías de señalización, en el que diversas rutas pueden ser activadas por distintas hormonas en un mismo contexto celular. Por tanto, las distintas respuestas celulares dependerán, en gran medida, del conjunto de rutas presentes en las células diana que cada señal extracelular sea capaz de estimular.

En los últimos años, el estudio de multitud de rutas de señalización ha permitido ir conociendo con detalle, los mecanismos de señalización intracelular y comprobar que las distintas rutas no actúan de modo independiente sino que están a su vez interrelacionadas entre sí, formando redes complejas de señalización intracelular. Se tiende actualmente a hablar más de “redes” que de rutas de señalización. En estas redes están integradas numerosas proteínas señalizadoras, responsables de la regulación de los diversos procesos celulares, siendo precisamente el balance entre las señales positivas y negativas lo que va a determinar la naturaleza de las respuestas celulares (que pueden variar desde división a diferenciación o apoptosis, etc).

La existencia de estas redes de señalización intracelular ofrece, por tanto, grandes posibilidades de modulación de las respuestas celulares, en base a la regulación cualitativa, cuantitativa o temporal de los diversos componentes de la red en cada tipo celular. Por tanto, la regulación de los diversos procesos de señalización se puede dar a distintos niveles.

1.3.1. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN EL ADP

A nivel génico, las principales alteraciones encontradas en el ADP están relacionadas con: a) la mutación y/o sobreexpresión de protooncogenes con ganancia de función (oncogenes); b) la inactivación de genes supresores de tumores, perdiendo su función supresora; c) anomalías en los factores de crecimiento y sus receptores, que afectan distintas etapas relacionadas con el crecimiento y diferenciación.

En el ADP, la presencia de oncogenes y la pérdida de función de genes supresores de tumor, todos ellos relacionados con el control del ciclo celular (especialmente en la fase de transición G1/S), explica la elevada capacidad proliferativa de las células tumorales (Maitra A. et al., 2006 y Ghaneh P. et al., 2007).

Las vías de señalización alteradas en el ADP actualmente en estudio son predominantemente cuatro:

1. Vía de transducción mediada por HER2
2. Rutas que intervienen en la apoptosis y proliferación celular: PI3 quinasa-AKT-mTOR ,
3. Genes supresores de tumores: p53, p21, p16/ INK4, SMAD4/DPC4
4. Transición epitelio-mesénquima (EMT) y cadherinas

Asimismo, en los últimos años ha aumentado el interés por caracterizar otra vía de señalización alternativa, la vía Hippo, y ya son muchos los estudios sobre mutaciones y alteración de la expresión de un subconjunto de genes implicados en la misma (Harvey K. y Tapon N., 2007; Saucedo L. J. et al., 2007), en especial del gen Yes-associated protein (YAP).

1.3.1.1. VÍA HER2NEU, RAS-MEK-ERK. RAS, UN EFECTOR IMPORTANTE EN EL CONTROL DE LA TRANSDUCCIÓN

Entre las distintas cascadas de señalización celular, la mejor estudiada es la denominada ruta Ras-MAPK, que implica una serie de kinasas citosólicas, activadas por agentes mitogénicos, y sus receptores específicos de superficie (Fig. 8)

En mamíferos, la familia de proto-oncogenes RAS está formada por tres miembros, H-, N- y KRAS. Se han encontrado mutaciones activantes en aproximadamente un 25% de los tumores humanos, la gran mayoría en KRAS y NRAS, mientras que su detección en HRAS es menos frecuente.

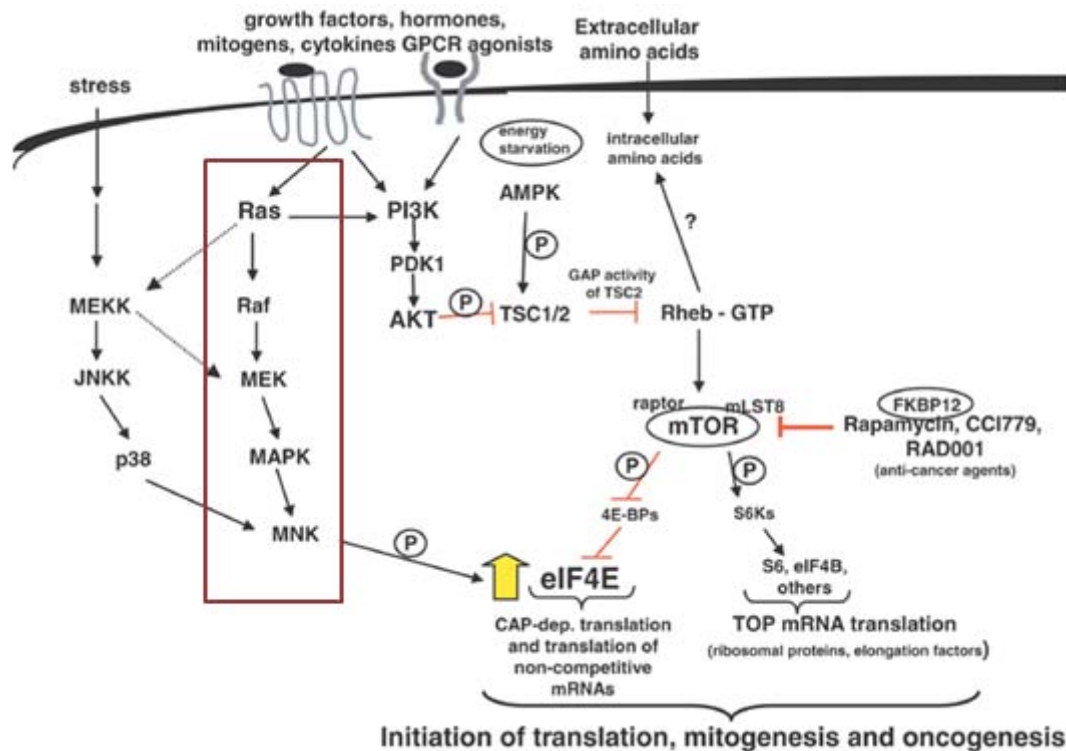


Fig.8 Vías de señalización intracelular oncogénicas activadas por RAS: la cascada de señalización se origina a partir de la activación constitutiva de KRAS mutado, que provoca la inhibición de la apoptosis y proliferación celular. MAPK y eIF4E son algunos de los mecanismos principales de la activación oncogénica. Figura obtenida de Sonenberg et al. *Oncogene*, 2004.

KRAS (abreviatura de *Kirsten Rat Sarcoma virus oncogen*) está localizado en el cromosoma 12p12.1 y codifica una proteína de membrana de 21 kDa de unión a GTP (Proteína Ras), aunque también existen mutaciones del mismo tipo en los codones 13, 61, 117 y 146. Su mutación provoca que la proteína Ras pierda su actividad GTPasa y se mantenga unida a GTP, siendo capaz de estimular multitud de cascadas de señalización que conducen a la proliferación celular. El gen KRAS aparece mutado en el 75-90% de los ADP, así como en enfermos con pancreatitis crónica (PC) y en individuos fumadores.

El gen NRAS (RAS neuroblastoma viral (v-ras) homólogo) codifica una proteína de membrana que circula entre el aparato de Golgi y el citoplasma. Mutaciones en NRAS son encontradas en un número menor de tumores, aunque llegan a un 30% en el caso de leucemias agudas no linfoides.

Finalmente, HRAS es el de menor incidencia en cáncer, aunque se han encontrado mutaciones en HRAS en cáncer de vejiga, próstata y tiroides.

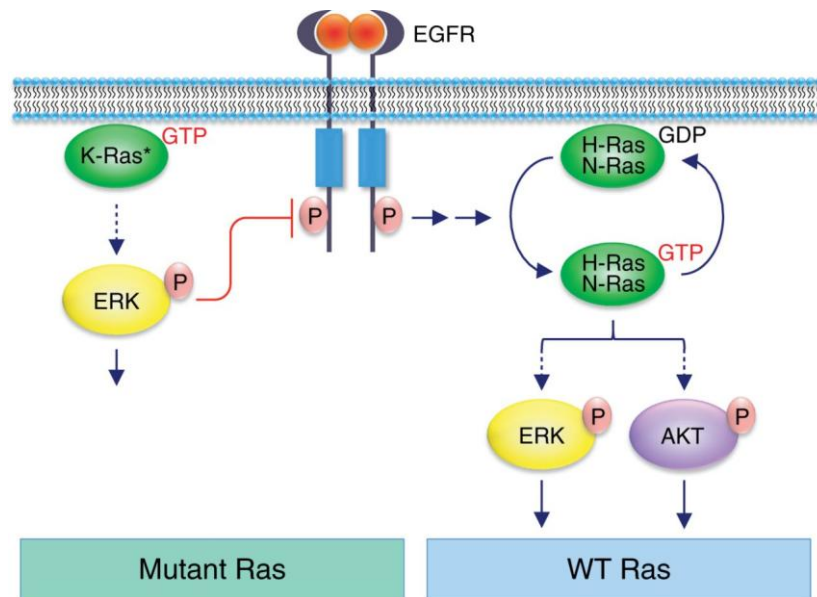


Fig.9 Interacción funcional entre RAS mutado y Wild-type (WT). Figura obtenida de Hayes y Channing. Cancer Discovery, 2013.

La vía del RAS activa la MAP quinasa (MAPK), que a su vez activa a las proteínas quinasas MAPK (Mnk) 1 y 2, dos quinasas que median en la fosforilación de un factor iniciador eucariótico, eIF4E-Ser 209 (Scheper G.C. et al., 2001), aparentemente crítico en el aumento de la traducción. Sin embargo la función de eIF4E, independientemente de su estado de fosforilación, es la de inhibir las proteínas de unión 4E mediante su unión directa (4E-BP1, 2 y 3). Este bloqueo, desaparece tras la fosforilación de las 4E-BPs vía mTOR, que a su vez está mediada por la vía de la proteína quinasa B PI-3K (PKB/AKT). Así el factor eIF4E puede actuar como un factor de convergencia entre las vías de señalización de RAS y AKT (Miron M. et al., 2001).

1.3.1.2 VÍA DE PI-3K/AKT/mTOR

Otras de las vías de señalización habitualmente alteradas en el proceso neoplásico pancreático suele ser las vías PI-3K-AKT. La mayoría de inhibidores de estas vías aumentan la actividad de la Gemcitabina, uno de los fármacos utilizados en el tratamiento del ADP, haciendo el tratamiento más eficaz. (Wadler S., 2007) (Fig. 10)

La activación de PI-3K y la producción del mensajero secundario lipídico fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato activa la ruta AKT mediante las quinasas fosfatidilinositol-dependientes, PDK1 y PDK2 (Brazil D.G. y, Hemmings B.A., 2001). Asimismo se postula que la activación de AKT da lugar a su vez a la fosforilación y a la inactivación del complejo tumoral supresor de la esclerosis tuberosa (TSC), lo que provoca la activación de la ruta de señalización mTOR. mTOR fosforila las proteínas quinasas ribosomales S6K1 y dos

de las 4E-BPs. La fosforilación de SK6 provoca su activación, mientras que la fosforilación de 4E-BP rompe su interacción con el eIF4E permitiendo que eIF4E se una y forme el complejo de iniciación.

Se sabe que mTOR y sus efectores posteriores en la cadena, SK6 y 4EBPs, median en la estimulación de la síntesis proteica, en parte, actuando sobre aminoácidos ramificados como la leucina (Kimball SR. et al., 1999; Gingras AC. et al., 2001). Asimismo se ha demostrado que la actividad de mTOR está directamente controlada por los niveles homeostáticos de ATP (Dennis PB. et al., 2001) así como del ácido fosfatídico (Fang Y. et al., 2001). Por lo tanto, mTOR parece que actúa como factor regulador en la síntesis de proteínas (Dennis P.B. et al., 1999).

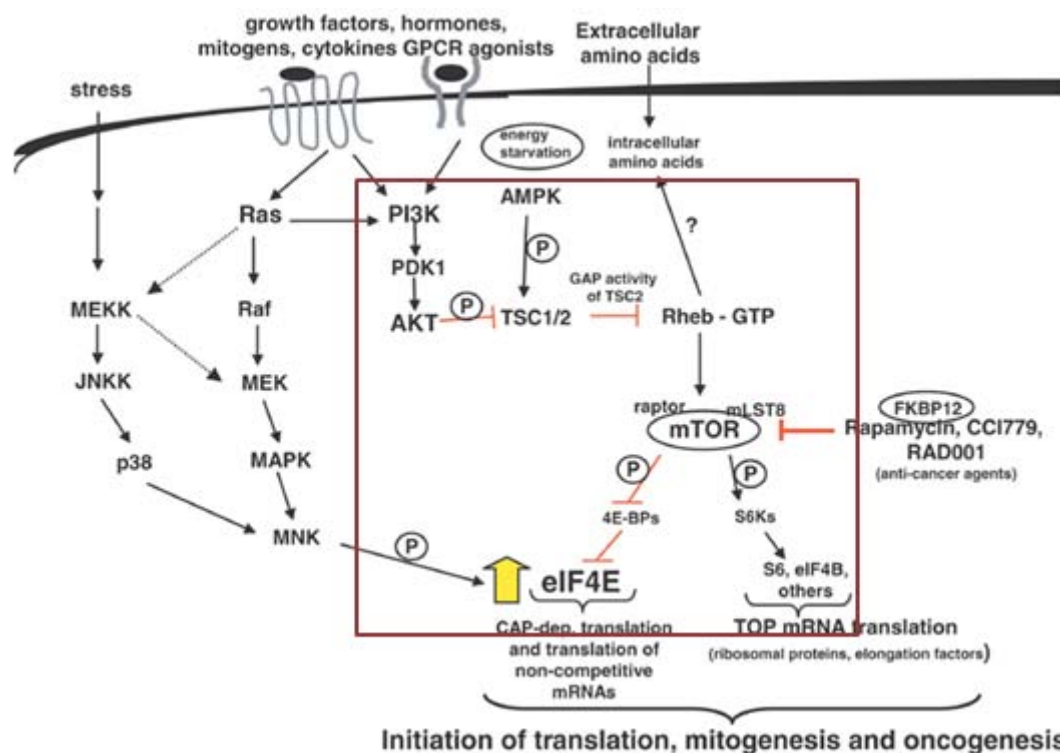


Fig.10 Vías de señalización intracelular oncogénicas activadas por RAS: la cascada de señalización se origina a partir de la activación constitutiva de KRAS mutado, que provocan la inhibición de la apoptosis y proliferación celular. PI-3K y mTOR son algunos de los mecanismos principales de la activación oncogénica. Figura obtenida de Sonenberg et al., Oncogene, 2004.

1.3.1.3. GENES SUPRESORES TUMORALES: P53 / P21 / P16 / SMAD4

El ciclo celular, proceso por el cual una célula entra en mitosis, requiere la sincronía de multitud de funciones, cuyo orden cronológico es básico para su culminación con éxito. Incluye varias fases denominadas G1, S, G2 y mitosis (M). Durante la fase S el ADN se replica, para poder ser distribuido a partes iguales a las células hijas en la mitosis. Existe un grupo de moléculas, las ciclinas, que inducen la

transición de G1 a S (ciclinas D, E) o que actúan en G2 (ciclinas A y B). Estas ciclinas interactúan con quinasas específicas que, al activarse, fosforilan diferentes proteínas que bloquean la progresión del ciclo celular (Grana X. y Reddy E.P., 1995).

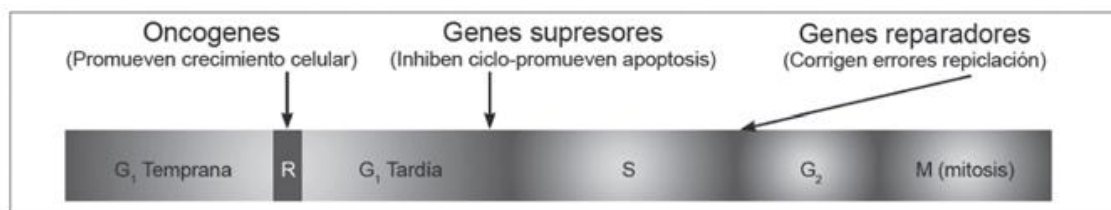


Fig. 11. Función normal de genes relacionados con cáncer y ciclo celular.

Una de las moléculas más emblemáticas implicadas en la regulación del ciclo celular es la proteína del retinoblastoma (Rb) (Ewen M.E., 1994). Cuando esta proteína se encuentra en estado hipofosforilado, tiene una conformación activa que mantiene el ciclo celular parado, localizado en el último tercio de la fase G1. En condiciones adecuadas para la proliferación, Rb es fosforilada por complejos quinasa dependientes de ciclina (CdK)-ciclina D, libera factores de transcripción como E2F, que inducen la expresión de genes necesarios para la síntesis de DNA, y la célula entra en fase S. Por consiguiente, los inhibidores de la CDK-CiclinaD son importantes para mantener el control del crecimiento celular, ya que su alteración provoca la inactivación de Rb (Hirama T. y Koeffler H.P., 1995). Los inhibidores más importantes de las Ciclinas son las moléculas p15, p16, p18, p21 y p27. La alteración de los mismos predispone a la célula a la proliferación incontrolada.

Un gen supresor de tumores inactivado en ADP es el gen p16 (también conocido como INK4 o CDKN2A). Se encuentra localizado en el cromosoma 9p21 y ejerce un papel fundamental en el punto de control del ciclo celular en G1. El producto del gen, INK4A, se une a la quinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6) y evita la activación del complejo ciclina D. CDK4/6 media la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, pRb. La acción de P16 es pues la de frenar el inicio del ciclo celular.

Encontramos pérdida de expresión y función de p16 en el 80-90% de los ADP por diversos mecanismos: deleciones homocigotas, mutaciones/LOH e hipermetilación del promotor. Esta pérdida de expresión parece ser un evento relativamente precoz en el desarrollo del tumor.

En cuanto a genes relacionados con cáncer y ciclo celular, nos encontramos con los genes supresores tumorales. Estos genes controlan la proliferación celular impidiendo el paso de G1 a S. Cuando sufren mutaciones se produce pérdida de su acción inhibitoria y, por tanto, regulación anormal del crecimiento

P53 es el gen supresor de tumores alterado con mayor frecuencia en los tumores humanos. Está localizado en el cromosoma 17p, y tiene múltiples funciones, pero una de las mejor estudiadas es la activación transcripcional de genes, uno de ellos, p21 WAF, que inhibe las quinasas dependientes de las

ciclinas (Cdk). En concreto, el gen p21 se induce por p53 y su función es la de inhibir CDK2 que, al final de G1, puede forforilar la pRb.

P53 es necesario para que la célula sea capaz de reparar sus alteraciones genómicas antes del inicio de la fase S. Cuando se detectan alteraciones, P53 activa la producción de factores que inhiben la progresión del ciclo celular en la última parte de G1. Si se corrige la alteración, p53 permite continuar el ciclo, pero si no se ha corregido, p53 activa el programa de muerte celular programada o apoptosis, impidiendo que una célula con alteraciones genómicas continúe su proliferación (González-Sastre F., 2003). Su inactivación, por tanto, impide la reparación del ADN, a la vez que las células no inician el proceso apoptótico.

El gen P53 se encuentra alterado en el 50-85% de los ADP, generalmente por pérdida de heterocigosidad (LOH) junto a mutación inactivadora en el otro alelo, y parece ser un evento tardío en la carcinogénesis (Guerra C. y Barbacid M., 2013). Su presencia no ha demostrado valor pronóstico en el cáncer de páncreas. El gen p21, inducido por p53, está inactivado en el 30-60% de los cánceres de páncreas.

Por último, otro gen supresor de tumores, es el gen SMAD4/DPC4, localizado en el cromosoma 18q, perteneciente a la familia SMAD y pertenece a la superfamilia de las citoquinas TGF β (*Transforming Growth Factor α* , potente inhibidor de la proliferación celular), que regulan la transducción de señal de proteínas extracelulares. La pérdida de su función confiere a la célula mayor capacidad migratoria e invasiva.

Smad4 aparece inactivado hasta en el 55% de los ADP (Hahn S.A. et al., 1996). Se sabe que su inactivación se produce en etapas más avanzadas de la formación de tumor y es relativamente específica del ADP, con una baja incidencia en otros tumores pancreáticos y extrapancreáticos. Ello podría tener utilidad clínica en el estudio de pacientes con metástasis con sospecha de origen pancreático,

1.3.1.4. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA Y CADHERINAS:

La Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) es un proceso presente durante la carcinogénesis, metástasis y recurrencia tumoral. Durante este proceso, las células epiteliales pierden algunas de sus características de estirpe epitelial y adquieren propiedades mesenquimales: pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad y capacidad de invasión y resistencia a la apoptosis . (Micalizzi D.S. et al., 2010; Yilmaz M. y Christofori G., 2009). Este proceso es complejo e involucra diversos factores de transcripción tanto epiteliales como mesenquimales.

Asimismo, la EMT describe una serie de cascadas que conducen a un cambio en el fenotipo celular, con fenotipo diferenciado, a un fenotipo característico de fibroblastos (Savagner P., 2010). Estas células tienen la capacidad de remodelar la matriz extracelular que las rodea y secretar proteasas que ayudan en el proceso de invasión (Leopold P.L. et al., 2012). Este proceso se produce por diferentes factores de

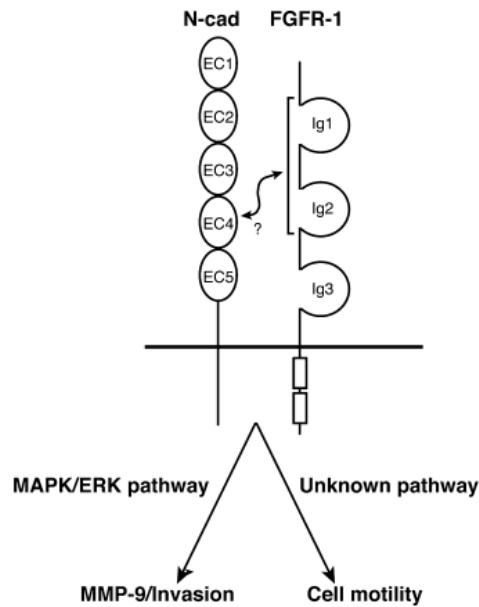
traducción que regulan la expresión de numerosas proteínas implicadas en varias propiedades de las células que conforman los tejidos, como son la polaridad celular, el contacto célula-célula, la estructura del citoesqueleto y la degradación de la matriz extracelular. Estos factores de traducción incluyen miembros de la familia ZEB, SNAIL y TWIST. Por definición este proceso confiere movilidad celular permitiendo la evolución, fusión o generación del epitelio secundario, esencial para la morfogénesis y la organogénesis. (Peinado O. et al., 2007; Thiery A. et al., 2009).

Estas proteínas están ausentes en diferentes células adultas, pero con frecuencia se reactivan en cáncer, promoviendo la diseminación de células cancerígenas mediante EMT. Muchos inductores de EMT proporcionan ventajas a las células en situaciones de estrés, por activación de vías anti-apoptóticas (Ansieau S., 2013). El cambio en la movilidad celular implica un cambio en las interacciones entre las células, con la consiguiente disminución de expresión de proteínas implicadas en esta interacción. Es el caso de ciertas conexinas, como son Cx26 y Cx43, la integrina $\alpha 6\beta 4$ y la E-cadherina.

Las cadherinas constituyen una familia de glicoproteínas transmembrana con un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal y en el reconocimiento entre células. Se han caracterizado dos tipos diferentes de cadherinas, el tipo I (P-, N- y E-cadherinas), y el tipo II (cadherinas 5-12), de este último se conoce poco su función y su patrón de expresión. Las interacciones entre las diferentes cadherinas son importantes y requeridas para la formación de los tejidos durante el desarrollo y para el mantenimiento de la función de barrera del epitelio o del endotelio (Takeichi M., 1993). Cuando la expresión de E-cadherina se ve disminuida, una cadherina no epitelial, la N-cadherina, puede aumentar sus niveles de expresión, siendo otro marcador de EMT.

La alteración en la función de las cadherinas es un paso crítico para el desarrollo de tumores (Nieman, P. et al. 1999). Las células cancerígenas adquieren la capacidad de proliferar continuamente, de evadir la inhibición del crecimiento, invadir tejidos y metastatizar (Hanahan and Weinberg). Una característica de la progresión del tumor es la pérdida del fenotipo epitelial y un incremento en el fenotipo mesenquimal.

La N-cadherina promueve la estabilidad entre la interacción celular, facilitando la migración celular, y resulta en un incremento de la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales, aumentando su capacidad de migración e invasión. La actividad proinvasiva de la N-cadherina se debe, en parte, a la interacción sinérgica con el receptor de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR) vía su dominio extracelular, el cual estabiliza FGFR-1 y mantiene la señal extracelular que regula la activación de la vía MAPK-ERK, que a su vez conlleva un incremento de la producción de metaloproteínasa 9 (MMP9). Se cree que pueden haber implicadas otras vías que incrementan la movilidad celular vía N-cadherina/FGFR-1, pero hasta el momento no se han definido (Figura 13) (Gradl K. et al., 1999; Hult S. et al., 2007).



Se ha descrito este aumento en la expresión de N-cadherina , junto con una pérdida de expresión de E-cadherina, en tumores de mama con gran capacidad de invasión y menor diferenciación (Hazan K. et al., 1997).

1.3.1.5. VÍA HIPPO. YES-ASSOCIATED PROTEIN 1 (YAP1):

Está bien documentado que la vía Hippo se altera con mucha frecuencia en un gran número de neoplasias, incluyendo el cáncer de pulmón, colorrectal, de ovario, de hígado y de próstata (Dong J. et al., 2007, Steinhardt AA. et al., 2008), y que dicha alteración también se ha visto correlacionada con un mal pronóstico (Zhang X. et al., 2011; Hall C.A. et al., 2010; Xu MZ. et al., 2009).

La vía de Hippo (también conocida como la ruta de Salvador-Warts-Hippo) juega un papel crítico en el desarrollo animal. Controla el tamaño y el crecimiento del órgano mediante la inhibición de la proliferación celular y la promoción de apoptosis. La ruta toma su nombre de uno de sus componentes clave: la señalización de la proteína quinasa Hipona (Hpo). Las mutaciones en este gen conducen al crecimiento excesivo de tejido, o un fenotipo "hipopótamo-like".

En los últimos años se han realizado gran número de estudios en mamíferos que han validado la siguiente hipótesis: la alteración de la vía Hippo puede desencadenar la tumorigénesis en ratones (Halder G. y Johnson RL., 2011), y se han observado mutaciones y alteración de la expresión de un subconjunto de genes de la vía Hippo en cánceres humanos (Harvey K. y Tapon N. 2007; Saucedo L.J. et al., 2007).

Si bien la mayoría de los componentes de la vía Hippo fueron identificados en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), se han encontrado posteriormente los ortólogos (genes que funcionan

análogamente en diferentes especies) en mamíferos. De este modo, la vía de señalización trazada en la *Drosophila* ha ayudado a identificar muchos genes que funcionan como oncogenes o genes supresores tumorales en mamíferos.

Tabla 7. Componentes de la vía Hippo y función

Drosophila melanogaster	Orthologo humano	Proteína y función en la Vía Hippo
Dachsous (Ds)	DCHS1, DCHS2	Cadherina atípica que puede actuar como ligando para el receptor de Fat
Fat (Ft)	FAT1, FAT2, FAT3, FAT4 (FATJ)	Cadherina atípica que puede actuar como ligando para el receptor de la vía hippo
Expanded(Ex)	FRMD6/Willin	Dominio FERM que contiene proteína apical que se asocia con Kibra y Merlin como regulador upstream de la cascada Kinasa
Dachs (Dachs)		Miosina no convencional que puede unirse a Wts, promoviendo su degradación
Kibra (Kibra)	WWC1	Dominio WW que contiene una proteína apical que se asocia a Ex y Mer como regulador upstream regulador de la cascada kinasa
Merlin (Mer)	NF2	Dominio FERM que contiene proteína apical que se asocia con Kibra y Mer como regulador upstream de la cascada Kinasa
Hippo (Hpo)	MST1, MST2	Kinasa tipo Sterile-20-type que fosforila y activa Wts
Salvador (Sav)	WW45 (SAV1)	Dominio WW que contiene una proteína que actúa como una proteína andamio, facilitando la fosforilación de Warts por Hippo
Warts (Wts)	LATS1, LATS2	Kinasa Nuclear DBF-2-related que fosforila e inactiva Yki
Mob as tumor suppressor (Mats)	MOBKL1A, MOBKL1B	Kinasa que se asocia a Wts para potenciar su actividad catalítica
Yorkie (Yki)	YAP, TAZ	Coactivador transcripcional que se une a Sd en su forma activa, no fosforilada, para activar la expresión de factores transcripcionales que promueven crecimiento y proliferación y previenen apoptosis
Scalloped (Sd)	TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4	Factor de transcripción que se une a Yki para regular la expresión de genes diana

La vía Hippo consiste en una ruta de señalización hacia el núcleo en el que Hpo (MST1 / 2 en los mamíferos) fosforila la proteína quinasa warts (WTS) (LATS1 / 2 en los mamíferos). MST1/2 es un miembro de la familia de proteínas quinasa de Ste-20, que regula varios procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, apoptosis, y varias respuestas al estrés (Ippeita D. et al., 2001). Una vez fosforilada, LATS1/2 se convierte en activa. LATS es una quinasa relacionada con el DBF-2 nuclear. Estas quinasa son conocidos reguladores de la progresión del ciclo celular, el crecimiento y el desarrollo (Ma J. et al.,

2010). Se conocen dos proteínas que facilitan la activación de LATS: Salvador (Sav/WW45 en mamíferos) y Mob (MOBKL1A / B en los mamíferos),

MST puede unirse y fosforilar Sav, que puede funcionar como una proteína de anclaje, ya que la interacción MST-Sav promueve la fosforilación de LATS (Shian W. et al., 2003). MST también puede fosforilar y activar Mats, que permite asociarse con la actividad quinasa de LATS.

Activado LATS puede pasar a fosforilar e inactivar YAP mamíferos. Cuando se activan la proteína asociada Yes (YAP), y el coactivador transcripcional con motivo de unión PDZ (TAZ) pueden unirse a varios factores de transcripción incluyendo p73, Runx2 y varios Teads (Badouel C. et al., 2009; Wang K. et al., 2009). YAP/TAZ es incapaz de unirse al ADN por sí mismo. En su estado activo, YAP se une al factor de transcripción TEAD, y el complejo YAP-TEAD queda localizado en el núcleo. Esto permite la expresión de varios genes que promueven el crecimiento de órganos, tales como la ciclina E, que promueve la progresión del ciclo celular, y DIAP1 (inhibidor de Drosophila de apoptosis proteína-1), que, como su nombre indica, previene la apoptosis (Huang J. et al., 2005). YAP también activa la expresión de la bantam microARN, una pequeña molécula de RNA reguladora del crecimiento que afecta específicamente al número de células (Thompson B. et al., 2006; Nolo R. et al., 2006).

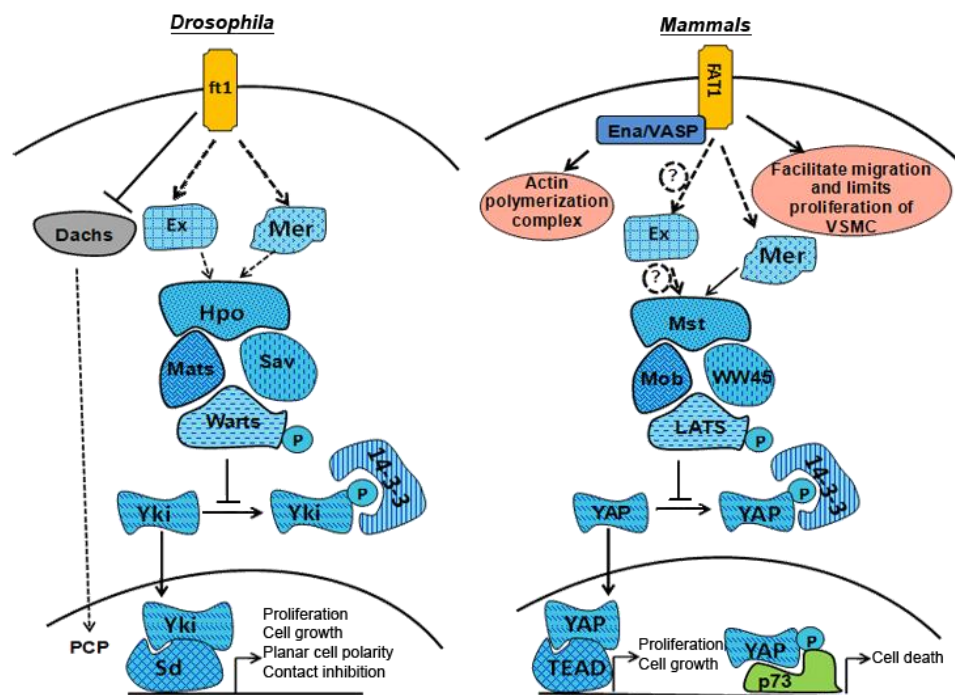


Fig.12 Vía de señalización intracelular oncogénica activada por Hippo: la cascada de señalización se origina a partir de la activación constitutiva de Mst mutado, que provocan la inhibición de la apoptosis y proliferación celular. YAP es uno de los mecanismos principales de la activación oncogénica. Imagen obtenida de atlasgeneticsoncology.org

En resumen, la inactivación de YAP por LATS inhibe el crecimiento a través de la represión de la transcripción de estos reguladores pro-crecimiento. Esto se produce por fosforilación en la serina 168

YAP por LATS, promoviendo la asociación de YAP con las proteínas 14-3-3, que ayudan a anclar YAP en el citoplasma y prevenir su transporte al núcleo. A pesar de que el núcleo de esta vía de señalización se conoce bien y, aunque se piensa que la vía Hippo regula la actividad de YAP y TAZ limitando sus acceso al núcleo, no se conocen los mecanismos relacionados con el cáncer por los cuales ésto sucede. Las vías de regulación de la transcripción siguen siendo un enigma.

1.3.1.5a. YES-ASSOCIATED PROTEIN (YAP)

Muchos de los genes implicados en la vía de señalización Hippo son reconocidos como genes supresores tumorales, mientras que YAP / TAZ se identifican como un oncogen. De hecho, YAP se ha encontrado elevado en algunos cánceres humanos, incluyendo cáncer de mama, cáncer colorrectal, y cáncer de hígado (Kango-Singh M. et al., 2009; Zender L. et al., 2006; Steinhardt A.A. et al., 2008).

La vía Hippo regula, y está regulada, por varias propiedades celulares vinculadas a la tumorigénesis (Tapon N. et al., 2002; Huang J. et al., 2005).

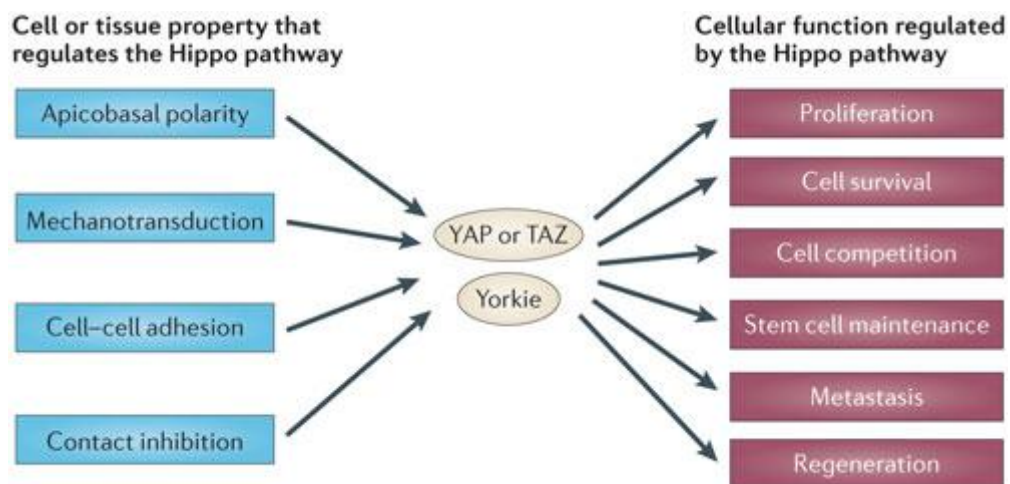


Fig.13. Esquema de las propiedades celulares vinculadas a la tumorigénesis alteradas por YAP o TAZ. Imagen obtenida de Nature Reviews Cancer 13 (2013).

La proliferación celular incontrolada es un aspecto fundamental en la neoplasia. Las mutaciones en proteínas de la vía Hippo que conducen a la hiperactivación o sobreexpresión de Yap o TAZ causan exceso de proliferación celular en múltiples órganos, incluidos el hígado, el tracto gastrointestinal, la piel y corazón (Dong J. et al., 2007; Camargo F.D. et al., 2007; Schlegelmilch K. et al., 2011; Heallen T. et al., 2011).

Por otro lado, no se han descrito evidencias del control fisiológico de la apoptosis por la vía Hippo en mamíferos, pero la sobreexpresión de Yap promueve la supervivencia celular tanto in vivo como en cultivos celulares (Dong J. et al., 2007). Asimismo, en líneas celulares de cáncer, la sobreexpresión de

YAP promueve la resistencia a la apoptosis inducida por agentes quimioterápicos y la anoikis (Zhao B. et al., 2012; Zang X. et al., 2011).

Aunque controvertido, se ha propuesto que las células tumorales asumen propiedades que se asocian con las células progenitoras o células madre (Valent P. et al., 2012). Varios estudios han relacionado componentes de la vía Hippo con células madre. Se ha visto que Yap se expresa a menudo en compartimentos de células madre de diferentes tejidos de mamíferos (Camargo F.D. et al., 2007; Steinhardt A.A. et al., 2008); y tanto YAP como TAZ promueven la pluripotencialidad de las células madre embrionarias (Lian I. et al., 2010), y TAZ regula la diferenciación mesenquimal de las mismas. Por lo tanto, la hiperactividad de YAP y TAZ podría promover el potencial tumorigénico de las células neoplásicas potenciando sus propiedades células madre-like.

Se ha descrito la intervención de la vía Hippo en procesos a nivel de tejido, en relación a la arquitectura celular y tisular y a la función del mismo. La alteración de la arquitectura del tejido donde asientan es una característica fundamental de los tumores sólidos humanos. Se están definiendo la asociación entre “planar cell polarity” (Wang Y., 2009), “apicobasal cell polarity” (Robinson B.S. et al., 2010), “cell-cell adhesión” (Schlegelmilch K. et al., 2011) y tumorigénesis.

Recientemente se ha definido el papel de YAP en la superación de la inhibición por contacto en modelos in vitro, (una propiedad de control del crecimiento fundamental de las células normales en cultivo, en el que se detiene la proliferación una vez las células alcanzan la confluencia) (Eagle H. y Levine E.M., 1967). Esta propiedad se pierde normalmente en las células cancerosas, lo que les permite proliferar de una manera incontrolada (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000)). De hecho, se ha descrito que la sobreexpresión de YAP antagoniza la inhibición por contacto (Zhao B. et al., 2007).

Aun sin definir, también es posible que la hiperactivación de YAP y TAZ pueda conducir a la carcinogénesis en tejidos que regeneran de forma crónica. Se han propuesto la infección crónica y el daño tisular como promotores de carcinogénesis en órganos con cambios regenerativos constantes, como puede ser el hígado (Stauffer J.K. et al., 2012).

Finalmente, un tema emergente en la investigación de la vía Hippo es el papel de esta vía en la invasión tumoral y la metástasis (Kapoor A. et al., 2014). Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de YAP puede promover la transición epitelio-mesenquimal en cultivos celulares y también la supresión de anoikis (Kapoor A. et al., 2014; Overholtzer M. et al., 2006), se podría concluir que la disregulación de la vía Hippo podría ser un promotor de metástasis, papel ya sugerido en algunos estudios de cáncer de próstata y mama (Cordenonsi M. et al., 2011; Zhao B. et al., 2012).

La mayoría de los estudios que describen una alteración de la vía Hippo se han basado principalmente en la detección inmunohistoquímica de YAP en el núcleo de las células tumorales, sabiendo que YAP induce un programa transcripcional de promoción del crecimiento de dichas células cuando está localizado en núcleo y que es infrecuente encontrarlo en el núcleo de tejidos normales (Steinhardt A.A. et al., 2008). YAP es nuclear en el 60% de los carcinomas hepatocelulares (Xu M.Z. et al., 2009), 15% de los carcinomas de ovario (Zhang X. et al., 2011) y 65% de los carcinomas de célula no pequeña de pulmón (Wang Y. et al., 2010).

1.3.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR EN LOS PanIN

Las lesiones de PanIN presentan las mismas alteraciones genéticas encontradas en los APD. Existe una clara acumulación de alteraciones genéticas asociadas con la progresión histológica desde PanINs de bajo grado (I), intermedio (II) y alto grado (III) hasta carcinoma infiltrante (Maitra A. et al., 2006, Ghaneh P. et al., 2007; Hruban R.H. et al. 2007).

Está ampliamente aceptado que estas lesiones de PanIN constituyen la lesión precursora inicial del cáncer de páncreas. Casi todos los ADP y un gran porcentaje de lesiones de Pan-IN tienen mutación de KRAS (Löhr M. et al., 2005). Cada estadio asocia una acumulación progresiva de alteraciones genéticas, de línea germinal o somática, que afectan a oncogenes y genes supresores. El conjunto de estos cambios acumulados es el responsable final del crecimiento tumoral incontrolado, la invasión y la metástasis.

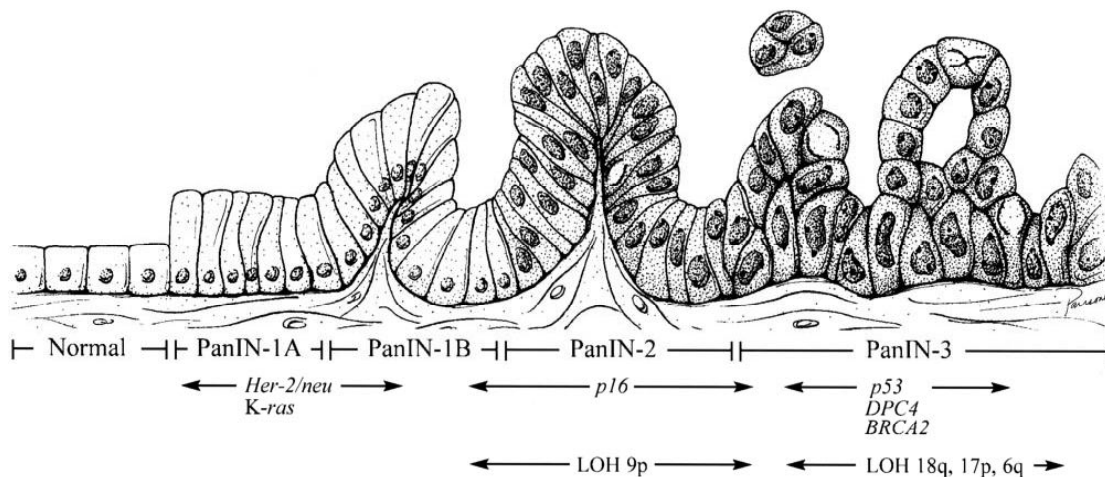


Fig. 14 Modelo de progresión histológico-genético del cáncer de páncreas. Figura obtenida de la publicación Wilentz et al., 2002.

El acortamiento telomérico y la activación puntual de mutaciones en el codón 12 del gen KRAS aparecen de forma precoz, mientras que hay una tendencia de mutaciones que inactivan el gen p16/CDKN2A en

las lesiones intermedias y la inactivación de SMAD4, TP53 y BRCA2 en lesiones avanzadas (Goggins M., 2000; Heinmöller E. et al., 2000; Lüttges J. et al., 2001; Maitra A. et al., 2003; Rosty C. et al., 2003; Guerra C. y Barbacid M., 2013). La hipermetilación de los genes ppENK, TSLC1 y p16 se ha demostrado en PanIN y su prevalencia aumenta en las lesiones de bajo a alto grado, así como el índice de proliferación celular, medido según expresión del Ki67 (Fukushima N. et al., 2002).

La progresión del tumor requeriría, al menos, la alteración del oncogen KRAS, en combinación con el gen supresor INK4a (p16), que junto a TP53 estaría frenando la progresión de PanIN a adenocarcinoma (Rugstgi A.K. et al., 2006).

HRuban apuntó que estas mutaciones ocurren temprano en el desarrollo de la neoplasia pancreática, otorgando una ventaja proliferativa a las células antes de que se desarrolle el cáncer invasivo (Hruban R.H. et al., 1993). Las mutaciones puntuales de KRAS podían detectarse en suero plasmático en pacientes con enfermedad neoplásica pancreática, sin embargo se suele detectar con mayor frecuencia en aquellos con enfermedad avanzada (Goggins M. et al., 2007). La cantidad de DNA en sangre de pacientes afectados de cáncer aumenta a medida que progresa la enfermedad. Los estudios que indican la presencia de KRAS mutado en DNA circulante en sangre periférica se iniciaron a finales de los años '90. Yamada y colaboradores fueron capaces de detectar mutaciones en el codón 12 de KRAS en el suero de 9 de cada 15 (60%) pacientes con tumores positivos para mutaciones de este codón (Yamada T. et al., 1998; Mulcahy H.E. et al., 1998). Aquellos pacientes que presentaban mutaciones en el DNA obtenido en sangre periférica eran significativamente mayores y presentaban peor pronóstico tras la resección quirúrgica del tumor frente a aquellos que eran negativos. La presencia de mutaciones de KRAS en el suero tendió a desaparecer en el 67% (6 de 9) de los pacientes, mientras que tres pacientes con KRAS persistente en suero antes y después del tratamiento, presentaron recurrencias tempranas o enfermedad progresiva (Yamada T. et al., 1998). Mulcahy y colaboradores encontraron resultados similares en el plasma de 17 de 21 pacientes, indicando que las mutaciones de KRAS pueden detectarse directamente del suero plasmático (Mulcahy H.E. et al., 1998). Sin embargo, posteriores estudios se han mostrado contrarios a los hallazgos iniciales, postulando que existe una correlación baja entre las mutaciones de KRAS en el tejido y el DNA circulante en sangre, ya que no parece que se encuentre entre las alteraciones genéticas más precoces del tumor (Marchese R. et al., 2006).

Kern y colaboradores defienden lo contrario, creen que no se encuentra entre las alteraciones genéticas más precoces de este tumor (Kern S.E. et al., 2008). Inicialmente se intentó poner en marcha un protocolo que detectaba este marcador en sangre de pacientes con enfermedad avanzada, pero no en la detección precoz de la enfermedad.

En resumen, el análisis molecular de las lesiones de PanIN no solo ha demostrado que estas lesiones son neoplásicas (tienen mutaciones clonales en genes asociados a cáncer) sino también que pueden

progresar (la prevalencia de dichas mutaciones aumenta a medida que aumenta el grado de lesión), aunque a veces también se han demostrado ciertas divergencias (Moskaluk C.A. et al., 1997; Yamano M. et al., 2003), sugiriendo que las lesiones de PanIN pueden contener múltiples alteraciones genéticas, pero solo algunas progresan a carcinoma infiltrante.

Avances en el estudio de la carcinogénesis del adenocarcinoma de páncreas han abierto nuevas vías para el diagnóstico y quimioprevención. A pesar de ello, el acceso al páncreas es limitado, los tests moleculares están en estadios iniciales y no se conoce lo suficiente sobre la historia natural de las lesiones precoces de PanIN como para justificar una resección y los screenings sólo se centran en personas de alto riesgo (Haugk B., 2010).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) constituye aproximadamente el 85% de los tumores del páncreas. Es el tumor en el que menos avances clínicos se han producido en los últimos 50 años y sigue teniendo un pronóstico muy desfavorable. Por ello, es necesaria la identificación de factores de riesgo y la caracterización del proceso de progresión tumoral, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Es necesario estudiar aquellos factores involucrados tanto en las vías de señalización celular, como en vías relacionadas con la transición epitelio mesénquima, alteraciones del metabolismo u otras que, en un contexto de múltiples alteraciones genómicas, pueden estar sobre expresados de una forma distintiva durante la progresión tumoral y ser potenciales dianas terapéuticas.

Dado que en la serie de adenocarcinomas de páncreas del Hospital Vall d'Hebrón, tenemos un amplio número de carcinomas en los que se ha podido valorar y estudiar las lesiones precursoras (PanIN de bajo grado y de alto grado), planteamos el estudio de la expresión de los factores más relevantes de dichas vías de señalización celular así como de otros parámetros clínicos y factores celulares implicados en el pronóstico tumoral, desde las lesiones preinvasivas hasta los tumores infiltrantes.

Para ello, planteamos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

En los adenocarcinomas de páncreas hay decenas de alteraciones genéticas, lo que le confiere un perfil molecular altamente complejo. En más del 70% de los casos existen mutaciones del gen RAS, que es una de las alteraciones genéticas mejor definidas en dichos tumores.

Dada la gran heterogeneidad molecular existente, nos planteamos un estudio inmunohistoquímico y molecular de aquellos factores centrales o embudos, que pudieran estar sobreexpresados durante la progresión de las lesiones precursoras de alto grado a adenocarcinomas infiltrante y ser eventuales dianas terapéuticas. Para su identificación y validación estudiaremos factores relacionados con la transformación y la proliferación tumoral, tanto en la vías de RAS (MAPK y EIF4E), la de AKT, mTOR, 4EBP1, vía Hippo y de transición epitelio-mesénquima.

OBJETIVOS

El objetivo central del presente trabajo es el estudio inmunohistoquímico y molecular de factores asociados con las vías de señalización celular y de transición epitelio-mesénquima, en el contexto de la progresión tumoral desde lesiones precursoras a adenocarcinomas infiltrantes, así como su correlación clínico-patológica.

- 1- Describir un modelo de progresión tumoral en base a los niveles de expresión de diferentes proteínas involucradas en las vías de señalización celular, estudiados en lesiones precursoras de PanIN de bajo grado y PanIN alto grado, asociados tanto a pancreatitis crónica como a adenocarcinomas.
- 2- Determinar la presencia de diferentes tipos de mutaciones del gen RAS en la serie de adenocarcinomas pancreáticos y correlacionarlas con la expresión de proteínas de las vías señalización y las características clínico-patológicas, incluyendo supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.
- 3- Correlacionar los niveles de expresión inmunohistoquímicos de los factores implicados en las vías PI-3K y MAPK y moleculares con las características clínicas y la evolución de los pacientes y proponer factores asociados con pronóstico o predictores de transformación maligna a adenocarcinomas.
- 4- Valorar la expresión y correlación clínico-patológica de factores relacionados con la transición epitelio-mesénquima, como la N-cadherina y el YAP1.
- 5- Estudiar y correlacionar factores asociados con el estroma peritumoral (proteína P16, desmoplasia e infiltrado inflamatorio) con la progresión y características clínico-patológicas de la serie de adenocarcinomas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE ESTUDIO

Estudio descriptivo con datos retrospectivos, de ámbito hospitalario, de una serie de 78 casos consecutivos de Adenocarcinomas de páncreas procedentes de pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario Vall d' Hebron (HUVH) entre los años 2003 a 2009. Se han estudiado únicamente piezas de resección tumoral, y no biopsias endoscópicas, para asegurarnos tener material suficiente para realizar el estudio inmunohistoquímico.

3.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Selección de pacientes con diagnóstico de ADP, según criterios clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos establecidos, sin tratamiento previo a la cirugía, con muestras almacenadas en bloques de parafina en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d' Hebron (HUVH). En todos los casos se utilizó la plantilla establecida, que recoge los datos patológicos relevantes a la hora del diagnóstico final y que se expone a continuación.

PIEZA QUIRÚRGICA REMITIDA COMO :

TIPO HISTOLÓGICO:
GRADO HISTOLÓGICO:
ESTADIFICACIÓN pTNM:

Focalidad del tumor:
Localización:
Tamaño del tumor :
Sólido / quístico
Cápsula :
Extensión de la invasión (T)

Ganglios linfáticos regionales (N):
Nº de ganglios identificados:
Nº de ganglios invadidos:

Metástasis a distancia (M):

Invasión vascular venosa:
Invasión linfática:
Invasión perineural:

Margen quirúrgico :
* Parenquimatoso :
* Conducto biliar :
* Gastro-intestinal :

PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TUMOR:
OTROS HALLAZGOS PATOLÓGICOS :

3.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Pérdida del seguimiento del paciente tras la cirugía.

Material insuficiente para diagnóstico (material enviado fuera, realización de otros estudios)

Aplicados los criterios de exclusión, el estudio se centra sobre 64 casos correspondientes a:

- 51 duodenopancreatectomías cefálicas
- 2 duodenopancreatectomías cefálicas y antrectomía gástrica
- 8 pancreatectomías córpore-caudales, junto con esplenectomía
- 3 pancreatectomías totales, junto con esplenectomía

Asimismo se realizó el estudio descriptivo con datos retrospectivos, de ámbito hospitalario, de una serie de 15 casos de pancreatitis crónica, procedentes de pacientes intervenidos en el Hospital Universitario Valle de Hebrón (HUVH) entre los años 2003 a 2009.

Como casos control se utilizaron 5 muestras procedentes de resecciones pancreáticas por tumores neuroendocrinos, en los que se estudió la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en el conducto biliar pancreático.

3.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y PARÁMETROS HISTOLÓGICOS

3.2.1. REVISIÓN DE INFORMES DE PATOLOGÍA Y DE LOS DATOS HISTOLÓGICOS:

A partir del archivo documental del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron y la historia clínica (documentos clásicos en papel e historia informatizada).

Se revisaron las secciones histológicas de hematoxilina-eosina de cada caso (una media de 12 laminillas por caso), para homogenizar los parámetros histológicos que se valoran. En todos los casos se comprobó el diagnóstico histológico. Se recogieron otros datos adicionales para los casos de PC y ADP.

3.2.2. CREACIÓN DE BASE DE DATOS:

Se identificaron de forma numérica y anónima todos los casos seleccionados, incluyendo las variables de estudio y de resultado. Se obtuvieron distintas variables clínico-patológicas que se resumen en las tablas 9 y 10, adjuntas al final del capítulo.

3.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Todos los anticuerpos se pusieron a punto mediante el módulo de tinción Benchmark XT, utilizando el *ultraView* Universal DAB Detection kit de Ventana Medical Systems, el cual se basa en un sistema indirecto y desprovisto de biotina, para detectar IgG de ratón, IgM de ratón y anticuerpos primarios de conejo. El módulo de tinción Benchmark XT utiliza un sistema automatizado, cada paso se incubaba durante un tiempo y a una temperatura determinada. El desparafinado se realiza mediante la solución EZ prepTM (10x) y el desenmascaramiento con la solución (Cell Conditioning 1, Pre-diluido ph 8).

Una vez realizado el desenmascaramiento a pH8, las muestras se bloquean con solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Los anticuerpos primarios se localizan mediante un anticuerpo secundario marcado con una enzima. El complejo resultante se visualiza utilizando un producto enzimático que precipita (sustrato de peróxido de hidrógeno y cromógeno de tetrahidrocloruro de 3, 3'-diaminobencidina DAB).

Las secciones se contrastan con Hematoxilina de Harry's, deshidratadas y montadas de forma permanente para su estudio en el microscopio óptico.

Las valoraciones se realizaron en un microscopio óptico (Olympus CH-2 modelo CHS) a un objetivo de 4x para la identificación de campos a estudio, y a un objetivo de 40X para la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de los diferentes marcadores en las muestras, evitando la valoración de la neoplasia cercana a áreas de necrosis.

Tabla 8. Resumen de los anticuerpos utilizados

ANTICUERPO	CLONALIDAD	CLON	DILUCIÓN	Ph	CASA COMERCIAL
Ca19.9	Mouse	121SLE	Prediluido	8	Ventana medical System
Anti-4E-BP1	Rabbit polyclonal	Ser112	1/50	8	Cell Signaling
Anti-p4E-BP1	Rabbit polyclonal	Thr 70	1/25	8	Cell Signaling
Anti-eif4E	Rabbit policlonal	Ser209	1/75	8	Cell Signaling
Anti-peif4E	Rabbit monoclonal	EP2151Y	1/50	8	Abcam
Anti-pmTOR	Rabbit polyclonal	Ser2448	1/100	8	Cell Signaling
Anti-pMAPK	Rabbit polyclonal	Thr202/tyr204	1/50	8	Cell Signaling
PS6	Rabbit polyclonal	Ser240/244	1/100	8	Cell Signaling
P16	Mouse	E6H4™	Prediluido	8	Ventana medical System
p53	Mouse	DO-7	Prediluido	8	Ventana medical System
Ki67	Rabbit monoclonal	30-9	Prediluido	8	Ventana medical System
YAP-1	Rabbit polyclonal	WWTR.1	1/50	8	Sigma-ALDRICH
N-Cadherina	Rabbit polyclonal	ab18203	1/300	8	Abcam

3.3.1. VALORACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LAS DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN:

3.1.1. VALORACIÓN DE PMTOR, P/T4EBP1, PS6, PMAK, P/TEIF4E, YAP1, N-CADHERINA Y P16:

Se procedió a la evaluación microscópica de corte completo por dos patólogos entrenados, con una variabilidad interobservador del 5%.

La valoración inmunohistoquímica se realizó mediante un método semicuantitativo, valorando en cada caso la extensión (porcentaje de células teñidas dependiendo de su localización y analizando la localización por separado, en citoplasma y/o núcleo) y la intensidad de inmunotinción (0 = ausente, 1 = débil, 2 = moderada, 3 = marcada). Se empleó un score histológico obtenido de aplicar la fórmula:

$$\text{HSCORE} = 1 \times (\% \text{ débil}) + 2 \times (\% \text{ moderado}) + 3 \times (\% \text{ intenso})$$

Con ello se obtuvo un score que variaba de 0 (inmunoexpresión nula) a 300 (máxima inmunoexpresión), permitiendo establecer comparaciones estadísticas.

Este método de valoración inmunohistoquímica ha demostrado una buena correlación con los ensayos bioquímicos estándar que utilizan tejido en fresco homogeneizados para la valoración y cuantificación del grado de expresión de receptores de estrógenos en el cáncer de mama (McClelland RA, 1990; Vermeulen PB, 1996). Además, la utilización de Hscore ha demostrado una gran reproducibilidad entre observadores (Pertschuk LP, 1985; Shimada A, 1985; Wilbur DC, 1992).

3.3.2. VALORACIÓN DE N-CADHERINA EN MEMBRANA:

La valoración inmunohistoquímica de N-cadherina en membrana se realizó en corte completo, mediante un método semicuantitativo, valorando en cada caso la extensión (porcentaje de células teñidas en membrana) y la intensidad de inmunotinción (0 = ausente, 1+ = débil, membrana incompleta; 2+ = moderada, membrana incompleta, 3+ = moderada-marcada, membrana completa en más del 10% de las células) (Wolff A.C. et al., 2013).

3.3.3. ESTUDIO DE P53 Y PROLIFERACIÓN CELULAR / KI67:

El estudio de la proteína p53 se realizó mediante la determinación inmunohistoquímica de la tinción nuclear para p53. El conteo se realiza de forma cuantitativa, expresando el porcentaje de núcleos positivos valorando el corte completo.

Para la cuantificación del porcentaje de actividad proliferativa en los distintos tumores se realizó la determinación inmunohistoquímica de la tinción nuclear para Ki67. El conteo se realiza de forma cuantitativa, expresando el porcentaje de núcleos positivos, valorados en áreas de mayor expresión.

La proteína Ki67 tiene una vida media corta y su expresión es necesaria en la progresión del ciclo celular (Schulter C, 1993). Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón que detecta las células en fase G1 tardía, S, M, G2. El análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo Ki67 es la técnica de elección para la valoración del índice de proliferación celular en tejidos humanos parafinados.

3.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN RAS

Se ha realizado estudio mutacional en todos los casos. En el estudio de los exones de KRAS y NRAS nos basamos en la frecuencia con la que se describen las mutaciones, y en que las mutaciones son excluyentes. Si no detectamos mutaciones en estos exones consideramos el caso como "wild-type" (WT) para los exones estudiados.

3.4.1. SELECCIÓN DEL MATERIAL:

El material para el estudio se obtiene a partir de bloques de parafina que incluyen secciones tumorales representativas, de material procedente de intervención quirúrgica, fijado previamente en formalina y posterior inclusión en parafina.

El material se selecciona a partir de secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina, en las que se identifican áreas tumorales representativas. Se excluye el tejido tumoral necrótico y no tumoral. Se realizan secciones de 5-10 μm de grosor, hasta un total de 50 μm (dependiendo del área tumoral), que se depositan en tubos de Eppendorf estériles de 1,5 ml.

3.4.2. EXTRACCIÓN DE DNA:

a) Desparafinado.

Se realizan lavados con xileno (xilol) y etanol. El número de lavados puede variar en cada caso, dependiendo de la cantidad de parafina que contenga el tejido. El volumen añadido, tanto de xileno como de etanol, en cada lavado es de 1 ml. Se centrifuga durante 1 minuto a 14000 revoluciones por minuto (rpm), y se descarta el sobrenadante.

b) Extracción de ADN de muestras parafinadas:

Preparación de la muestra de 48 horas antes de la extracción. El primer día se centrifuga la muestra 1 min a 13200 rpm (Centrifuge 5415 R, *Eppendorf*), se calienta sin agitación en la Thermomixer comfort (*Eppendorf*) a una temperatura de 75°C durante 5 minutos, se añaden 190 μl de Buffer G2 (*Qiagen*) y se

incuba a 75°C durante 5 minutos en agitación en la thermomixer. Luego, se añaden 10 µl de Proteínasa K (Qiagen), se vortea y se incuba toda la noche en la thermomixer a 56°C y a 1400 rpm.

El segundo día se vuelven a añadir 10 µl de Proteínasa K, se vortea y se incuba a 56°C en la thermomixer a 1400 rpm. Al día siguiente se centrifuga la muestra 1 min a 1200 rpm para eliminar las gotas de la tapa del eppendorf, se añaden 2 µl de glicógeno y se homogeneiza la muestra con una pipeta en el caso de que queden restos de tejido. Se pipetea la parte del fondo del eppendorf en un tubo de extracción y se coloca en el extractor de ácidos nucleicos Bio-Robot EZ-1 (Qiagen) y posteriormente con la tarjeta de parafina y con un volumen final de elución de 100 µl.

Una vez obtenido el ADN, se cuantifica con el *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000* (valores en ng/µl). Esto nos marcará el volumen de la muestra que se requerirá para poder realizar las PCRs posteriores (Figura 8).

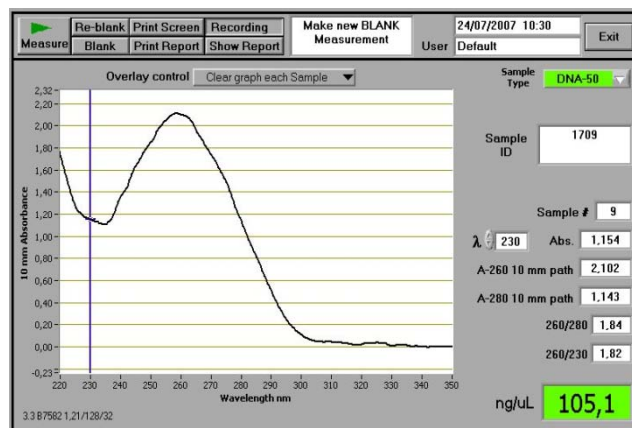


Fig.15. Cuantificación de ADN de un paciente. En cada cuantificación observamos el la ratio de absorbancia 260/280. Su valor óptimo es de 1.8-2 con un margen de error del 10-20%. Si este no entra dentro de estos valores se repetirá la cuantificación y si se repite la situación descrita anteriormente se repetirá de novo la extracción de la muestra.

En el caso de KRAS se compara con una amplificación PCR estándar y posteriormente con una secuenciación Sanger. La PCR se obtuvo utilizando primers forward y reverse 1x Mytaq Reaction Buffer, 0'12 microM , 0'3 U MyTAq DNA polimerasa (Bioline) y 50ng de DNA. Los primers utilizados fueron los siguientes:

KRAS Ex2 Forward: GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA

KRAS Ex2 Reverse: GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGCA

La amplificación se realizó en un termociclador de eppendorf a 95°C durante 10 minutos, posteriormente 37 ciclos a 95°C durante 60 segundos, a 55°C durante otros 60 segundos y a 72°C durante 60 segundos y finalmente un step de extensión de 10 minutos a 72°C. Los amplicones de DNA fueron tratados con Exonucleasa I y fosfatasa alcalina Shrimp (Exo sap, Affymetrix, Wooburn Green United Kingdom). Para la reacción se utilizó 2 µl de Exo sap y 5 µl de cada muestra a purificar. Las condiciones fueron 15 minutos a 37 °C para el tratamiento y 15 minutos a 80°C para la inactivación del mismo.

Para la secuenciación por PCR se utilizaron 2 µl de DNA purificado, 1 µl de Big Dye, 1 µl de 3.2 µM de primer forward o reverse y 1 µl de buffer secuenciador (Applied Biosystems). Se realizaron amplificaciones en un eppendorf termociclador en las siguientes condiciones: 2 min a 96°C y 30 ciclos a 96°C durante 10 segundos, a 50°C durante 5 segundos y a 60°C durante 4 minutos. Las secuencias se purificaron siguiendo el protocolo de manufacturer's X-Terminator (Applied Biosystems) y posteriormente se analizaron con el Chromas Pro Software (version 2.4)

c) PCR de actina:

Uno de los mayores problemas que se presentan en los laboratorios de análisis clínicos es el de la distinción entre aquellas muestras negativas ciertas y aquellas en las que se ha producido una inhibición de la reacción de amplificación, por la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra, o por la degradación del ADN del paciente. Para evitar estos falsos negativos, se introduce una pareja de primers que amplifican una región de ADN que está en todos los individuos, tanto sanos como en enfermos con patologías diversas. Una región que cumple estas condiciones es el gen de la β-actina. El gen de la β-actina es un gen estructural, que codifica una proteína que forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto.

La mezcla de actina contiene por muestra: 5 µl de Buffer 10x sin MgCl₂, 4 µl de MgCl₂ [25mM], 2 µl de DNTPs [5mM], 1 µl ACT 1S [20pmol/µl], 1 µl de ACT 2S [20pmol/µl], 35 µl de H₂O y 0.25 µl de Taq promega. El Buffer 10x, el MgCl₂, los DNTPs y la Taq Promega son de *Promega*. Los primers usados son de la casa *Operon* y tienen la secuencia siguiente:

ACT 1S → 5' ATG TAC GTT GCT ATC CAG GCT G 3'

ACT 2S → 5' CCG TGG TGG TGA AGC TGT AG 3'

La concentración óptima de esta técnica es de 100 ng/µl. Las condiciones de la PCR son: (95°C, 10min) + [(95°C, 40sec), (63°C, 40sec), (72°C,40sec)] x 45 ciclos + (72°C, 10min).

En la figura 10 se muestran productos de amplificación para la β -actina (217 pb). Sólo seguirán los siguientes protocolos los ADN purificados que muestren la banda correcta una vez revelado el gel de agarosa. En caso contrario se repetirá la prueba.

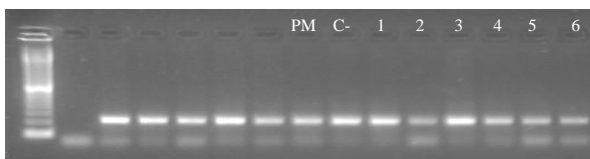


Fig. 16. Electroforesis en un gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación de muestras de pacientes. Carril PM: Ladder de 100 pb (Amersham). Carril C-: Control negativo. Carriles 1-12: Muestras de pacientes. Carril C+: Control positivo. Los fragmentos de ADN amplificados se resolvieron por electroforesis horizontal en un gel teñido con bromuro de etidio.

3.4.3. INTERPRETACIÓN DE LAS SECUENCIAS (VALORACIÓN DE RESULTADOS):

Por cada caso estudiado se obtienen las lecturas de las dos cadenas, que se interpretarán según la cadena de DNA de la secuencia original (no mutada).

Una vez se detecta un cambio en la secuencia se debe confirmar en la cadena complementaria (si es posible, estudiar la mutación por duplicado con una segunda PCR). Todas las mutaciones detectadas en nuestra serie han sido confirmadas en las dos cadenas.

Una vez definimos la mutación, la expresamos según la nomenclatura de la *Human Genome Variation Society (HGVS)*, que se utiliza como sistema internacional. De esta manera describimos la mutación a nivel del DNA *genómico* o a nivel proteico.

Análisis de mutaciones en los exones 3 y 4 del gen KRAS y exones 2, 3 y 4 del gen NRAS :

En los casos en los que no se detectaron mutaciones en los exones estudiados del gen KRAS por vía convencional, se amplía el estudio a otros y al gen NRAS.

El estudio de estas mutaciones se realiza mediante la metodología de pirosecuenciación.

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación a tiempo real, con detección por luminiscencia de la síntesis de la cadena de DNA. Es una tecnología libre de electroforesis, donde se realiza una primera PCR para amplificar el fragmento a estudiar y una segunda reacción (la pirosecuenciación en sí) en la que se analiza propiamente los codones (o aminoácidos) de interés. Las condiciones de las diferentes reacciones son las determinadas por el propio kit de pirosecuenciación “Therascreen Ras Pyro Kit”, que permite la detección cuantitativa de mutaciones en los codones 12, 13, 58, 59, 61, 117 y 146 del gen NRAS así como los codones 58, 59, 61, 117 y 146 de KRAS en muestras de ADN genómico, con una sensibilidad de detección de hasta un 5% de alelos mutados en la muestra analizada.

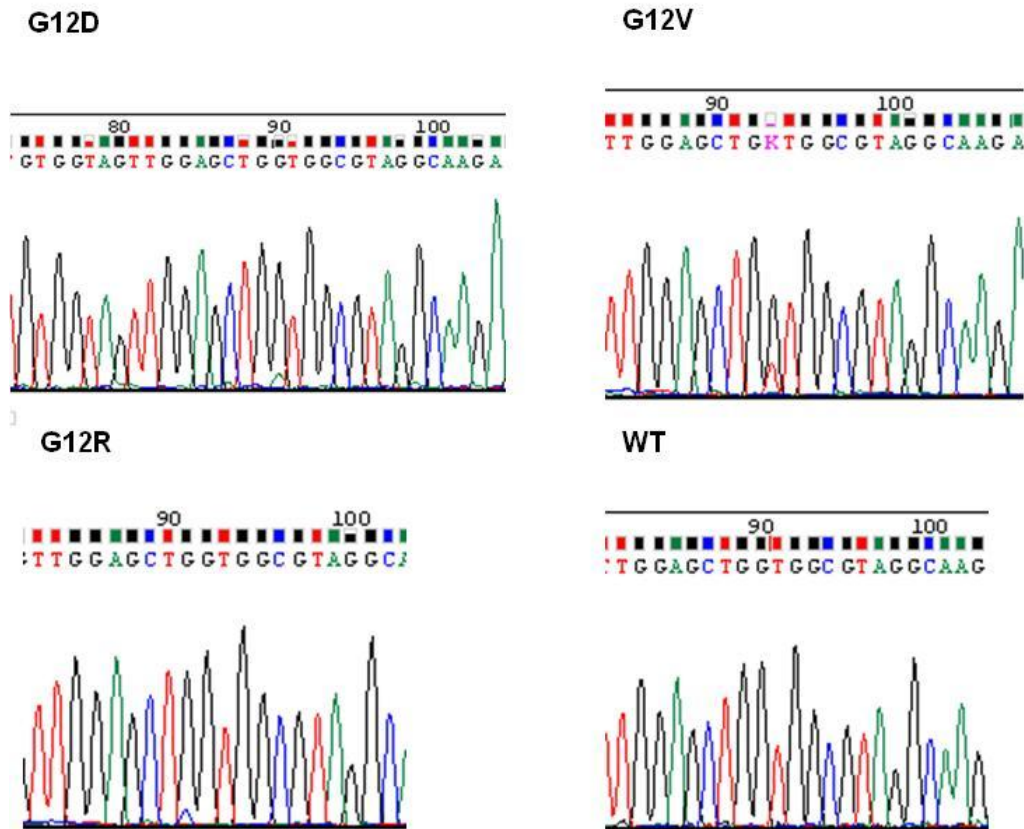


Fig.17. Lectura de diferentes mutaciones de KRAS

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la veracidad de las hipótesis de trabajo, los datos obtenidos se han analizado con el software estadístico SPSS (IBM-SPSS-Statistics, versión v.21).

Se realiza:

- estadística descriptiva de variables cuantitativas continuas, determinando la media, mediana, desviación estándar y rango de cada una de ellas, representadas en forma de histogramas. Análisis de frecuencias de las variables cualitativas estudiadas.
- estadística inferencial. Se han utilizado pruebas paramétricas para la comparación de variables cuantitativas, cuando los datos estudiados siguen una distribución normal y la muestra estudiada es grande ($n > 30$); y pruebas no paramétricas para el estudio de variables cuantitativas y cualitativas ordinales o nominales, cuando los datos estudiados no cumplen criterios para aplicar pruebas paramétricas. Se han considerado diferencias estadísticamente significativas las que muestran un valor de $p < 0,05$.

Las pruebas estadísticas aplicadas han sido las siguientes:

a) Pruebas paramétricas:

- Test t de Student para comparar las medias de dos variables cuantitativas y decidir si la diferencia entre éstos parámetros es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) o si sólo son diferencias aleatorias.
- Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson como prueba de asociación o dependencia entre dos variables cualitativas.
- Test exacto de Fisher: permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a analizar no cumple las condiciones adecuadas para aplicar el test Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson.
- Análisis de la varianza ANOVA: utilizada para comparar medias de una variable con tres o más niveles.
- Test de Scheffe: aparece después de un anova cuando se compara alguna variable cuantitativa con una cualitativa de más de 2 grupos. Nos permite ver, en comparaciones 2 a 2, en que lugar se encuentra la diferencia.

b) Pruebas no paramétricas:

- Prueba U de Mann-Whitney para comparar las medias de dos variables cuantitativas independientes.
- Kruskal-Wallis: cuando no se cumplen las condiciones de aplicación de ANOVA.
- Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier: para los eventos éxitos por cualquier causa (supervivencia global), éxitos asociado a la enfermedad (supervivencia específica) y metástasis (supervivencia libre de recurrencia). Se ha usado la prueba del log-rango para las comparaciones entre grupos.
- Análisis multivariante. Modelo de regresión de Cox: para el estudio de supervivencias en relación a diversos factores de riesgo. Modelo de riesgos proporcionales.

Este trabajo tiene la aceptación del Comité Ético de Investigación Clínica y Comisión de Investigación del Hospital Universitario Vall de hebron, con núm. de registro PR(SC)108/2010.

Tablas 9 y 10. Descripción de las variables recogidas en la base de datos de la Pancreatitis crónica y ADP

VARIABLES DE ESTUDIO	
PANCREATITIS CRÓNICA	
VARIABLES DE RESULTADO	
Edad	Variable cuantitativa continua (referida al momento del diagnóstico)
Sexo	Variable cualitativa nominal
Ca19.9 suero	Variable cuantitativa continua. Se recoge en U/ml
Fecha diagnóstico	Variable cuantitativa discreta. Coincide con fecha de cirugía
Pan-IN asociado	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Pan-IN1	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Pan-IN2	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	
Ca19.9 histología	Variable cuantitativa continua
N-cadherina	Variable cuantitativa continua. La valoración de membrana se recoge como variable cualitativa nominal: 0, 1+, 2+ y 3+
beta-catenina	Variable cualitativa nominal. Se recoge como: 0, 1+, 2+ y 3+
pMAPK	Variable cuantitativa continua
pmTOR	Variable cuantitativa continua
4E-BP1	Variable cuantitativa continua
P4E-BP1	Variable cuantitativa continua
eiF4E	Variable cuantitativa continua
peiF4E	Variable cuantitativa continua
pS6	Variable cuantitativa continua
p53	Variable cuantitativa continua
p16	Variable cuantitativa continua
YAP-1	Variable cuantitativa continua
Ki67	Variable cuantitativa discreta. Se recoge en forma de porcentaje (%)
SEGUIMIENTO CLÍNICO	
Fecha de último control	Variable cuantitativa discreta

VARIABLES DE ESTUDIO	
ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS	
CLÍNICO-PATOLÓGICAS	
Edad	Variable cuantitativa continua (referida al momento del diagnóstico)
Sexo	Variable cualitativa nominal
Ca19.9 suero	Variable cuantitativa continua. Se recoge en U/ml
Fecha diagnóstico	Variable cuantitativa discreta. Coincide con fecha de cirugía
Tipo de cirugía	Variable cualitativa categórica. Se recoge como duodenopancreatectomía cefálica (dpc), duodenopancreatectomía total (dpt), pancreatectomía corporo-caudal (pcc), con antrectomía, esplenectomía o resección de colon
Tamaño tumoral	Variable cuantitativa continua
Localización	Variable cualitativa nominal. Las localizaciones se han especificado en: cabeza, cuerpo y cola
Grado histológico	Variable cualitativa nominal. Se ha especificado: bien diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2), poco diferenciado (G3)
Desmoplasia asociada al tumor	Variable cualitativa nominal. Se ha especificado según intensidad: 0-1 mínima-leve; 2-3 moderada marcada
Inflamación asociada al tumor	Variable cualitativa nominal. Se ha especificado según intensidad: 0-1 mínima-leve; 2-3 moderada marcada
Pancreatitis de base	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Tipo de pancreatitis de base	Variable cualitativa nominal. Se recoge como: PC: pancreatitis crónica clásica; PCA: pancreatitis crónica atrófica; PCC: pancreatitis crónica cálcica; PCO: pancreatitis crónica obstructiva.
TNM	Variable cualitativa nominal
Pan-IN asociado	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Pan-IN1	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Pan-IN2	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Pan-IN3	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Invasión vascular	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Invasión linfática	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Invasión perineural	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
R1	Variable cualitativa dicotómica. Presencia de tumor en el margen quirúrgico de resección. Se recoge como: si/no
Ayudancia	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
ESTUDIO MUTACIONAL	
Mutación exon KRAS	Variable cualitativa dicotómica. Se recoge como: si/no
Tipo mutación exon KRAS	variable cualitativa nominal. Se recoge como: expresión según la nomenclatura proteica
Wild-type	Variable cualitativa nominal. Casos con ausencia de mutación en los exones de KRAS y de NRAS
ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	
Ca19.9 histología	Variable cuantitativa continua
N-cadherina	Variable cuantitativa continua. La valoración de membrana se recoge como variable cualitativa nominal: 0, 1+, 2+ y 3+
pMAPK	Variable cuantitativa continua
pmTOR	Variable cuantitativa continua
4E-BP1	Variable cuantitativa continua
p4E-BP1	Variable cuantitativa continua
eiF4E	Variable cuantitativa continua
peIF4E	Variable cuantitativa continua
pS6	Variable cuantitativa continua
p53	Variable cuantitativa continua
p16	Variable cuantitativa continua
YAP-1	Variable cuantitativa continua
Ki67	Variable cuantitativa discreta. Se recoge en forma de porcentaje (%)
SEGUIMIENTO CLÍNICO	
Fecha de último control	Variable cuantitativa discreta
Progresión	Variable cualitativa dicotómica. Progresión después de la cirugía. Se recoge como si/no
Fecha de progresión	Variable cuantitativa discreta
Localización de la progresión/recidiva	Variable cualitativa categórica
Exitus	Variable cualitativa dicotómica
Fecha de exitus	Variable cuantitativa discreta
VARIABLES DE RESULTADO	
Estado	Variable cualitativa nominal. Se recoge el evento resultado (estado del paciente en el último control: vivo sin enfermedad (VSE), vivo con enfermedad (VCE), muerto sin enfermedad (MSE), muerto con enfermedad (MCE)
Supervivencia global	Variable cuantitativa. Fecha del último control (o de éxitus) menos fecha de diagnóstico (en meses)
Supervivencia libre de progresión	Variable cuantitativa. Fecha del último control (o de recidiva o de metástasis o de éxitus) menos fecha de diagnóstico (en meses)

4.RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

4.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN ADP

Se han valorado una serie de parámetros clínico-patológicos de cada uno de los 64 pacientes incluidos en el estudio. Las variables estudiadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 11. Parámetros clínico-patológicos estudiados

Sexo
Edad
Ca19.9 suero
Localización tumoral
Tamaño tumoral
Grado histológico
Asociación con Pan-IN
Pancreatitis de base
Desmoplasia asociada al tumor
Inflamación asociada al tumor
Estadio tumoral
Parámetros con valor pronostico ⁽¹⁾ :
Margen quirúrgico afecto (R1)
Estadios avanzados
Invasión vascular
Invasión linfática
Invasión perineural
Metástasis hepáticas
Progresión y localización de la progresión

⁽¹⁾ Pancreatic Cancer. Haiyong Han & Daniel D Von Hoff, Cancer Cell 23, 2013

4.1.1.1. SEXO Y EDAD:

De los 64 ADPs estudiados, 31 casos (48'44%) se presentan en mujeres y 33 casos (51'56%) en hombres. El rango de edad se encuentra entre los 34 y 82 años, con una media de 62'66 años (DE=11'12) y mediana de 64'50, tal y como refleja el diagrama.

4.1.1.2. CA19.9 SUERO:

Los niveles de Ca19.9 en suero se encuentran entre 0'60 y 1922 U/ml, con una media de 367'57 U/ml (DE=534'07) y mediana de 151'90 U/ml, tal y como refleja diagrama.

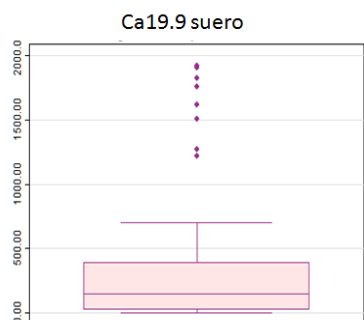


Fig. 18. Diagrama de cajas que muestra los niveles de Ca19.9 en suero de nuestra serie

4.1.1.3. LOCALIZACIÓN TUMORAL Y TIPOS DE INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA:

De los 64 casos de ADP, 54 casos (84'3%) se localiza en cabeza de páncreas, 4 (6'25%) casos en cuerpo de páncreas y 6 casos (9'37%) en cola de páncreas.

La localización tumoral determina la realización de los diferentes tipos de intervención quirúrgica, como muestran las fotografías macroscópicas realizadas a algunos de los casos seleccionados de nuestra serie

- 51 duodenopancreatectomías cefálicas
- 2 duodenopancreatectomías cefálicas y antrectomía gástrica
- 8 pancreatectomías córpore-caudales, junto con esplenectomía
- 3 pancreatectomías totales, junto con esplenectomía

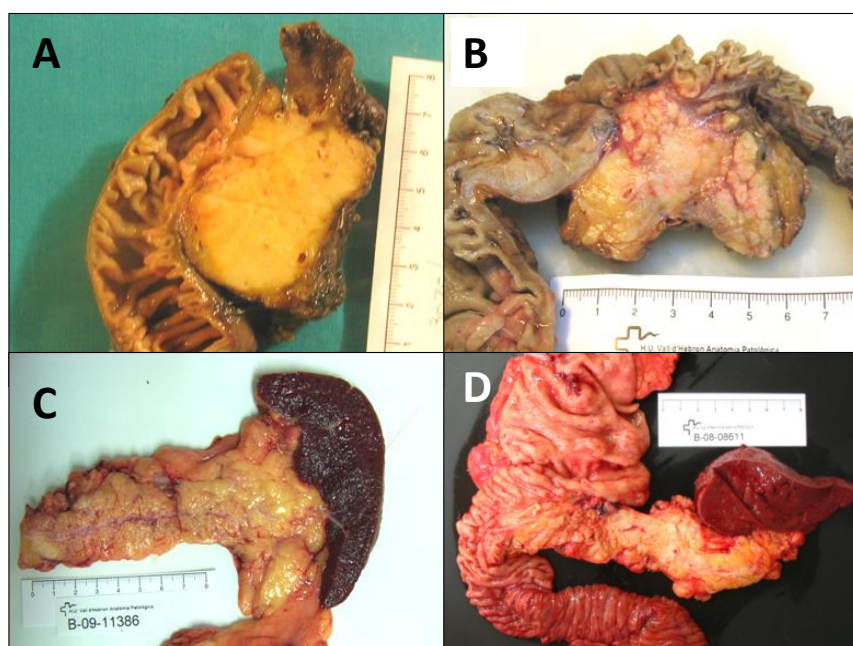


Fig. 19. Macrofotografías de los ADPs de nuestra serie: (A) ADP en cabeza de páncreas correspondiente a resección de Whipple; (B) ADP en cabeza de páncreas correspondiente a resección de Whipple y gastrectomía parcial; (C) ADP en cuerpo correspondiente a pancreatectomía distal con esplenectomía; (D) ADP en cuerpo correspondiente a duodenopancreatectomía total con esplenectomía y gastrectomía parcial,

4.1.1.4. TAMAÑO TUMORAL:

El tamaño es un parámetro importante para establecer el estadio, entra dentro del TNM y los estadios avanzados tienen peor pronóstico. En nuestra serie, el rango de tamaño tumoral se encuentra entre 0'5 y 7 cm, con una media de 2'77 cm (DE=1'18) y mediana de 2'5 cm. Del total, 14 casos (21'88%) presentan un tumor menor a 2cm y 50 casos (78'13%) mayor a 2 cm.

4.1.1.5. GRADO HISTOLÓGICO:

En nuestra serie observamos 4 casos (6'25%) de ADP bien diferenciados (G1), 46 casos (71'86%) de ADP con diferenciación moderada (G2) y 14 casos de ADP (21'87%) poco diferenciados (G3).

4.1.1.6. ASOCIACIÓN CON PanIN:

Del total de 64 casos, en 61 de ellos (95'31%) se identifican lesiones intraepiteliales pancreáticas (PanIN) asociadas al ADP en la pieza de resección quirúrgica. Solamente en 3 casos (4'69%) no se observa dicha asociación.

Tabla 12. Porcentaje de casos de la serie con diferentes grados de PanIN asociados

PanIN	Nº Casos ADP	Porcentaje %
Ausente	3	4'69%
Pan-IN 1	2	3'27%
Pan-IN 1+2	12	19'67%
Pan-IN 1+2+3	47	77'04%

4.1.1.7. PANCREATITIS CRÓNICA DE BASE:

En 41 casos (64'06%) la tumoración asienta sobre un páncreas con pancreatitis crónica, 24 de los casos (58'53%) correspondientes a pancreatitis crónica clásica, 13 casos (31'70%) a pancreatitis crónica atrófica, 2 casos (4'87%) a pancreatitis crónica cálcica y 2 casos (4'87%) a pancreatitis crónica obstructiva/litiásica no debidas al tumor.

4.1.1.8. DESMOPLASIA ASOCIADA AL TUMOR:

En nuestra serie, se observa desmoplasia asociada al tumor en todos los casos. En 11 casos (17'46%) observamos un grado de desmoplasia mínima o leve, en 28 casos (44'44%), moderada y en 25 casos (39'68%) marcada.

4.1.1.9. INFLAMACIÓN ASOCIADA AL TUMOR:

Los resultados de la valoración de la inflamación asociada a ADP en nuestra serie son: ausente/mínima en 5 casos (8'33%), leve en 36 casos (60.00%), moderada en 13 casos (21'66%) y marcada en 17 casos (28'33%).

4.1.1.10. ESTADIO TUMORAL:

En nuestra serie, el 9'38% de los casos se encuentran en un estadio IA, el 3'13% en estadio IB, el 21'88% en estadio IIA, el 56'25% en estadio IIB, el 4'69% en estadio III y otro 4'69% en estadio IV.

4.1.1.11. PARÁMETROS CON VALOR PRONÓSTICO:

Según los factores pronóstico actualmente establecidos (AFIP, 2007; Pancreatic Cancer. Haiyong Han & Daniel D Von Hoff, Cancer Cell 23, 2013), en nuestra serie se observa: invasión vascular en 42 casos (65'63%), invasión linfática en 37 casos (57'81%), invasión perineural en 49 casos (76'56%), afectación

del margen quirúrgico (R1) en 16 casos (25%), estadios avanzados (III y IV) en 6 casos (9'38%) y metástasis hepáticas metacrónicas en 22 casos (34'37%).

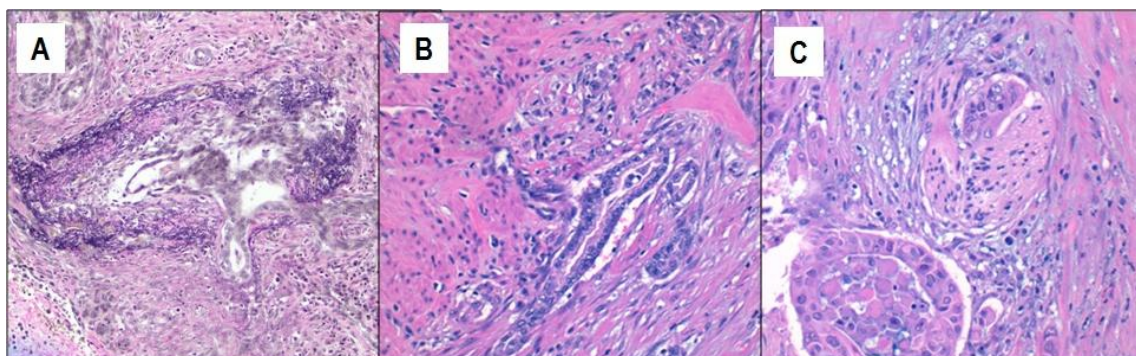


Fig. 20. Fotografías microscópicas de (A) invasión vascular, (B) invasión linfática, (C) invasión perineural.

Tabla.13 Resumen del porcentaje de aparición de los parámetros pronóstico en nuestra serie

Parámetros	Nº Casos	Porcentaje %
Invasión vascular	42	65'63
Invasión linfática	37	57'81
Invasión perineural	49	76'56
R1	16	25
Estadios avanzados	6	9'38
Metástasis hepática	22	34'37

4.1.1.12. TRATAMIENTO ADYUVANTE:

Del total de pacientes, 52 (81'25%) recibieron tratamiento adyuvante, consistente en quimioterapia y radioterapia (Gemcitabina+ RT). Los 12 pacientes restantes (18'75%) no recibieron tratamiento, 3 de ellos por defunción a las semanas posteriores a la cirugía y el resto por desestimación del tratamiento por el propio paciente.

4.1.1.13. PROGRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROGRESIÓN:

Se observó progresión de la enfermedad en 44 casos (69'84%), siendo la localización hepática la más frecuente, observada en 21 casos (32'81%). Otras localizaciones y sus porcentajes de aparición se resumen en la siguiente tabla.

Tabla.14. Resumen de las localizaciones de la progresión en nuestra serie

Localizaciones	Nº Casos (N=44)	Porcentaje
Local	14	31'81
Hígado	12	27'27
Hígado + otras localizaciones	9	20'45
Peritoneo/abdominal	6	13'63
Pulmón	2	4'54
Pulmón y hueso	1	2'27

4.1.1.14. EXITUS:

Los pacientes se clasificaron según exitus por enfermedad o exitus libre de enfermedad. Sin embargo, a la hora del estudio de supervivencias, se englobaron como exitus independientemente de la causa. En nuestra serie 53 casos (85.48%) fueron exitus y 9 casos (14.52%) seguían vivos hasta la fecha final del seguimiento, seguimiento que se ha realizado entre 2003 y 2015, con un promedio de 30'48 meses .

4.1.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE MUTACIONES DE RAS EN ADP

En nuestra serie 57 casos (89'06%) presentaron mutación de KRAS y 7 (10'94%) fueron Wild-type, tanto para mutación de KRAS como para mutación de NRAS.

Del total de casos mutados para KRAS, se realizó el estudio para determinar el tipo de mutación. El número y porcentaje según tipo se resume en la siguiente tabla. No se observó ninguna mutación en el codón 13.

Tabla.15. Resumen de los tipos de mutaciones

Tipo de mutación KRAS	Nº Casos	Porcentaje %
G12D	34	59'64
G12R	7	12'28
G12S	1	1'75
G12V	13	22'80
Q61K	2	3'05

4.1.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO:

Los controles externos e internos asociados a cada caso mostraron un patrón de positividad o negatividad según lo esperado, indicando una correcta optimización de la técnica y de los anticuerpos estudiados.

4.1.3.1. CA19.9 HISTOLÓGICO:

En nuestra serie la media de expresión de Ca19.9 es de 147'81 (DE=88'28), con una mediana de 160, tal y como refleja el diagrama.

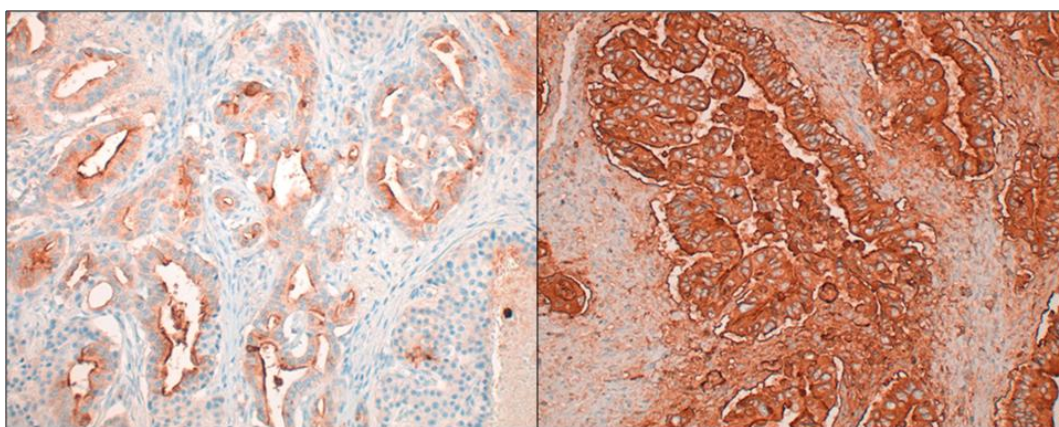
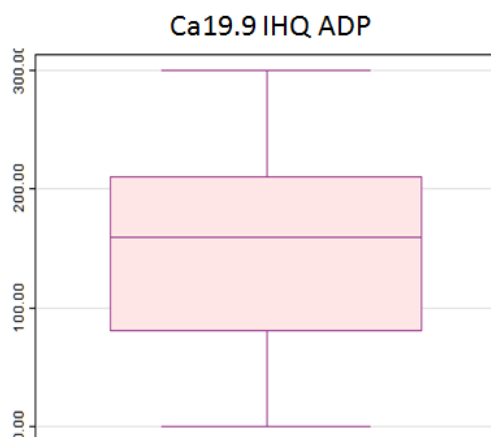


Fig. 21. Fotografías microscópicas de diferentes grados de expresión del marcador histoquímico Ca19.9 en los tumores de nuestra serie.

4.1.3.2. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS ESTUDIADOS IMPLICADOS EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN:

La media de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados, tanto en ductos de pancreatitis crónicas (PC) como en ADP y en las lesiones intraepiteliales precursoras asociadas a ambas patologías, se describe en la siguiente tabla. El estudio de expresión mediante H-score se realizó en el núcleo y el citoplasma independientemente, así como en el estroma en los casos de p16, p53 y N-cadherina.

Tabla 16. Media de expresión de las proteínas estudiadas en nuestra serie

Marcador IHQ	Ducto PC	PanIN 1 PC	PanIN 2 PC	PanIN 1 ADP	PanIN 2 ADP	PanIN 3 ADP	ADP
Ca19.9 c	257.14	0	61.11	0	13.97	132.44	147.82
Ca19.9 n	0	0	0	0	0	0	0
pmTOR c	185'71	13'08	6'15	0'25	8'35	26'78	57'03
pmTOR n	0	0	0	0	0	0	0
pS6 c	114'29	4'17	2'50	4'23	7'67	10'97	36'16
pS6 n	0	0	0	1.02	0.98	0	0
4E-BP1 c	16'58	21'55	35'70	43'85	51'90	75.00	95'08
4E-BP1 n	8'75	25'65	34'70	32'70	33'02	55'98	66'64
p4E-BP1 c	0	0	0	3'75	4'40	6'07	15'56
p4E-BP1 n	0'36	0'62	0'83	0'90	1'22	4'76	10'71
eIF4E c	30'15	30'83	46'36	25'04	46'92	83'41	110'39
eIF4E n	22'46	25	34'55	3'10	3'65	10'45	13'83
peIF4E c	46'43	75'77	78'75	38'43	60'94	112'13	148'20
peIF4E n	23'93	40'38	38'46	19'13	27'85	50'21	69'77
pMAPK c	12'46	13'16	15'45	10'38	4'62	17'57	50'78
pMAPK n	19'15	17'73	24'65	28'92	10'79	37'39	70'86
YAP1 c	92'86	0	0	15'25	25'52	42'12	72'85
YAP1 n	7'14	0	0	0'20	1'03	16'77	51'44
N-cadh c	114.29	115.38	133.33	45'56	193'15	239'47	151'41
N-cadh n	0	0	0	0	0	0	0
N-cadh estr	0						117'96
p16 c	2'71	5'69	14'92	7'80	5'96	12'87	22'60
p16 n	2'71	5'69	14'92	7'48	4'86	15'70	26'10
p16 estr	5.71						12'65
ki67	1'23	2'36	10'10	0'92	4'63	23'18	66'54
p53	0	0	0	0'21	3'16	18'81	35'44
p53 estr	0.21						0.27

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; PC: pancreatitis crónica; ADP: adenocarcinoma ductal pancreático; PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática; N-cadh: N-cadherina

Tabla 17. N-cadherina de membrana. Porcentaje de casos con positividad de membrana

Marcador IHQ	Ducto PC	PanIN 1 PC	PanIN 2 PC	PanIN 1 ADP	PanIN 2 ADP	PanIN 3 ADP	ADP
0	13'33	21'42	23'07	20'37	37'03	47'36	51'56
1+	86'66	21'42	30'76	62'96	12'96	7'98	20'31
2+	0'00	53'84	38'46	14'81	50'00	42'10	26'56
3+	0'00	0'00	0'00	1'85	0'00	2'63	1'56

PC: pancreatitis crónica; ADP: adenocarcinoma ductal pancreático; PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática

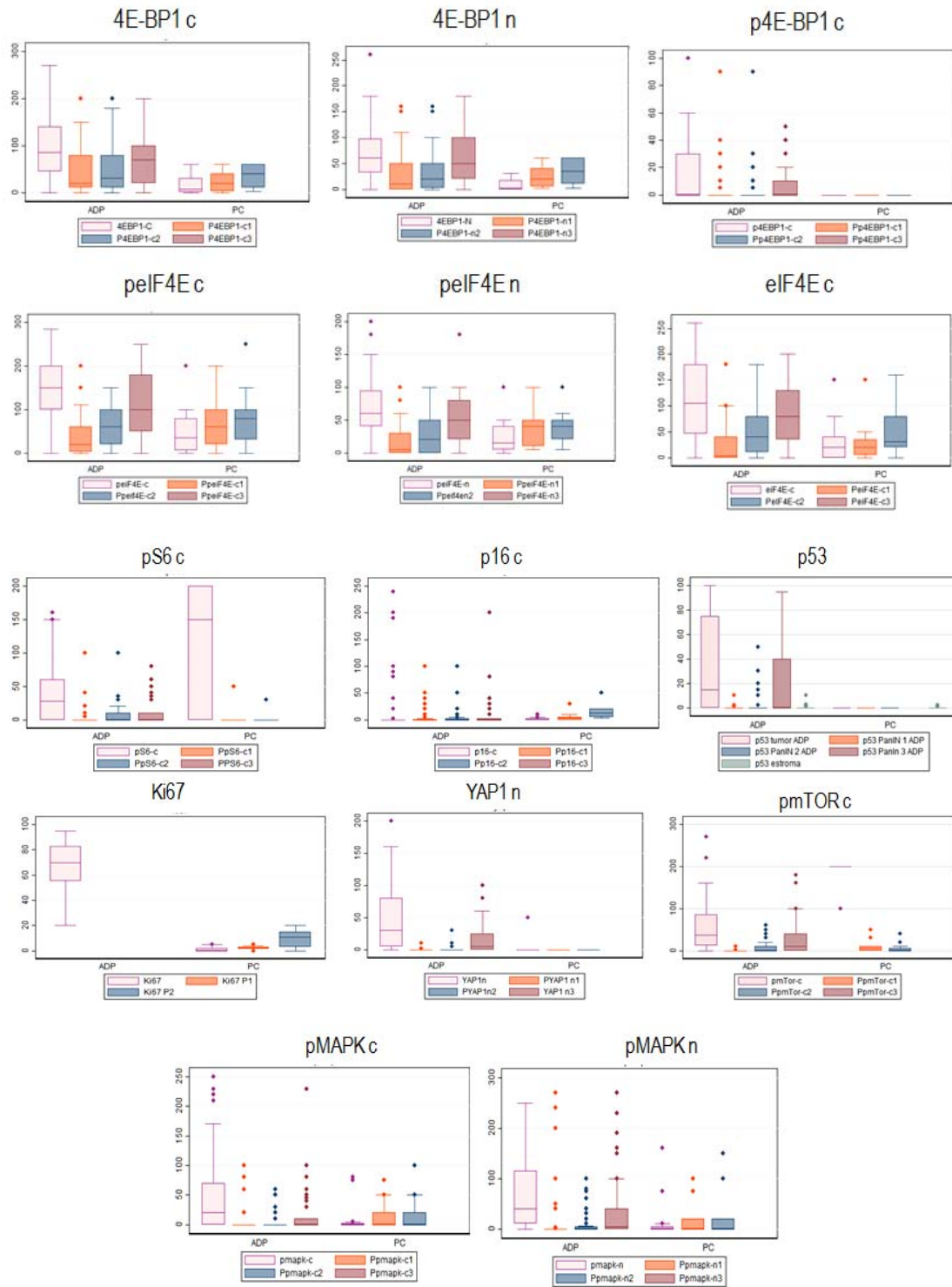


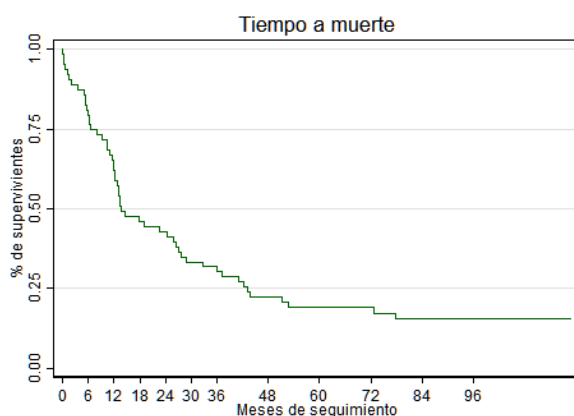
Fig. 22. Diagramas de cajas que muestran la distribución de la expresión de diversas proteínas, tanto en adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) y sus lesiones premalignas asociadas, comparado con la expresión en los casos de pancreatitis crónica (PC) y sus lesiones premalignas asociadas.

4.1.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE SUPERVIVENCIAS EN ADP:

4.1.4.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL:

La supervivencia global en nuestra serie es de 13.60 meses, con un tiempo promedio de seguimiento de 30'48 meses.

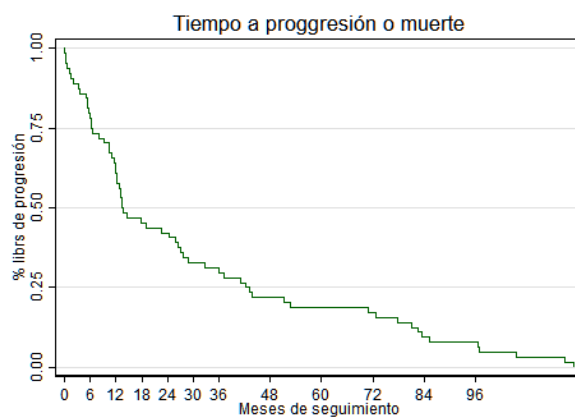
	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	de Tiempo a riesgo	de Tiempo promedio de seguimiento	de Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅
Total	64	53	2.72 (2.03; 3.55)	1950.97	30.48	6.63	13.60	43.13



4.1.4.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN:

La supervivencia libre de progresión en nuestra serie es de 13,40 meses.

	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	de Tiempo a riesgo	de Tiempo promedio de seguimiento	de Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅
Total	64	64	3.28 (2.53; 4.19)	1950.97	30.48	6.33	13.40	42.23



4.2. MODELO DE PROGRESIÓN

4.2.1. DUCTO PC / MAD → PanIN ASOCIADO A PC →ADP

Se ha estudiado la expresión de diversas proteínas implicadas en las diferentes vías de señalización que se describen alteradas en el desarrollo del ADP, valorando los niveles de expresión desde Ducto PC → lesiones de PanIN asociadas a PC →ADP, para proponer un modelo de progresión basado en el estudio de estas vías.

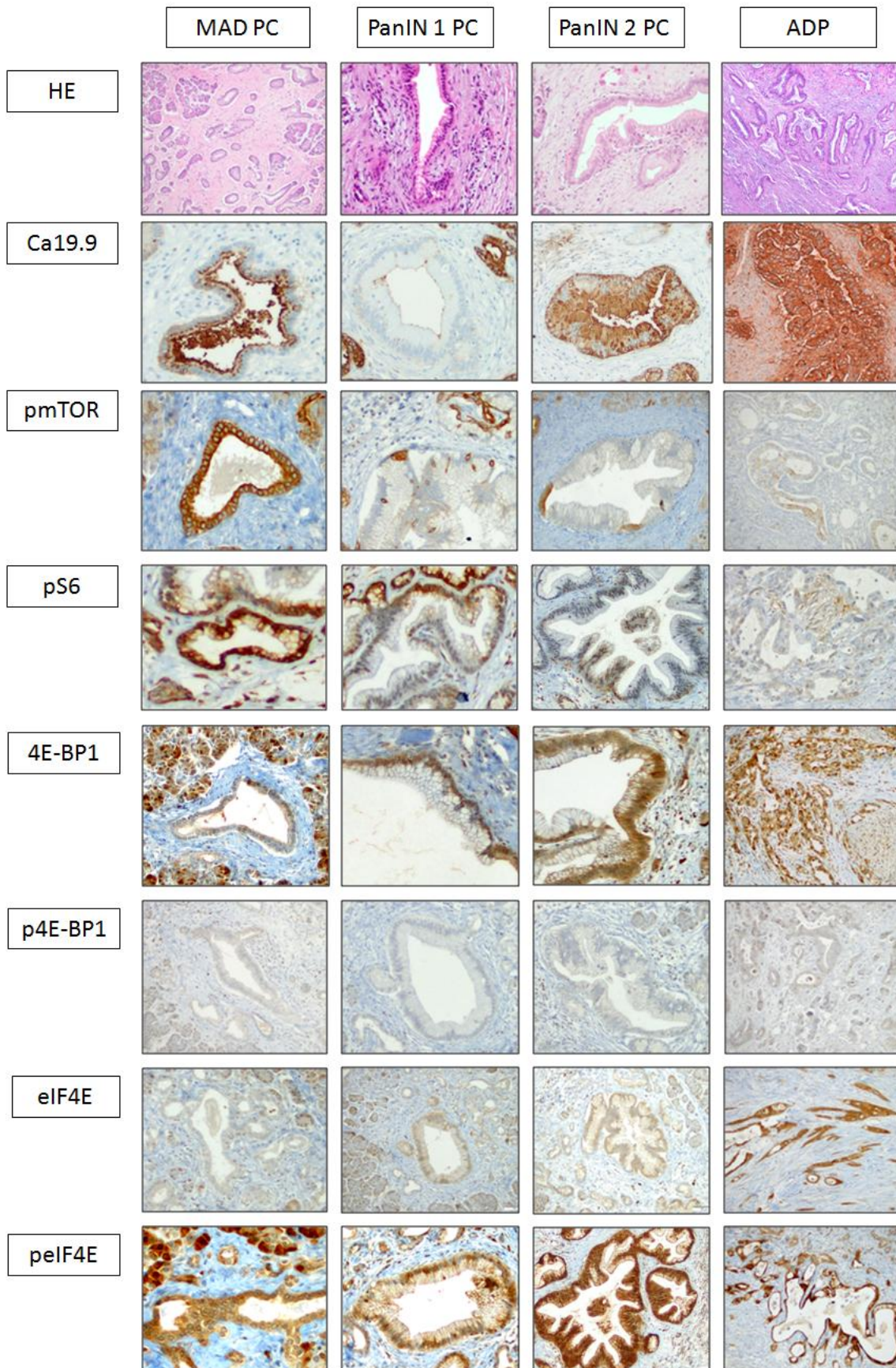
En nuestra serie se observa un aumento gradual en la expresión de la gran mayoría de proteínas estudiadas a medida que las lesiones progresan a ADP. En el caso de las proteínas eIF4E n, pmTOR c, pS6 c y YAP1 c se observa una disminución de la expresión de las mismas, tal y como refleja la siguiente tabla.

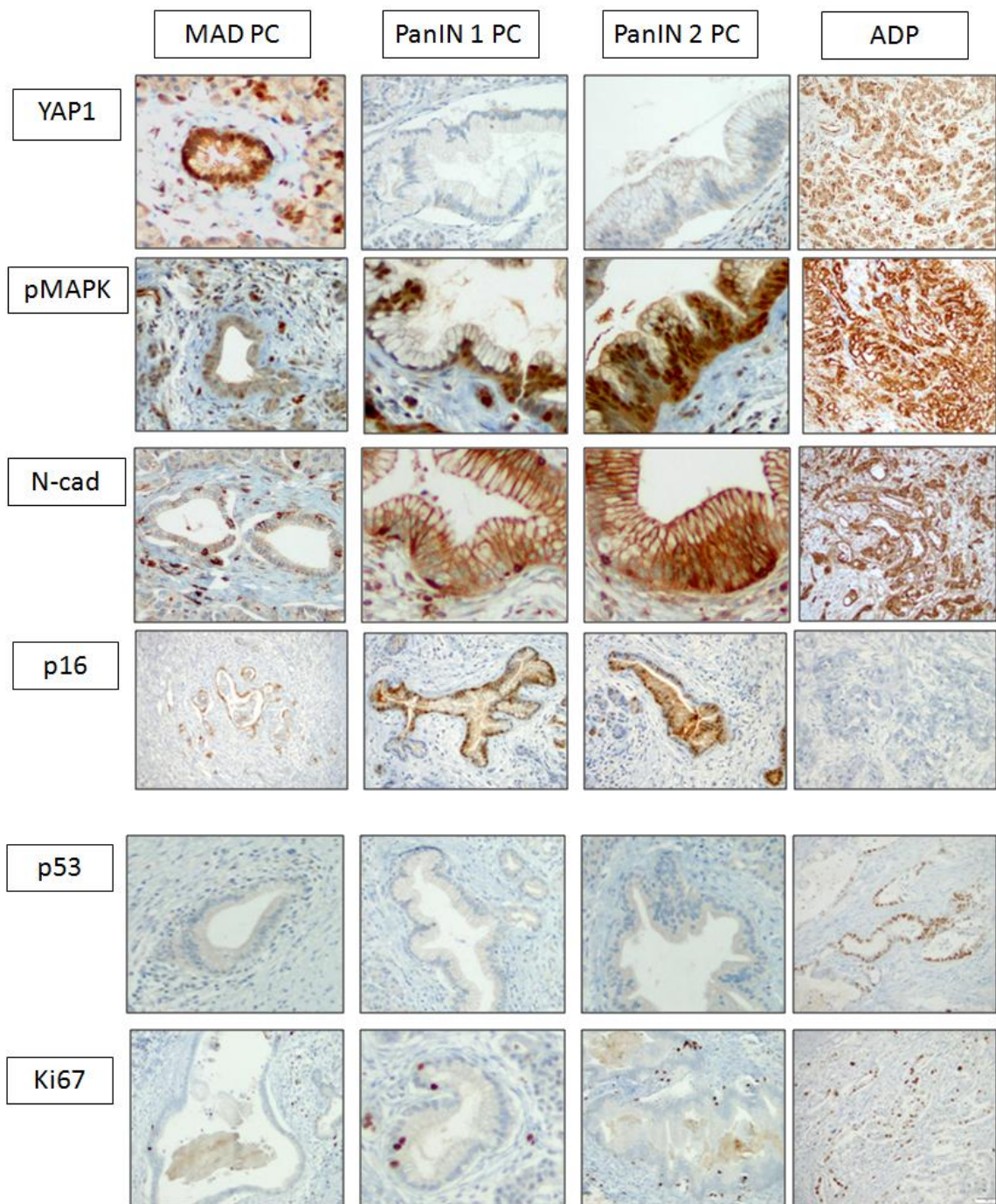
Tabla 18. Media de expresión de las proteínas estudiadas.

Marcador	Ducto PC	PanIN1 PC	PanIN2 PC	ADP
4E-BP1 c	16'58	21'55	35'70	95'08
4E-BP1 n	8'75	25'65	34'70	66'64
p4E-BP1 c	0	0	0	15.56
p4E-BP1 n	0'36	0'62	0'83	10'71
eIF4E c	30'15	30'83	46'36	110'39
eIF4E n	22'46	25	34'55	13'83
peIF4E c	46'43	75'77	78'75	148'20
peIF4E n	23'93	40'38	38'46	69'77
pmTOR c	185'71	13'08	6'15	57'03
pmTOR n	0	0	0	0
pS6 c	114'29	4'17	2'50	36'16
pS6 n	0	0	0	0
pMAPK c	12'46	13'16	15'45	50'78
pMAPK n	19'15	17'73	24'65	70'86
p16 c	2'71	5'69	14'92	22'60
p16 n	2'71	5'69	14'92	26'10
p16 estr	5.71			12'65
ki67	1'23	2'36	10'10	66'54
p53	0	0	0	35'44
p53 estr	0.21			0.27
YAP1 c	92'86	0	0	72'85
YAP1 n	7'14	0	0	51'44
N-cadh c	114.29	115.38	133.33	151'41
N-cadh n	0	0	0	0
N-cadh estr	4.53			117'96

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; PC: pancreatitis crónica; ADP: adenocarcinoma ductal pancreático; PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática; N-cadh: N-Cadherina

Fig. 23. Fotografías microscópicas que muestran los cambios de expresión de proteínas en ducto/MAD de PC, PanIN asociados a PC y ADP





A la hora de comparar si los niveles de expresión de las diversas proteínas entre los ductos de los casos de pancreatitis crónica y el ADP muestran una variación importante, observamos que varios de ellos presentan una diferencia de expresión estadísticamente significativa, como refleja la siguiente tabla.

Tabla 19. Proteínas con diferencias significativas de expresión entre PC y ADP

Marcador	PC (N=15)		ADP (N=64)		p-valor Mann-Whitney
	Nº casos	Media	Nº casos	Media	
4E-BP1 c	12	16'58	64	95'08	0.000
4E-BP1 n	12	8.75	64	66.64	0.000
p4E-BP1 c	14	0.00	62	15.56	0.008
elF4E c	13	30.15	64	110.39	0.000
peIF4E c	14	46.43	64	148.20	0.000
peIF4E n	14	23.93	64	69.77	0.000
pMAPK c	13	12.46	64	50.78	0.018
pMAPK n	13	19.15	64	70.86	0.002
pS6 c	14	114.29	64	36.16	0.028
p16 c	14	2.71	63	22.60	0.010
YAP1 n	14	7.14	64	51.44	0.000
Ki67	13	1.23	61	66.54	0.000
p53	14	0.00	64	35.44	0.000
N-Cadh estr	15	4.53	64	117'96	0.000

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma

En todas las proteínas con p significativa se estudió un punto de corte basado en el área bajo la curva (AUC)/ROC área, y con una sensibilidad (S) y/o especificidad (E) altas. Este punto de corte podría ser útil a la hora de valorar biopsias pequeñas en las que, muchas veces, perdemos la referencia arquitectural y es difícil discernir entre una proliferación ductal reactiva/MAD versus si estamos ante un ADP bien diferenciado. Así mismo, sería útil a la hora de valorar la afectación del margen quirúrgico en piezas de resección en las que el ADP asienta sobre pancreatitis crónicas.

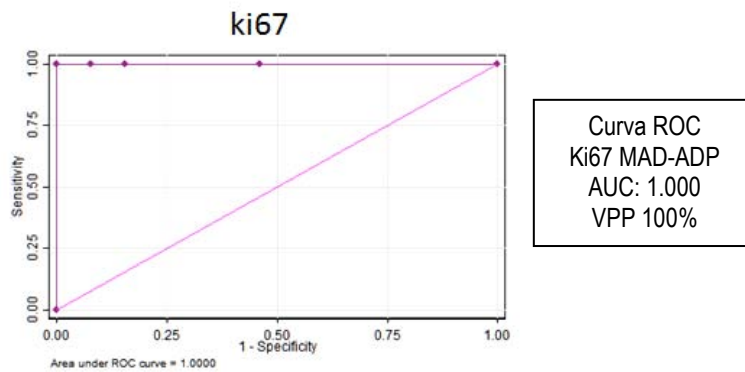
En siete de ellos se obtuvo un punto de corte con una sensibilidad (S) y/o especificidad (E) mayores de 75%, como resume la tabla 19. En el caso del marcador Ki67 observamos un VPP del 100% para un punto de corte \geq a 20%.

En el resto de proteínas con p significativa no se observó un área bajo la curva, S ó E significativas (p4E-BP1 c con AUC de 0'618, pMAPK c con AUC de 0'701, pMAPK n con AUC de 0'769, pS6 con AUC de 0'314 y p16 c con AUC de 0'321). Cabe destacar la ausencia de expresión de p53 nuclear en PC vs su expresión en ADP ($p=0'000$), con una sensibilidad del 100% en ambas, pero con una especificidad del 0% y AUC de 0'203.

Tabla 20. Resumen Curvas ROC.

Marcador	Nº Casos	ROC (AUC)	Área	Mejor punto de corte	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %
4E-BP1 c	76	0.8958		15.00	92.19%	75%	0.90
4E-BP1 n	76	0.9258		35.00	75.00%	100%	1.00
eIF4E c	77	0.8233		60.00	73.44%	84.62%	0.92
peIF4E c	78	0.8655		110.00	71.88%	92.86%	0.96
peIF4E n	78	0.8064		40.00	76.56%	71.43%	0.87
Ki67	74	1.0000		20	100.00%	100.00%	1.00
YAP1 n	78	0.8460		2	82.81%	85.61%	0.93

c: citoplasma; n: núcleo



A) Ki67 MAD

B) Ki67 ADP

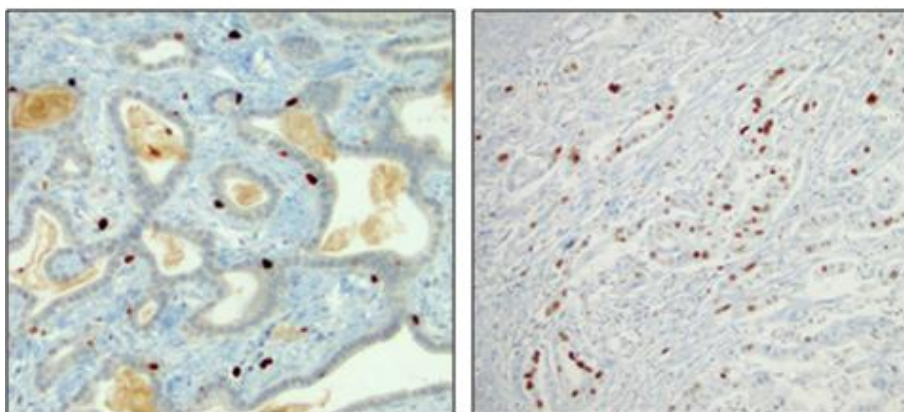


Fig. 24. Expresión de Ki67 en A) un caso de PC con MAD (expresión glandular negativa, expresión nuclear en linfocitos del estroma) comparado con la expresión glandular de Ki67 en B) un caso de ADP bien diferenciado

2.2. “ADP PRIMARIO” vs “ADP SECUNDARIO”:

Basándonos en las descripciones de modelos de progresión de varios grupos de investigación que demuestran, en modelos animales, que la PC es un componente esencial para el desarrollo de ADP, ya que aceleraba el desarrollo de PanIN (Guerra et al., 2007, 2011; Kopp et al., 2012), definimos dos grupos en nuestra serie en función o no de presentar asociación con PC y PanIN de alto grado, para estudiar si existen diferencias entre ellos en cuanto a expresión de proteínas, parámetros clínico-patológicos, mutación de KRAS y supervivencias. Definimos como:

- “ADP primarios” aquellos casos no asociados a PC de base + casos asociado a PanIN 1, sin evidencia de PC ni PanIN de alto grado (PanIN 2 y/o 3).
- “ADP secundarios” aquellos casos en los que se observa PC de base y/o PanIN de alto grado asociados a la neoplasia.

En nuestra serie observamos 61 casos (95'31%) de “ADP secundario” y 3 casos (4'68%) de “ADP primario”.

No observamos diferencias significativas entre los dos grupos en la expresión de las proteínas (tabla 20) ni en relación a parámetros clínico-patológicos. Así mismo, no observamos diferencias significativas en cuanto a asociación con mutación de KRAS entre ambos grupos ($p= 0.534$).

Tabla 21. Comparación de la media de expresión de las diversas proteínas estudiadas en “ADP secundario” vs “ADP primario”

N Media (sd)	ADP		Total	Valor p Mann-Whitney
	Secundario	Primario		
4E-BP1 c	61 93.44 (61.80)	3 128.33 (89.49)	64 95.08 (62.83)	0.417
4E-BP1 n	61 66.39 (47.69)	3 71.67 (43.11)	64 66.64 (47.18)	0.702
p4E-BP1 c	53 44.58 (47.38)	1 5.00 (.)	54 43.85 (47.24)	0.301
p4E-BP1-n	53 33.32 (42.59)	1 0.00 (.)	54 32.70 (42.43)	0.215
eIF4E c	61 107.62 (72.20)	3 166.67 (57.74)	64 110.39 (72.31)	0.166
eIF4E n	61 14.18 (22.92)	3 6.67 (11.55)	64 13.83 (22.52)	0.739
peIF4E c	61 146.31 (74.01)	3 186.67 (68.07)	64 148.20 (73.74)	0.348
peIF4E n	61 69.26 (49.77)	3 80.00 (10.00)	64 69.77 (48.66)	0.426
PmTOR c	61	3	64	0.577

	58.36 (62.81)	30.00 (26.46)	57.03 (61.78)	
PmTOR n	61 0.00 (0.00)	3 0.00 (0.00)	64 0.00 (0.00)	.
pMAPK c	61 50.98 (70.28)	3 46.67 (80.83)	64 50.78 (70.09)	0.536
pMAPK n	61 70.74 (77.38)	3 73.33 (110.15)	64 70.86 (78.02)	0.786
pS6 c	61 36.21 (39.88)	3 35.00 (40.93)	64 36.16 (39.60)	0.949
pS6 n	61 0.00 (0.00)	3 0.00 (0.00)	64 0.00 (0.00)	.
p16 c	60 19.73 (52.28)	3 80.00 (138.56)	63 22.60 (58.20)	0.451
p16 n	60 23.40 (62.35)	3 80.00 (138.56)	63 26.10 (66.83)	0.620
p16 estr	60 11.92 (19.19)	3 27.33 (45.62)	63 12.65 (20.70)	0.948
Ki67 %	58 66.88 (19.13)	3 60.00 (22.91)	61 66.54 (19.17)	0.593
YAP1 c	61 71.23 (56.87)	3 106.67 (90.18)	64 72.89 (58.27)	0.432
YAP1 n	61 53.07 (53.81)	3 18.33 (12.58)	64 51.44 (53.08)	0.425
N-cadh c	61 149.02 (68.55)	3 200.00 (132.29)	64 151.41 (71.76)	0.353
N-cadh estr	61 113.93 (93.67)	3 200.00 (173.21)	64 117.97 (98.21)	0.374
P53	61 37.07 (38.71)	3 2.33 (2.52)	64 35.44 (38.50)	0.392
p53 estr	61 0.28 (1.36)	3 0.00 (0.00)	64 0.27 (1.32)	0.609
Ca19.9 suero	58 383.60 (542.86)	3 57.77 (81.56)	61 367.57 (534.07)	0.142

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; N-cadh: N-Cadherina

Tabla 22. Expresión de N-cadherina de membrana en “ADP secundario” vs “ADP primario”

N (% columna)	ADP		Total	Valor p Prueba exacta de Fisher
	Secundario	Primario		
N-cadherina mb				
0	30 (49.18%)	3 (100%)	33(51.56%)	0.445
1+	13 (21.31%)	0 (0%)	13(20.31%)	
2+	17 (27.87%)	0 (0%)	17(26.56%)	
3+	1 (1.64%)	0 (0%)	1(1.56%)	
Total	61(95.31%)	3(4.69%)	64 (100%)	

En cuanto a supervivencias, los “ADP primarios” muestran una supervivencia global ligeramente menor en comparación con los “ADP secundarios”, sin tener significación estadística ($p=0.690$) (Tabla 21). La supervivencia libre de recurrencia es prácticamente la misma en ambos grupos ($p=0.868$) (Tabla 22).

Tabla 23. Comparación de la supervivencia global entre “ADP primarios” vs “ADP secundarios”

ADP	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
Secundarios	61	51	2.76 (2.05; 3.62)	1850.23	30.33	8.00	14.67	43.13	0.6909
Primarios	3	2	1.99 (0.24; 7.17)	100.73	33.58	2.03	13.60	.	

Tabla 24. Comparación supervivencia libre de progresión entre “ADP primarios” vs “ADP secundarios”

ADP	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
Secundarios	61	61	3.30 (2.52; 4.23)	1850.23	30.33	6.63	13.40	42.23	0.868
Primarios	3	3	2.98 (0.61; 8.70)	100.73	33.58	2.03	13.60	85.10	

4.3. ESTUDIO DE MUTACIÓN DE KRAS

Se estudió si había diferencias significativas entre los pacientes con KRAS wild type y los pacientes con KRAS mutado, en relación a la expresión de proteínas y parámetros clínico-patológicos.

4.3.1. RELACIÓN ENTRE ESTADO MUTACIONAL Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS:

En nuestra serie observamos un aumento de la expresión citoplásmica y nuclear de pMAPK en ADP en pacientes con KRAS mutado en comparación con aquellos Wild Type, con una asociación estadísticamente significativa ($p=0.0006$ y $p=0.004$ respectivamente). Con el resto de proteínas no se observó diferencia significativa de su expresión entre ambos grupos (Ver tabla 23).

Tabla 25. Media de expresión de las proteínas estudiadas en relación a presencia o no de mutación de KRAS

N Media (sd) [Min; Max] Median p25;p75]	MUTACIÓN KRAS		Total	P*
	NO	SI		
4E-BP1 c	7 97.14 (66.51) [40.00 ; 200.00] 60.00 [50.00 ; 180.00]	57 94.82 (62.98) [0.00 ; 270.00] 90.00 [40.00 ; 140.00]	64 95.08 (62.83) [0.00 ; 270.00] 85.00 [45.00 ; 140.00]	0.927**
4E-BP1 n	7 52.86 (26.44) [30.00 ; 100.00] 40.00 [35.00 ; 80.00]	57 68.33 (49.02) [0.00 ; 260.00] 60.00 [30.00 ; 100.00]	64 66.64 (47.18) [0.00 ; 260.00] 60.00 [32.50 ; 97.50]	0.394*
p4E-BP1 c	6 56.17 (44.72) [2.00 ; 100.00] 65.00 [5.00 ; 100.00]	48 42.31 (47.77) [0.00 ; 200.00] 20.00 [10.00 ; 80.00]	54 43.85 (47.24) [0.00 ; 200.00] 20.00 [10.00 ; 80.00]	0.497*
p4E-BP1 n	6 28.67 (31.54) [0.00 ; 80.00] 20.00 [2.00 ; 50.00]	48 33.21 (43.84) [0.00 ; 160.00] 10.00 [0.00 ; 50.00]	54 32.70 (42.43) [0.00 ; 160.00] 10.00 [0.00 ; 50.00]	0.845*
eIF4E -c	7 117.86 (80.62) [0.00 ; 200.00] 130.00 [45.00 ; 200.00]	57 109.47 (71.96) [0.00 ; 260.00] 100.00 [45.00 ; 175.00]	64 110.39 (72.31) [0.00 ; 260.00] 105.00 [45.00 ; 180.00]	0.796*
eIF4E n	7 8.57 (18.42) [0.00 ; 50.00] 0.00 [0.00 ; 5.00]	57 14.47 (23.02) [0.00 ; 80.00] 0.00 [0.00 ; 30.00]	64 13.83 (22.52) [0.00 ; 80.00] 0.00 [0.00 ; 25.00]	0.980*
peIF4E c	7 112.14 (86.98) [30.00 ; 240.00] 80.00 [30.00 ; 225.00]	57 152.63 (71.58) [0.00 ; 285.00] 150.00 [110.00 ; 200.00]	64 148.20 (73.74) [0.00 ; 285.00] 150.00 [100.00 ; 200.00]	0.172**
peIF4E n	7 42.14 (42.22)	57 73.16 (48.64)	64 69.77 (48.66)	0.099*

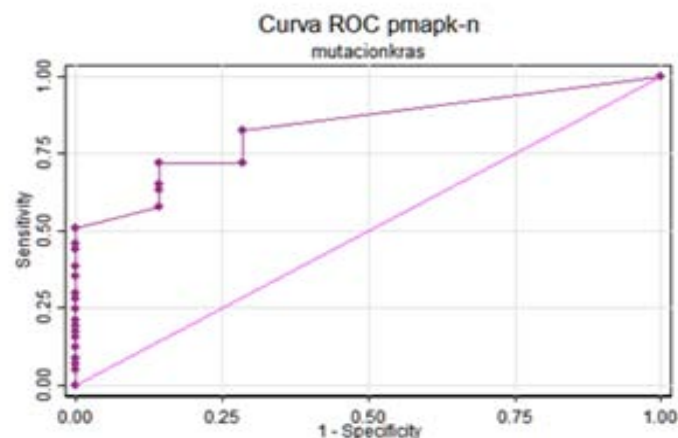
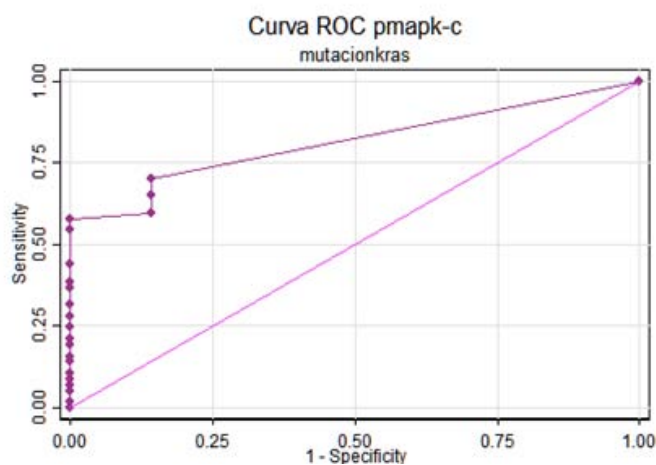
	[0.00 ; 110.00] 30.00 [5.00 ; 90.00]	[0.00 ; 200.00] 60.00 [40.00 ; 100.00]	[0.00 ; 200.00] 60.00 [40.00 ; 95.00]	
pmTOR c	7 70.71 (93.02) [5.00 ; 270.00] 20.00 [20.00 ; 80.00]	57 55.35 (57.79) [0.00 ; 220.00] 40.00 [10.00 ; 90.00]	64 57.03 (61.78) [0.00 ; 270.00] 37.50 [12.50 ; 85.00]	0.804*
pMAPK c	7 2.14 (5.67) [0.00 ; 15.00] 0.00 [0.00 ; 0.00]	57 56.75 (72.05) [0.00 ; 250.00] 30.00 [0.00 ; 80.00]	64 50.78 (70.09) [0.00 ; 250.00] 20.00 [0.00 ; 70.00]	0.006*
pMAPK n	7 7.86 (15.24) [0.00 ; 40.00] 0.00 [0.00 ; 15.00]	57 78.60 (79.16) [0.00 ; 250.00] 50.00 [10.00 ; 120.00]	64 70.86 (78.02) [0.00 ; 250.00] 40.00 [10.00 ; 115.00]	0.004*
pS6 c	7 23.57 (33.00) [0.00 ; 85.00] 0.00 [0.00 ; 40.00]	57 37.70 (40.31) [0.00 ; 160.00] 30.00 [0.00 ; 60.00]	64 36.16 (39.60) [0.00 ; 160.00] 27.50 [0.00 ; 60.00]	0.261*
p16 c	7 34.29 (90.71) [0.00 ; 240.00] 0.00 [0.00 ; 0.00]	56 21.14 (53.86) [0.00 ; 200.00] 0.00 [0.00 ; 0.00]	63 22.60 (58.20) [0.00 ; 240.00] 0.00 [0.00 ; 0.00]	0.741*
p16 n	7 34.29 (90.71) [0.00 ; 240.00] 0.00 [0.00 ; 0.00]	56 25.07 (64.25) [0.00 ; 300.00] 0.00 [0.00 ; 10.00]	63 26.10 (66.83) [0.00 ; 300.00] 0.00 [0.00 ; 10.00]	0.538*
Ki67 %	7 66.14 (21.43) [35.00 ; 95.00] 65.00 [48.00 ; 90.00]	54 66.59 (19.08) [20.00 ; 95.00] 70.00 [55.00 ; 83.00]	61 66.54 (19.17) [20.00 ; 95.00] 70.00 [55.00 ; 83.00]	0.954**
YAP1 c	7 62.86 (67.75) [0.00 ; 200.00] 40.00 [20.00 ; 100.00]	57 74.12 (57.56) [0.00 ; 300.00] 80.00 [30.00 ; 100.00]	64 72.89 (58.27) [0.00 ; 300.00] 60.00 [30.00 ; 100.00]	0.379*
YAP1 n	7 55.00 (53.93) [5.00 ; 160.00] 50.00 [10.00 ; 80.00]	57 51.00 (53.44) [0.00 ; 200.00] 30.00 [5.00 ; 80.00]	64 51.44 (53.08) [0.00 ; 200.00] 30.00 [5.00 ; 80.00]	0.650*
N-cadh c	7 152.86 (85.97) [20.00 ; 250.00] 200.00 [50.00 ; 200.00]	57 151.23 (70.71) [20.00 ; 300.00] 150.00 [100.00 ; 200.00]	64 151.41 (71.76) [20.00 ; 300.00] 150.00 [100.00 ; 200.00]	0.955**
N-cadh estr	7 100.00 (81.65) [0.00 ; 200.00] 100.00 [0.00 ; 200.00]	57 120.18 (100.45) [0.00 ; 300.00] 100.00 [40.00 ; 200.00]	64 117.97 (98.21) [0.00 ; 300.00] 100.00 [40.00 ; 200.00]	0.742*
p53	7 35.29 (30.86) [0.00 ; 60.00] 60.00 [2.00 ; 60.00]	57 35.46 (39.56) [0.00 ; 100.00] 15.00 [0.00 ; 75.00]	64 35.44 (38.50) [0.00 ; 100.00] 15.00 [0.00 ; 75.00]	0.789 *
Ca19.9 suero	7 318.91 (425.03)	54 373.88 (549.64)	61 367.57 (534.07)	0.874*

	[13.30 ; 1218.00] 136.00 [68.20 ; 480.10]	[0.60 ; 1922.00] 156.70 [21.10 ; 395.00]	[0.60 ; 1922.00] 151.90 [23.80 ; 395.00]	
--	--	--	--	--

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; N-cadh: N-cadherina;* Mann-Whitney. ** T-Test

En relación a la pMAPK se buscó un punto de corte que nos pudiera predecir la presencia de mutación de KRAS. Para ello se realizó un estudio de la Curva de ROC, que establece un área bajo la curva, con una sensibilidad y especificidad significativas, proponiendo el mejor punto de corte. Observamos, en el caso de pMAPK c, que dicho punto de corte se establece en una expresión ≥ 5 , con una sensibilidad de 70% y una especificidad del 85.71%, y con un área bajo la curva de 0.8133; en el caso de pMAPK n, se establece el mejor punto de corte en una expresión ≥ 20 , con una sensibilidad de 71.93% y una especificidad del 85.71%, y con un área bajo la curva de 0.8321. Ambos marcadores presentaron un VPP del 92%, sin ser un parámetro pronóstico independiente ($p=0.6672$ y $p=0.5.992$ para pMAPK c o n respectivamente).

Marcador	Nº Casos	ROC (AUC)	Área	Mejor punto de corte	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %
pMAPK c	76	0.8133		5.00	70.18%	85.71%	0.92
pMAPK n	76	0.8321		20.00	71.93%	85.71%	0.92



4.3.1.1. RELACIÓN ENTRE TIPO DE MUTACIONES Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS:

Observamos que existe relación entre los tipos de mutación de KRAS más frecuentes en nuestra serie y el nivel de expresión de pMAPK c y n y pElF4E n en ADP, con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de mutaciones versus el Wild type en el caso de pMAPK (ver resumen en tabla 24)

Tabla 26. Media de expresión de las proteínas estudiadas según tipo de mutación con p significativa

N Media (sd) [IC 95%] Median [p25;p75]	TIPO MUTACION KRAS				Total	p-valor Kruskal- Wallis	Test Scheffe*
	G12D	G12R	G12V	WT KRAS			
pMAPK c	33 31.06 (43.30) [0.00 ; 170.00] 10.00 [0.00 ; 40.00]	7 95.00 (78.16) [0.00 ; 220.00] 80.00 [30.00 ; 150.00]	13 79.23 (84.03) [0.00 ; 230.00] 50.00 [5.00 ; 160.00]	7 2.14 (5.67) [0.00 ; 15.00] 0.00 [0.00 ; 0.00]	61 66.54 (19.17) [61.63 ; 71.45] 70.00 [55.00 ; 83.00]	0.039	G12R vs WT KRAS 3.0508 G12V vs WT KRAS 2.8878
pMAPK n	33 51.36 (58.62) [0.00 ; 220.00] 30.00 [10.00 ; 80.00]	7 124.29 (92.17) [20.00 ; 250.00] 110.00 [40.00 ; 200.00]	13 101.54 (86.01) [0.00 ; 250.00] 100.00 [10.00 ; 170.00]	7 7.86 (15.24) [0.00 ; 40.00] 0.00 [0.00 ; 15.00]	60 65.67 (73.88) [0.00 ; 250.00] 40.00 [5.00 ; 105.00]	0.003	G12R vs WT KRAS 3.2529 G12V vs WT KRAS 2.9842
pElF4E n	33 57.88 (39.05) [0.00 ; 180.00] 55.00 [30.00 ; 80.00]	7 75.71 (22.25) [50.00 ; 110.00] 70.00 [60.00 ; 100.00]	13 100.00 (61.37) [10.00 ; 200.00] 80.00 [60.00 ; 150.00]	7 42.14 (42.22) [0.00 ; 110.00] 30.00 [5.00 ; 90.00]	60 67.25 (46.84) [0.00 ; 200.00] 60.00 [35.00 ; 90.00]	0.056	G12D vs G12V 2.9336

*Valor crítico para el test Scheffe (.05, 3, 56) = 2.8824

4.3.2. RELACIÓN ENTRE ESTADO MUTACIONAL Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

A la hora de estudiar las posibles asociaciones entre parámetros clínico-patológicos y la presencia o no de mutación en KRAS, encontramos que los casos con KRAS mutado presentan menos afectación del margen quirúrgico por la neoplasia que los pacientes Wild Type, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.037$) (Tabla 25).

Con el resto de asociaciones no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Tabla.27 Asociación entre presencia de mutación de KRAS y R1

Parámetro clínico-patológico	MUTACIÓN KRAS		Valor p Chi-cuadrado
	NO (N=7)	SI (N=57)	
R1 (sí)	4 (57.14%)	12 (21.05%)	0.037

A la hora de estudiar la asociación de los parámetros clínico-patológicos con los tres tipos de mutaciones más frecuentes en nuestra serie (GD, GR, GV) encontramos que existe una relación significativa entre el tipo de mutación y la invasión perineural ($p=0.019$). Los casos con mutación GD (81.82%) y GV (92.31%) presentan mayor invasión perineural que la mutación GR. (Tabla 26).

Tabla 28. Asociación entre tipos de mutación de KRAS e invasión perineural

N (% columna)	TIPO MUTACION KRAS			Total	p-value Prueba exacta de Fisher
	G12D	G12R	G12V		
INVASIÓN PERINEURAL					
No	6 (18.18%)	4 (57.14%)	1 (7.69%)	11(20.75%)	0.048
Si	27 (81.82%)	3 (42.86%)	12 (92.31%)	42(79.25%)	
Total	33(62.26%)	7(13.21%)	13(24.53%)	53 (100%)	

4.4. ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

4.4.1. RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN ADP

4.4.1.1. GRADO HISTOLÓGICO:

En nuestra serie observamos que, a medida que aumenta el grado de diferenciación tumoral también lo hace el índice de proliferación celular/Ki67, con una diferencia estadísticamente significativa entre el grado 2 y 3 (Test de Scheffe: 2.5932. Valor crítico para el test Scheffe (.05, 2, 58) = 2.5123). Asimismo observamos una disminución de la expresión de p4E-BP1 citoplasmático a medida que aumenta el grado de diferenciación tumoral ($p= 0.043$), con una diferencia estadísticamente significativa entre el grado 2 y 3 ($p=0.015$).

Tabla 29. Asociaciones entre marcadores IHQ y grado histológico

N Media (sd) [IC 95%] Median [p25;p75]	GRADO HISTOLÓGICO			Total	p-valor Kruskal- Wallis	Test Scheffe 2 vs 3
	1	2	3			
Ki67 %	4 59.50 (28.30) [14.47 ; 104.53] 59.00 [35.00 ; 84.00]	45 63.78 (19.11) [58.04 ; 69.52] 65.00 [50.00 ; 80.00]	12 79.25 (9.98) [72.91 ; 85.59] 80.00 [74.00 ; 85.00]	61 66.54 (19.17) [61.63 ; 71.45] 70.00 [55.00 ; 83.00]	0.039	2.5933
p4E-BP1 c	3 50.00 (45.83) [-63.84;163.84] 40.00 [10.00 ; 100.00]	40 48.98 (49.39) [33.18 ; 64.77] 30.00 [10.00 ; 85.00]	11 23.55 (36.39) [-0.90 ; 47.99] 4.00 [0.00 ; 50.00]	54 43.85 (47.24) [30.96 ; 56.75] 20.00 [10.00 ; 80.00]	0.043	2.8854

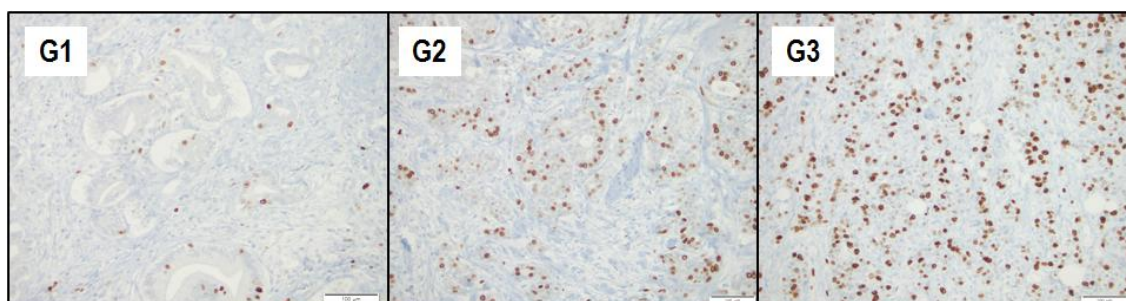


Figura 25. Expresión IHQ de Ki67 en los diferentes grados de diferenciación neoplásica

4.4.1.2 PANCREATITIS DE BASE:

En nuestra serie existe un aumento significativo entre la expresión de 4E-BP1 n y pMAPK c y n en aquellos casos de ADP que asientan sobre un páncreas con pancreatitis crónica de base, en comparación con aquellos no asociados a la misma.

Tabla 30. Asociaciones entre marcadores IHQ y pancreatitis de base

N Media (sd) [IC 95%] Median [p25;p75]	PANCREATITIS DE BASE		Total	p-valor Mann-Whitney
	NO	SI		
4E-BP1 n	23 48.70 (33.17) [34.35 ; 63.04] 50.00 [20.00 ; 70.00]	41 76.71 (51.11) [60.58 ; 92.84] 70.00 [40.00 ; 100.00]	64 66.64 (47.18) [54.85 ; 78.43] 60.00 [32.50 ; 97.50]	0.021
pMAPK c	23 29.13 (52.99) [6.21 ; 52.05] 0.00 [0.00 ; 50.00]	41 62.93 (75.98) [38.95 ; 86.91] 30.00 [5.00 ; 80.00]	64 50.78 (70.09) [33.27 ; 68.29] 20.00 [0.00 ; 70.00]	0.005
pMAPK n	23 45.00 (68.04) [15.58 ; 74.42] 10.00 [0.00 ; 100.00]	41 85.37 (80.26) [60.03 ; 110.70] 50.00 [25.00 ; 120.00]	64 70.86 (78.02) [51.37 ; 90.35] 40.00 [10.00 ; 115.00]	0.009

4.4.1.3. RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y PARÁMETROS PRONÓSTICO:

Los casos de ADP con **metástasis hepáticas metacrónicas** muestran niveles más elevados de YAP nuclear que aquellos casos en los que no progresan de esa forma, con una diferencia estadísticamente significativa (p=0.028).

Tabla 31. Asociaciones entre YAP1 y la progresión a metástasis hepáticas

N Media (sd) [IC 95%] Median [p25;p75]	METÁSTASIS HEPÁTICA		Total	p-valor Mann-Whitney
	NO	SI		
YAP1 n	21 28.81 (33.57) [13.53 ; 44.09] 10.00 [0.00 ; 50.00]	20 63.25 (55.38) [37.33 ; 89.17] 60.00 [10.00 ; 100.00]	41 45.61 (48.21) [30.39 ; 60.83] 30.00 [5.00 ; 80.00]	0.028

A la hora de buscar un punto de corte que nos prediga la progresión a metástasis hepáticas, se realiza un estudio de la Curva de ROC, que establece un área bajo la curva, proponiendo el mejor punto de corte, con una sensibilidad y especificidad significativas. Observamos, en el caso de YAP n, que dicho punto de corte se establece en una expresión mayor o igual a 60, con una sensibilidad de 55% y una especificidad del 80'95%, y con un área bajo la curva de 0'6988. El VPP es del 88%, sin ser un parámetro pronóstico independiente ($p=0.1968$).

Marcador	Nº Casos	ROC (AUC)	Área	Mejor punto de corte	Sensibilidad %	Especificidad %	VPP %
YAP1 n	41	0.6988		60.00	55.00%	80.95%	0.88

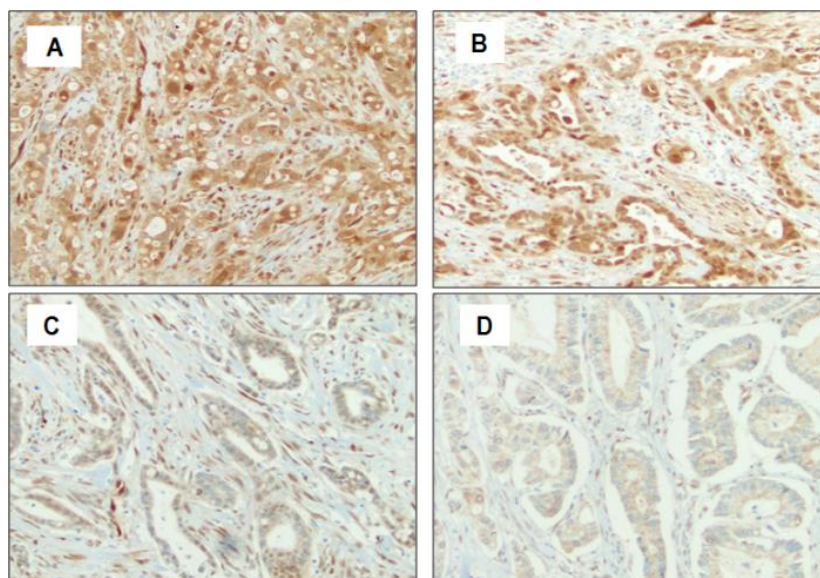
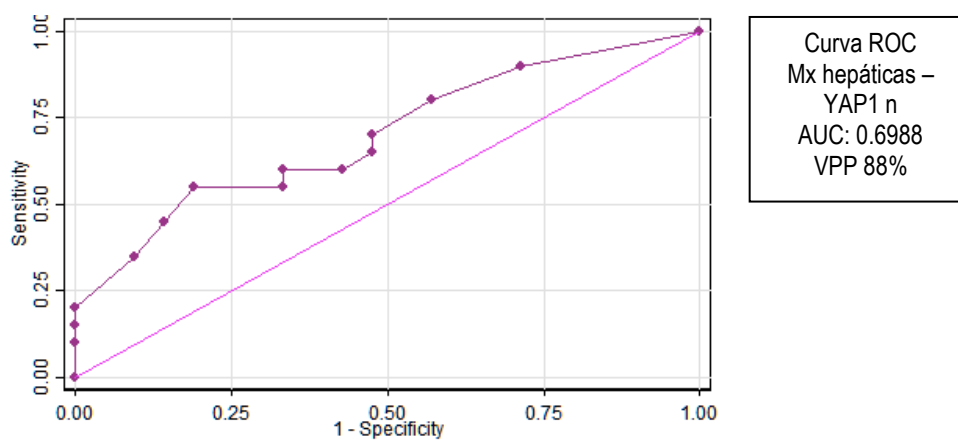


Fig. 26. Ejemplos de la expresión IHQ de YAP1 en casos de ADP de la serie: A y B casos progresión a hígado; C y D casos con progresión no hepática

Asimismo, en nuestra serie observamos relación significativa entre los niveles de expresión de diversas proteínas con **invasión linfática y perineural** (Tabla 30).

Tabla 32. Asociaciones entre marcadores IHQ y invasión linfática y perineural

Parámetro Marcador	Nº casos Media	Nº casos Media	p-valor Mann- Whitney
Invasión linfática	SI	NO	
p4ebp1-n	36 3.06	27 20.93	0.003
Invasión perineural	SI	NO	
peif4E-c	49 137.76	15 182.33	0.039

Con el resto de parámetros pronóstico, como son **estadio tumoral, invasión vascular y R1**, en nuestra serie no se observa relación significativa entre la expresión de las diferentes proteínas en ADP.

4.4.1.4. OTROS PARÁMETROS:

En nuestra serie no se observa relación significativa entre la expresión de las diferentes proteínas en ADP y los diferentes grados de **desmoplasia asociada al tumor o inflamación asociada al tumor**.

4.4.1.5. PROGRESIÓN:

En nuestra serie los pacientes que progresan presentan o igual o un leve aumento de la expresión de la mayoría de las proteínas estudiadas en comparación con los pacientes que no progresan, a excepción de la proteína p16, en la que observamos una disminución de su expresión tanto citoplásmica como nuclear. En ningún caso se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, como se refleja en la siguiente tabla.

Tabla 33. Resumen de la expresión de las proteínas estudiadas en relación a progresión

Marcador IHQ N Media (sd)	PROGRESIÓN		Valor p Mann-Whitney
	NO	SI	
4E-BP1 c	19 86.32 (67.57)	44 94.89 (55.91)	0.602 **
4E-BP1 n	19 63.16 (48.85)	44 63.75 (37.14)	0.958**
p4E-BP1 c	18 12.78 (21.09)	43 15.93 (26.42)	0.775 *
p4E-BP1 n	19 10.00 (12.36)	43 9.19 (19.58)	0.113 *
eIF4E c	19 93.16 (71.24)	44 116.25 (72.51)	0.227*
eIF4E n	19 10.79 (18.58)	44 13.86 (22.82)	0.685*
peIF4E c	19 145.00 (81.63)	44 147.27 (70.22)	0.911 **
peIF4E n	19 67.37 (51.76)	44 70.11 (48.21)	0.741*
pmtor c	19 43.68 (41.83)	44 62.73 (68.90)	0.609*
pMAPK c	19 34.47 (45.49)	44 58.30 (78.40)]	0.466*
pMAPK n	19 55.79 (57.67)	44 78.07 (85.74)	0.390*
pS6 c	19 28.53 (32.87)	44 39.59 (42.50)	0.461*
p16 c	19 38.95 (80.13)	43 15.91 (45.49)	0.491 *
p16 n	19 55.79 (103.57)	43 13.58 (37.70)	0.171*
p16 estr	19 11.47 (22.86)	43 13.47 (20.08)	0.396*
ki67	19 66.32 (20.11)	41 66.80 (19.18)	0.924*
p53	19 34.63 (36.81)	44 36.59 (39.66)	0.745*
p53 estr	19 0.00 (0.00)	44 0.39 (1.59)	0.129*
YAP1 c	19 71.84 (65.35)	44 72.73 (56.30)	0.587*
YAP1 n	19 50.11 (51.61)	44 48.64 (49.90)	0.922*
N-cadh c	19 152.63 (71.17)	44 151.36 (73.57)	0.950**
N-cadh estr	19 132.11 (106.02)	44 112.27 (96.42)	0.626*

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; N-cadh: N-Cadherina; *Mann-Withney, ** T-test

4.4.2. ASOCIACIONES DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS ENTRE SÍ EN ADP

Estudiamos las asociaciones que pudiera haber entre los diferentes parámetros clínico-patológicos valorados. En cada apartado se adjunta una tabla resumen de los resultados estadísticamente significativos y aquellos considerados relevantes en el estudio, aun sin ser significativos.

El recordatorio de todos los parámetros clínico-patológicos estudiados se resume en la siguiente tabla

Tabla 11bis. Parámetros clínico-patológicos estudiados
Sexo
Edad
Ca19.9 suero
Localización tumoral
Tamaño tumoral
Grado histológico
Asociación con Pan-IN
Pancreatitis de base
Desmoplasia asociada al tumor
Inflamación asociada al tumor
Estadio tumoral
Parámetros con valor pronostico ⁽¹⁾:
Margen quirúrgico afecto (R1)
Estadios avanzados
Invasión vascular
Invasión linfática
Invasión perineural
Metástasis hepáticas
Progresión y localización de la progresión

⁽¹⁾ Pancreatic Cancer. Haiyong Han & Daniel D Von Hoff, Cancer Cell 23, 2013

4.4.2.1. LOCALIZACIÓN TUMORAL

En nuestra serie, los ADP localizados en cuerpo de páncreas se presentan proporcionalmente en estadios más avanzados que los localizados en cabeza y cola, y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.010$). Asimismo, los tumores localizados en cuerpo pancreático tienden a presentar niveles menores de Ca19.9 en suero que los localizados en cabeza y cola, sin llegar a tener significación estadística ($p=0.062$). Observamos que los niveles de Ca19.9 en suero no se correlacionan con la expresión histológica de la neoplasia. El resto de asociaciones entre parámetros clínico-patológicos y localización tumoral no muestra significación estadística.

Tabla 34. Asociaciones relevantes entre localización tumoral y parámetros clínico-patológicos

Parámetro clínico-patológico	LOCALIZACIÓN			Valor p
	Cabeza (N=54)	Cuerpo (N=4)	Cola (N=6)	
Estadio				
IA	6 (11.11%)	0 (0%)	0 (0%)	0.010*
IB	1 (1.85%)	1 (16.67%)	0 (0%)	
IIA	14 (25.93%)	0 (0%)	0 (0%)	
IIB	30 (55.56%)	2 (33.33%)	4 (100%)	
III	1 (1.85%)	2 (33.33%)	0 (0%)	
IV	2 (3.7%)	1 (16.67%)	0 (0%)	
Ca19.9 suero	405.80	55.06	349.00	0.062 ***
Ca19.9 histología	150.28	142.50	122.50	0.633 ***

*Chi-cuadrado; *** Kruskal-Wallis

4.4.2.2. TAMAÑO TUMORAL:

Teniendo en cuenta que el TNM coge como punto de corte los 2 cm para el estadiaje, a la hora de estudiar las posibles asociaciones entre parámetros clínico-patológicos y tumor mayor o menor a 2cm, en nuestra serie observamos que los tumores de más de 2 cm presentan mayor grado de desmoplasia asociada que los menores de 2 cm, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.038$).

Asimismo, observamos que los tumores mayores a 2 cm tienden a presentarse en personas de mayor edad ($p=0.052$) y a asociarse a niveles más elevados de Ca19.9 en suero ($p=0.090$), pero sin llegar a tener significación estadística.

Tabla 35. Asociación entre tamaño tumoral (< o > de 2 cm) y parámetros clínico-patológicos

Parámetro clínico-patológico	TAMAÑO TUMORAL		Valor p
	< 2 cm (N=14)	> 2 cm (N=50)	
Edad	57.54	64.08	0.052 **
Desmoplasia			
0-1	5 (35.71%)	6 (12%)	0.038*
2-3	9 (64.29%)	44 (88%)	
Ca19.9 suero	111.88	443.64	0.090 ***
Ca19.9 histología	155.71	145.60	0.738 ***

*Chi-cuadrado, ** T-test, *** Mann-Withney

Algunos estudios demuestran que tumores mayores de 3 cm presentan peor pronóstico (Benassai G et al., 2000; Gebhardt C et al., 2000).

Si establecemos el punto de corte en los 3 cm, observamos que los tumores mayores a 3 cm presentan mayor invasión perineural que los menores a 3 cm y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.024$). El resto de asociaciones entre parámetros clínico-patológicos y tamaño tumoral $< o >$ a 3 cm no muestra asociación estadísticamente significativa.

Tabla 36. Asociación entre tamaño tumoral ($< o >$ a 3 cm) y parámetros clínico-patológicos

Parámetro clínico-patológico	TAMAÑO TUMORAL		p
	< 3 cm (N=35)	> 3 cm (N=29)	
Invasión perineural (sí)	23 (65.71%)	26 (89.66%)	0.024*
Ca19.9 suero	221.48	542.11	0.478 ***
Ca19.9 histología	163.00	129.48	0.140 ***

*Chi-cuadrado, *** Mann-Withney

4.4.2.3. GRADO HISTOLÓGICO:

A la hora de estudiar las posibles asociaciones entre parámetros clínico-patológicos y grado histológico encontramos que no se observa relación estadísticamente significativa con ningún parámetro. Sí observamos, en nuestra serie, una tendencia a presentar afectación del margen quirúrgico ($p=0.212$), asociarse con PanIN ($p=0.111$) y a presentar invasión vascular ($p=0.137$) a medida que aumenta el grado de desdiferenciación neoplásica.

4.4.2.4. INFLAMACIÓN ASOCIADA AL TUMOR:

En nuestra serie observamos unos niveles de Ca19.9 en suero significativamente más elevados en los casos de ADP con un grado de respuesta inflamatoria asociada de moderada o marcada intensidad, en comparación con aquellos casos de ADP donde la inflamación asociada es mínima o leve ($p=0.021$).

Tabla 37. Asociaciones entre grado de inflamación asociada al tumor y Ca19.9

N Media (sd) [IC 95%] Median p25;p75]	INFLAMACION ASOCIADA AL TUMOR		Total	p-valor Mann-Whitney
	0-1	2-3		
Ca19.9 suero	40 286.54 (483.63) [131.87 ; 441.21] 92.55 [16.60 ; 291.30]	21 521.92 (601.21) [248.26 ; 795.59] 281.10 [136.10 ; 618.40]	61 367.57 (534.07) [230.79 ; 504.36] 151.90 [23.80 ; 395.00]	0.021

4.4.2.5. PROGRESIÓN:

En nuestra serie, los ADP que progresan se presentan en personas de menor edad que los que no progresan, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.045$).

En cuanto a la relación de la progresión con factores con valor pronóstico, llama la atención que en nuestra serie los ADP que progresan mostraron menor invasión vascular, que los que no progresan, con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.036$).

El resto de asociaciones entre parámetros clínico-patológicos y progresión tumoral no muestra asociación con significación estadística. Destacar que los niveles de Ca19.9 en suero son parecidos en ambos grupos.

Tabla 38. Asociación entre progresión tumoral y parámetros clínico-patológicos

Parámetro clínico-patológico	PROGRESIÓN TUMORAL		p*
	NO (N=19)	SI (N=44)	
Edad	67.16	61.23	0.045 **
Invasión vascular (sí)	16 (84.21%)	25 (56.82%)	0.036
Ca19.9 suero	462.22	335.09	0.699***
Ca19.9 histología	141.05	147.27	0.763***

*Chi-cuadrado, ** T-test, *** Mann-Withney

4.5. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIAS

4.5.1. RELACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIAS Y ESTADO MUTACIONAL EN ADP

4.5.1.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG):

Los casos WT muestran un tiempo medio de supervivencia global mayor que los casos con mutación de KRAS ($p=0.0233$), como observamos en las tablas resumen y en las curvas de Kaplan-Meier.

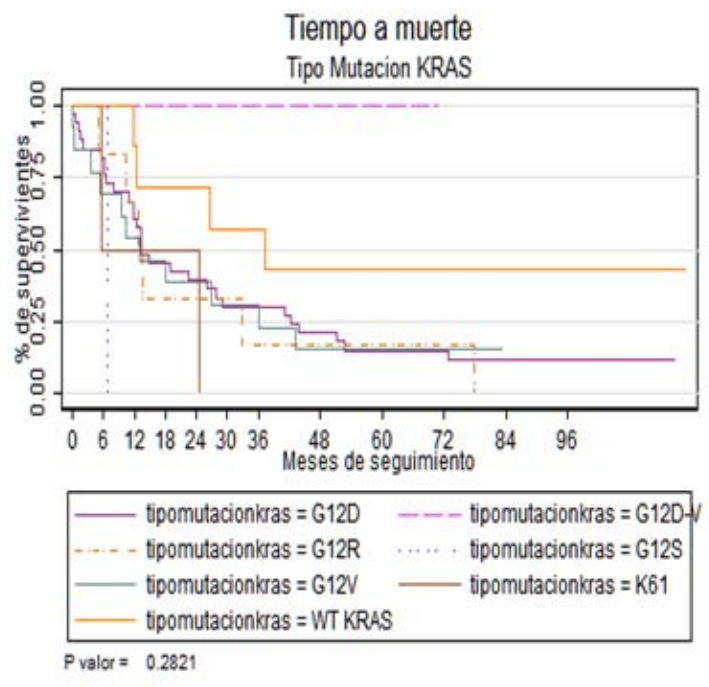
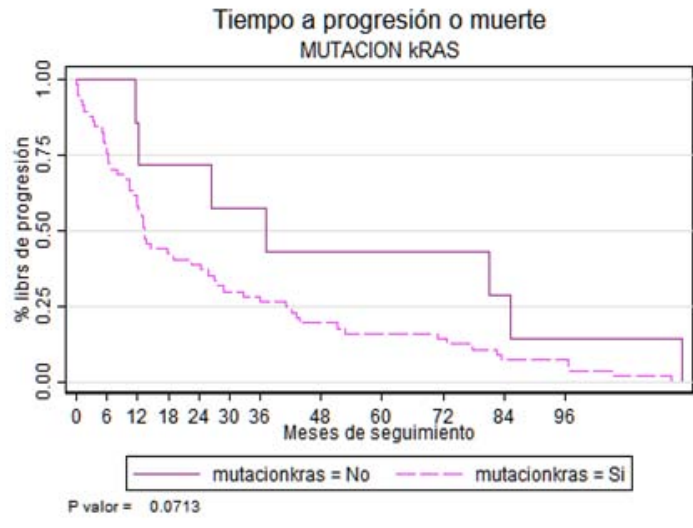
Tabla 39. Supervivencia global según presencia o no de mutación KRAS

MUTACION KRAS	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
No	7	7	8.81 (3.54;18.15)	79.47	11.35	5.67	11.90	13.20	0.023
Si	57	46	2.46 (1.80; 3.28)	1871.50	32.83	9.30	18.90	51.17	
Total	64	53	2.72 (2.03; 3.55)	1950.97	30.48	6.63	13.60	43.13	

Asimismo, si comparamos la supervivencia media de los casos WT, desglosando según todos los tipos de mutación obtenidos en el estudio de nuestra serie, observamos que dicho grupo muestra un tiempo medio de supervivencia global mayor comparado con todos los tipos de mutaciones, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas

Tabla 40. Supervivencia global según tipo de mutaciones de KRAS

Tipo Mutacion KRAS	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
G12D	33	29	2.95 (1.98; 4.24)	982.70	29.78	6.33	13.40	42.23	0.2821
G12D-V	1	0	0.00 (0.00; 5.19)	71.03	71.03	.	.	.	
G12R	7	6	3.86 (1.42; 8.39)	155.57	22.22	10.43	12.73	32.70	
G12S	1	1	15.08 (0.38;83.99)	6.63	6.63	.	.	.	
G12V	13	11	3.31 (1.65; 5.93)	331.97	25.54	5.27	12.93	35.97	
K61	2	2	6.63 (0.80;23.95)	30.17	15.08	5.67	5.67	24.50	
WT KRAS	7	4	1.07 (0.29; 2.75)	372.90	53.27	12.30	37.27	.	
Total	64	53	2.72 (2.03; 3.55)	1950.97	30.48	6.63	13.60	43.13	



4.5.1.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP):

Los casos WT muestran un tiempo medio de supervivencia libre de progresión mayor que los casos con mutación de KRAS, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0.0321$), como observamos en las tablas resumen y en las curvas de Kaplan-Meier.

Tabla 41. Supervivencia libre de progresión según presencia o no de mutación KRAS

MUTACION KRAS	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
No	7	7	8.81 (3.54;18.15)	79.47	11.35	5.67	11.90	13.20	0.031
Si	57	57	3.05 (2.31; 3.95)	1871.50	32.83	6.63	17.87	43.77	
Total	64	64	3.28 (2.53; 4.19)	1950.97	30.48	6.33	13.40	42.23	

Como ocurre a la hora de valorar la supervivencia global, pacientes WT muestran un tiempo medio de supervivencia libre de progresión menor comparándola con todos los tipos de mutaciones de KRAS, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 42. Supervivencia libre de progresión según tipo de mutaciones de KRAS

Tipo Mutacion KRAS	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
G12D	33	33	3.36 (2.31; 4.72)	982.70	29.78	6.33	13.40	42.23	0.3369
G12R	7	7	4.50 (1.81; 9.27)	155.57	22.22	5.07	12.73	32.70	
G12V	13	13	3.92 (2.09; 6.70)	331.97	25.54	5.27	12.93	35.97	
WT KRAS	7	7	1.88 (0.75; 3.87)	372.90	53.27	12.30	37.27	85.10	
Total	64	64	3.28 (2.53; 4.19)	1950.97	30.48	6.33	13.40	42.23	

4.5.2. RELACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIAS Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN ADP

4.5.2.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)

En nuestra serie, de todas las proteínas estudiadas en ADP, ninguna ha presentado significación estadística para SG.

Tabla 43. Resultado análisis multivariante de Cox entre expresión de proteínas y SG

VARIABLE	HR	(95%IC)	Valor p
4E-BP1 c	1.000	(0.995; 1.005)	0.9080
4E-BP1 n	1.001	(0.995; 1.008)	0.6758
p4E-BP1 c	0.99	(0.98; 1.00)	0.1156
p4E-BP1 n	0.997	(0.982; 1.013)	0.7408
eiF4E c	0.999	(0.995; 1.003)	0.5859
eiF4E n	1.001	(0.988; 1.013)	0.9217
peiF4E c	0.999	(0.995; 1.002)	0.5488
peiF4E n	1.000	(0.994; 1.005)	0.9320
pmTOR c	1.000	(0.996; 1.005)	0.8363
pMAPK c	0.999	(0.996; 1.003)	0.7760
pMAPK n	1.001	(0.997; 1.004)	0.7196
pS6 c	0.998	(0.991; 1.005)	0.6392
p16 c	1.001	(0.996; 1.005)	0.7203
p16 n	0.998	(0.993; 1.002)	0.3521
p16 estr	0.997	(0.982; 1.012)	0.6728
p16 estr	0.997	(0.982; 1.012)	0.6758
Ki67	1.01	(0.99; 1.02)	0.3676
YAP1 c	1.002	(0.997; 1.006)	0.5163
YAP1 n	1.004	(0.999; 1.010)	0.1219
P53	0.999	(0.992; 1.006)	0.7065
p53 est	1.04	(0.87; 1.24)	0.6675
N-cadh c	0.998	(0.994; 1.001)	0.2387
N-cadh estr c	1.000	(0.997; 1.003)	0.8353

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; N-cadh: N-Cadherina; HR: Hazard Ratio; IC:intervalo de confianza

Sí observamos que, a medida que aumentan los niveles de Ca19.9 en suero, disminuye la supervivencia global.

VARIABLE	HR	(95%CI)	p-value
Ca19.9 suero	1.000	(1.000; 1.001)	0.0608

HR: Hazard Ratio

4.5.2.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP):

En nuestra serie, de todas las proteínas estudiadas en ADP, ninguna ha presentado significación estadística para SLP.

Tabla 44. Resultado análisis multivariante de Cox entre expresión de proteínas y SG

VARIABLE	HR	(95%IC)	Valor p
4E BP1 c	1.001	(0.996; 1.005)	0.7843
4E-BP1 n	1.002	(0.996; 1.008)	0.5270
p4E-BP1 c	0.99	(0.98; 1.00)	0.2568
p4E-BP1 n	1.002	(0.988; 1.016)	0.7532
eiF4E c	1.000	(0.997; 1.004)	0.8351
eiF4E n	1.01	(0.99; 1.02)	0.3608
peiF4E c	1.000	(0.997; 1.003)	0.8621
peiF4E n	1.001	(0.996; 1.006)	0.6152
pmTOR c	1.000	(0.996; 1.004)	0.9198
pMAPK c	1.000	(0.997; 1.004)	0.8861
pMAPK n	1.001	(0.998; 1.004)	0.5019
pS6 c	1.000	(0.994; 1.007)	0.9329
p16 c	1.001	(0.997; 1.005)	0.6339
p16 n	0.999	(0.996; 1.003)	0.6481
p16 estr c	0.997	(0.984; 1.011)	0.6889
p16 estr n	0.997	(0.984; 1.011)	0.6914
Ki67	1.003	(0.990; 1.016)	0.6444
YAP1 c	1.002	(0.997; 1.006)	0.4489
YAP1 n	1.005	(1.000; 1.010)	0.0720
P53	1.001	(0.994; 1.007)	0.8287
p53 est	1.04	(0.87; 1.24)	0.6940
N-cadh c	0.997	(0.994; 1.001)	0.1492
N-cadh estr c	1.000	(0.998; 1.003)	0.8930

c: citoplasma; n: núcleo; estr: estroma; N-cadh: N-Cadherina; HR: Hazard Ratio; IC:intervalo de confianza

4.5.3. RELACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIAS Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN ADP

4.5.3.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG):

4.5.3.1a SUPERVIVENCIA GLOBAL CON PARÁMETROS PRONÓSTICO:

En nuestra serie, se validan los criterios establecidos como factores con valor pronóstico.

Observamos que, pacientes diagnosticados en **estadios avanzados (III y IV)** tienen una supervivencia global menor que los pacientes con estadios más iniciales, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0014$).

Tabla.45. Supervivencia global según estadio tumoral

ESTADIO	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 de pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
IA	6	4	1.72 (0.47; 4.41)	232.00	38.67	14.67	51.17	52.67	0.001
IB	2	1	0.76 (0.02; 4.22)	132.10	66.05	26.53	26.53	.	
IIA	14	13	4.30 (2.29; 7.35)	302.47	21.60	5.43	11.87	32.70	
IIB	36	29	2.33 (1.56; 3.34)	1245.47	34.60	9.30	17.87	43.77	
III	3	3	22.11 (4.56;64.62)	13.57	4.52	1.20	2.03	10.33	
IV	3	3	11.83 (2.44;34.56)	25.37	8.46	5.07	8.00	12.30	
Total	64	53	2.72 (2.03; 3.55)	1950.97	30.48	6.63	13.60	43.13	

Asimismo observamos que a mayor **tamaño tumoral** menor supervivencia global.

VARIABLE	HR	(95%CI)	p-value
Tamaño del tumor	1.30	(1.03; 1.65)	0.0251

Asimismo observamos que, la **afectación del margen quirúrgico por la neoplasia o por PanIN 3 (R1)** implica una supervivencia global mucho menor respecto a los pacientes con margen quirúrgico libre. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.0000$).

Tabla 46. Supervivencia global según margen quirúrgico afecto

R1	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 de pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
No	48	37	2.05 (1.45; 2.83)	1801.33	37.53	11.87	26.53	72.63	0.0000
Si	16	16	10.69 (6.11;17.36)	149.63	9.35	2.03	5.67	11.90	
Total	64	53	2.72 (2.03; 3.55)	1950.97	30.48	6.63	13.60	43.13	

En nuestra serie, la presencia de **metástasis hepáticas metacrónicas** implica una supervivencia global mucho menor respecto a los pacientes que no presentan progresión hepática. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.0259$).

Metástasis hepáticas	SUPERVIVENCIA GLOBAL		p*
	Tiempo mediana (meses)		
NO	25.97		0.0259
SI	12.73		

Se observa una media de supervivencia global menor en aquellos casos con invasión vascular, linfática y perineural respecto a los que no la presentan, aun sin demostrar diferencias estadísticamente significativas

Tabla 47. Supervivencia global según invasión vascular, linfática o perineural

Otros parámetros pronóstico	SUPERVIVENCIA GLOBAL		Valor p
	Tiempo mediana (meses)		
Invasión vascular			
NO	22.53		0.553
SI	12.73		
Invasión linfática			
NO	27.03		0.510
SI	12.93		
Invasión perineural			
NO	14.67		0.601
SI	13.40		

4.5.3.1b. SUPERVIVENCIA GLOBAL CON ADYUVANCIA:

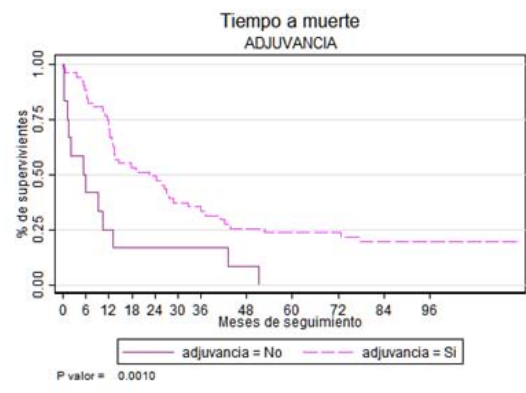
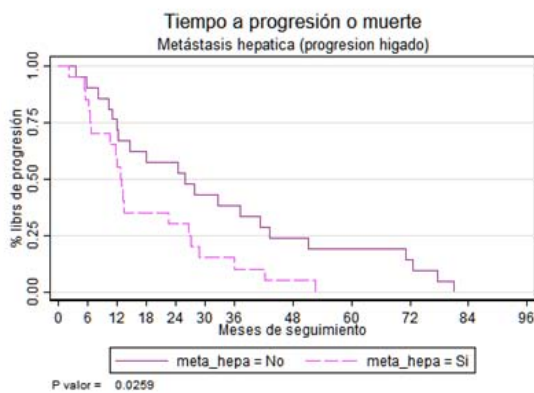
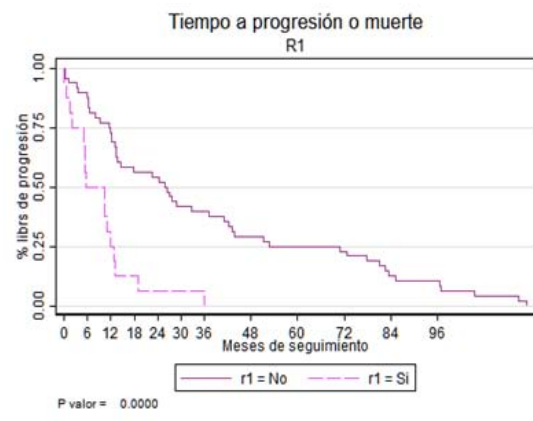
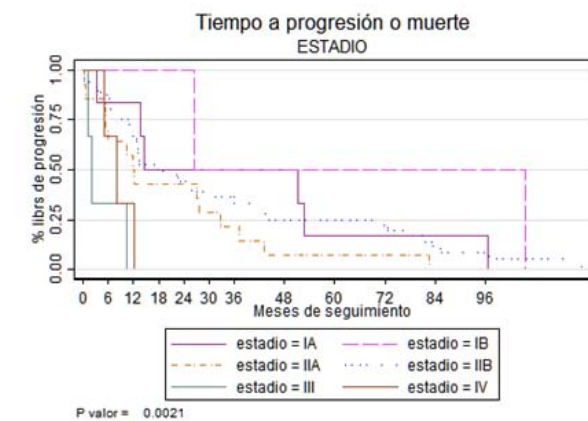
En nuestra serie, la mayoría de los pacientes recibieron tratamiento adyuvante post-cirugía. En 12 casos no recibieron dicho tratamiento, ya fuese porque su enfermedad avanzó rápidamente o porque rechazaron el mismo. Los pacientes que sí recibieron tratamiento adyuvante presentaron un tiempo medio de supervivencia global mayor que aquellos que no lo recibieron, 22.53 vs 5.43 meses respectivamente, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0010$).

4.5.3.1c. SUPERVIVENCIA GLOBAL CON PROGRESIÓN:

En nuestra serie observamos que los pacientes que presentan progresión tienen una supervivencia global ligeramente mayor que los que no progresan, 13.60 vs 13.33 respectivamente y esta diferencia es estadísticamente significativa (p= 0.0103)

Tabla 48. Supervivencia global según progresión

PROGRESIO N	N sujeto s	N Evento s	Tasa de incidencia*10 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimient o	Tiempo o Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo o Q ₇₅)	P valor
No	19	19	2.17 (1.31; 3.39)	874.60	46.03	1.20	13.33	0.010
Si	44	44	4.10 (2.98; 5.50)	1073.03	24.39	10.33	13.60	
Total	63	63	3.23 (2.49; 4.14)	1947.63	30.91	6.63	13.60	

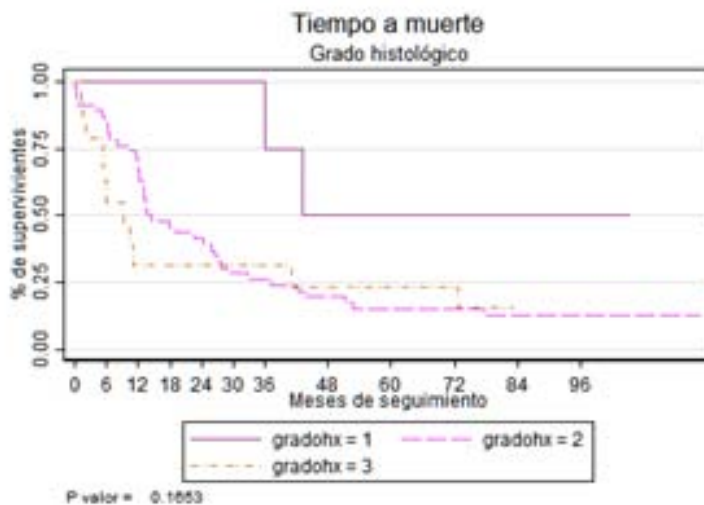


4.5.3.1d. SUPERVIVENCIA GLOBAL CON OTROS PARÁMETROS:

En nuestra serie, en relación al **grado de diferenciación tumoral**, observamos que los ADP bien diferenciados presentan mayor supervivencia global que los ADP con moderada diferenciación o poco diferenciados, como muestran las curvas de Kaplan-Meier, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 49. Supervivencia global según grado histológico

Grado histológico	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 de pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
1	4	2	0.74 (0.09; 2.68)	269.77	67.44	35.97	43.13	.	0.165
2	46	40	2.97 (2.12; 4.05)	1345.57	29.25	10.33	13.60	37.27	
3	14	11	3.28 (1.64; 5.86)	335.63	23.97	5.27	9.30	41.20	
Total	64	53	2.72 (2.03; 3.55)	1950.97	30.48	6.63	13.60	43.13	



En nuestra serie observamos una supervivencia global menor en aquellos casos **con pancreatitis de base y una reacción desmoplásica e inflamación asociadas al tumor de grado 2-3** respecto a los que no la presentan, aun sin ser diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 50. Supervivencia libre de progresión según parámetros patológicos

Otros parámetros histo-patológicos	SUPERVIVENCIA GLOBAL	
	Tiempo mediana (meses)	Valor p
Pancreatitis de base		
NO	22.53	0.660
SI	13.20	
Otros parámetros histo-patológicos	SUPERVIVENCIA GLOBAL	
	Tiempo mediana (meses)	Valor p
Desmoplasia asociada al tumor		
0-1	26.53	0.550
2-3	13.40	
Inflamación asociada al tumor		
0-1	14.67	0.362
2-3	13.20	

4.5.3.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP):

4.5.3.2a. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CON PARÁMETROS PRONÓSTICO:

En nuestra serie observamos que pacientes diagnosticados en **estadios avanzados (III y IV)** tienen una supervivencia libre de progresión menor que pacientes con estadios más iniciales, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0021$).

Tabla 51. Supervivencia libre de progresión según estadio tumoral

ESTADIO	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 de pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
IA	6	6	2.59 (0.95; 5.63)	232.00	38.67	13.60	14.67	52.67	0.002
IB	2	2	1.51 (0.18; 5.47)	132.10	66.05	26.53	26.53	105.57	
IIA	14	14	4.63 (2.53; 7.77)	302.47	21.60	5.43	11.87	32.70	
IIB	36	36	2.89 (2.02; 4.00)	1245.47	34.60	9.30	17.87	43.77	
III	3	3	22.11 (4.56;64.62)	13.57	4.52	1.20	2.03	10.33	
IV	3	3	11.83 (2.44;34.56)	25.37	8.46	5.07	8.00	12.30	
Total	64	64	3.28 (2.53; 4.19)	1950.97	30.48	6.33	13.40	42.23	

Asimismo observamos que la **afectación del margen quirúrgico por la neoplasia o PanIN 3** implica una supervivencia libre de progresión mucho menor respecto a los pacientes con margen quirúrgico libre. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.0000$). (Tabla 61).

Tabla 52. Supervivencia libre de progresión según margen quirúrgico afecto

R1	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
No	48	48	2.66 (1.96; 3.53)	1801.33	37.53	11.67	25.97	52.67	0.0000
Si	16	16	10.69 (6.11;17.36)	149.63	9.35	2.03	5.67	11.90	
Total	64	64	3.28 (2.53; 4.19)	1950.97	30.48	6.33	13.40	42.23	

En cuanto a la **progresión en forma de metástasis hepáticas**, en nuestra serie implica una supervivencia libre de progresión mucho menor respecto a los pacientes con progresión a otras localizaciones, con una diferencia es estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0.0259$)

Tabla 53. Supervivencia libre de progresión según progresión a hígado

Metástasis hepática (progresión hígado)	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
No	21	21	3.08 (1.91; 4.71)	681.43	32.45	11.87	25.97	43.13	0.025
Si	20	20	5.65 (3.45; 8.72)	354.03	17.70	6.33	12.73	26.53	
Total	41	41	3.96 (2.84; 5.37)	1035.47	25.26	10.43	14.67	35.97	

Observamos en nuestra serie una media de supervivencia libre de progresión menor en aquellos casos con invasión vascular, linfática y perineural respecto a los que no la presentan, aun sin ser diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 54. Supervivencia libre de progresión según invasión vascular, linfática o perineural

Otros parámetros pronóstico	SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN	
	Tiempo mediana (meses)	P valor
Invasión vascular		
NO	22.53	0.601
SI	12.30	
Invasión linfática		
NO	22.53	0.861
SI	12.93	
Invasión perineural		
NO	14.67	0.826
SI	13.40	

4.5.3.2b. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CON ADYUVANCIA:

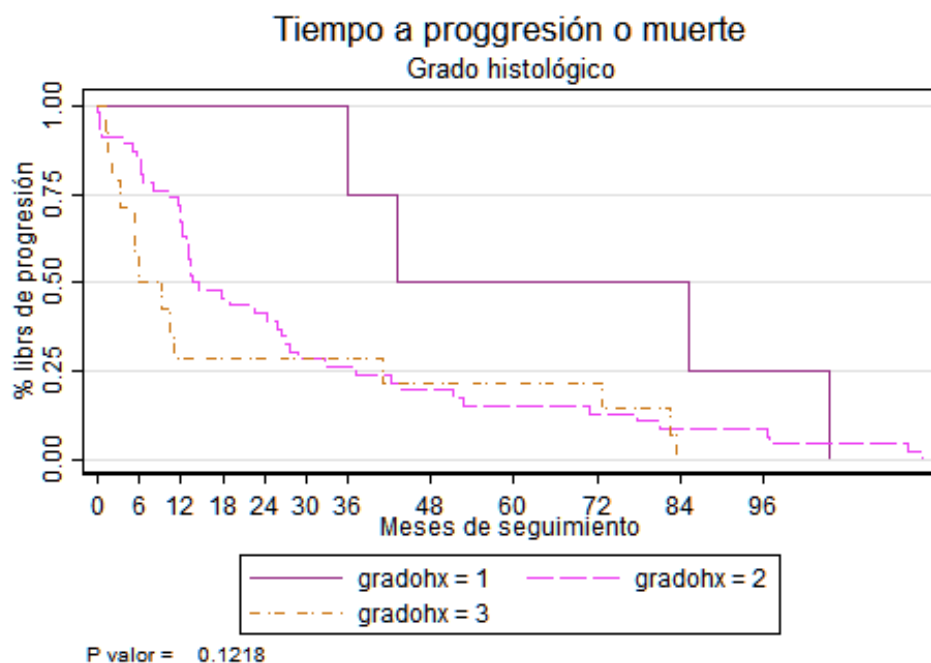
En nuestra serie, los pacientes que sí recibieron tratamiento adyuvante presentaron un tiempo medio de supervivencia libre de progresión mayor que aquellos que no lo recibieron, 18.90 vs 5.43 meses respectivamente, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0015$)

Tabla 55. Supervivencia libre de progresión según adyuvancia

ADYUVANCIA	N sujetos	N Eventos	Tasa de incidencia*100 de pers. Tiempo (I.C.95%)	Tiempo a riesgo	Tiempo promedio de seguimiento	Tiempo Q ₂₅	Tiempo Mediana (Tiempo)	Tiempo Q ₇₅	P valor
No	12	12	8.35 (4.31;14.58)	143.77	11.98	1.20	5.43	10.43	0.001
Si	52	52	2.88 (2.15; 3.77)	1807.20	34.75	11.03	18.90	43.77	
Total	64	64	3.28 (2.53; 4.19)	1950.97	30.48	6.33	13.40	42.23	

4.5.3.2c. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN CON OTROS PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS:

En relación al **grado histológico tumoral**, en nuestra serie observamos que los ADP bien diferenciados presentan mayor supervivencia libre de progresión (43.13 meses) que los ADP con moderada diferenciación (13.60) o poco diferenciados (6.03), como muestran las curvas de Kaplan-Meier, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p=0.1218$).



En relación a la **localización tumoral**, observamos que los ADPs localizados en cabeza tienen una supervivencia ligeramente mayor que los localizados en cuerpo y cola, con 13'40, 12'93 y 12'30 meses de tiempo medio respectivamente, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0.3261$).

Asimismo, observamos en nuestra serie una media de supervivencia libre de progresión menor en aquellos casos con **pancreatitis de base** y con **desmoplasia asociada a la neoplasia** moderada-marcada respecto a los que no la presentan, aún sin ser diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 56. Supervivencia libre de progresión según parámetros patológicos

Otros parámetros pronóstico	SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN	
	Tiempo mediana (meses)	P valor
Pancreatitis asociada		
NO	22.53	0.917
SI	12.93	
Desmoplasia asociada al tumor		
0-1	26.53	0.860
2-3	13.33	
Inflamación asociada al tumor		
0-1	13.60	0.806
2-3	13.20	
PanIN		
NO	13.60	0.897
SI	13.40	

4.6. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Para estimar el efecto de las diferentes variables clínicopatológicas y los marcadores IHQ sobre el tiempo de supervivencia global y el tiempo libre de progresión, se realizó un análisis multivariante de regresión de Cox y poder valorar si la presencia de mutación de KRAS se comportaba como un factor pronóstico independiente.

4.6.1. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE TIEMPO DE SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)

Se incluyeron todas las variables que presentaron significación estadística en el análisis bivariante, en relación a la presencia de mutación de KRAS y se ajustó por edad y sexo. En nuestro estudio, el margen quirúrgico afecto en el momento de la cirugía (R1) ($p=0.001$), el estadio III ($p=0.019$) y la expresión de YAP1 nuclear ($p=0.032$) se comportaron como factores pronóstico independientes (tabla xx)

Tabla 57. Resultados estadísticamente significativos del estudio multivariante en relación a SG

VARIABLE		HR	(95%CI)	Valor p
R1	No	1		0.0013
	Si	3.40	(1.62; 7.16)	
YAP1 n		1.01	(1.00; 1.01)	0.0320
ESTADIO	IA	1		0.0109
	IB	0.26	(0.03; 2.56)	
	IIA	2.59	(0.80; 8.44)	
	IIB	0.95	(0.32; 2.85)	
	III	6.84	(1.14;41.04)	
	IV	4.55	(0.72;28.95)	

4.6.2. ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE TIEMPO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP):

Asimismo, se incluyeron todas las variables que presentaron significación estadística en el análisis bivariante, en relación a la presencia de mutación de KRAS y se ajustó por edad y sexo. El único parámetro que presentó significación estadística y, por consiguiente, se comportó como un factor pronóstico independiente, fue la afectación del margen quirúrgico en el momento de la cirugía (R1) ($p=0.000$)

Tabla 58. Resultados estadísticamente significativos del estudio multivariante en relación a SLP

VARIABLE		HR	(95%CI)	Valor p
R1	No	1		0.0000
	Si	4.02	(2.11; 7.65)	

5. DISCUSIÓN

5.1. Parámetros clínico-patológicos relacionados con ADP

Las características epidemiológicas e histopatológicas de nuestro estudio son similares a las descritas por otros grupos (Matsuno S. et al., 2004; Lüttges J. et al., 2004).

En nuestra serie se observa una ligera predominancia de los ADP en hombres (51.56%) respecto a las mujeres (48.44%), afectando con más frecuencia a pacientes de edades comprendidas entre los 60 y 80 años, con una edad media de 63 años (rango 34-82 años), sin evidenciar ningún caso en menores de 30 años, coincidiendo con las observaciones de diferentes estudios de largas series de ADPs (Lüttges J. et al., 2004).

En relación al Ca19.9, en nuestra serie observamos unos niveles en suero relacionados con diversas variables clínico-patológicas estudiadas. Observamos que los ADP con un grado de respuesta inflamatoria de moderada o marcada intensidad muestran niveles más elevados de Ca19.9 en suero ($p=0.021$). Asimismo, los niveles son más elevados en los casos de ADP localizados en cuerpo y cola en comparación con los ADP de cabeza de páncreas ($p=0.062$). Los tumores con tamaño mayor a 2 cm también tienden a presentar niveles más elevados de Ca19.9 en suero ($p=0.090$). A diferencia de lo descrito en la literatura, en nuestra serie no observamos correlación entre los niveles de ca19.9 en suero y afectación del margen quirúrgico, estadios avanzados, o metástasi ganglionar, como describe Farnell (Barton J.G. et al., 2009), enfermedad metastásica, como describe Grützmann, o peor supervivencia media (niveles > a 37 U/ml presentan una supervivencia media menor), como refiere Hartwig (Hartwig W. et al., 2013). Existen limitaciones importantes a la hora de evaluar los niveles de Ca19.9 en suero, por presentar una sensibilidad baja y por la existencia de falsos negativos en pacientes con fenotipo Lewis negativo (5-10%) y falsos positivos en pacientes con ictericia obstructiva (10-60%), lo que limita su utilidad en la práctica clínica. La mayor utilidad de este marcador es en el seguimiento de los pacientes operados y en la valoración de la respuesta a los tratamientos.

La localización tumoral observada en los ADPs de nuestra serie coincide con la recogida en varios estudios, que describen la cabeza de páncreas como localización más frecuente (Sociedad Japonesa de Páncreas; Hruban R.H. et al., 2007). En nuestra serie observamos un claro predominio de ADPs localizados en cabeza de páncreas, 84'3%, respecto al cuerpo, 6'25% y cola, 9'37%.

En cuanto a hallazgos morfológicos descritos asociados al ADP, en nuestra serie, en un 95'31% se identifican lesiones intraepiteliales pancreáticas (Pan-IN) asociadas al ADP, el 64'06% de los ADP de nuestra serie asienta sobre un páncreas con pancreatitis crónica, se observa desmoplasia asociada al tumor en todos los casos (en un 17'46% es mínima o leve y en un 84'12% es moderada- marcada). En el caso de la valoración de la inflamación asociada a ADP, en nuestra serie un 16'66% de los ADP presenta ausente o leve inflamación asociada, y un 81'66 % moderada o marcada.

5.2. La mayor parte de las proteínas involucradas en las vías de señalización activadas en el ADP muestran un aumento paulatino de sus niveles de expresión en la progresión desde lesiones precursoras (PanIN) hasta el adenocarcinoma infiltrante.

Históricamente se describió la progresión morfológica de PanIN a ADP paralela a la acumulación de ciertas alteraciones genéticas en un modelo de progresión que se asemejaba al modelo de cáncer de colon (Pylayeva-Gupta Y. et al., 2011).

Navas, Barbacid y Pylayeva-Gupta describen, en sus modelos animales, nuevos modelos genéticos que apoyan el concepto de que la progresión gradual de las lesiones precursoras del epitelio llevan a un adenocarcinoma pancreático ductal invasivo como resultado de la acumulación de mutaciones en KRAS, p16/INK4A/ARF y P53/TP53 (Hingorani S.R. et al., 2005; Navas C. et al., 2012). Estos modelos acentúan la función iniciadora de la mutación de KRAS, con un modelo de cáncer de páncreas establecido donde aparecen todas sus características clásicas, incluyendo la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad en las señales anti-crecimiento, la evasión de la apoptosis, el potencial de replicación ilimitado, el sostenimiento de la angiogénesis, la invasión tisular y la metástasis (Pylayeva-Gupta Y. et al., 2011). La alteración más frecuentemente descrita es la activación de la vía KRAS a través del receptor del EGFR (Hidalgo M., 2010). Sin embargo, la baja frecuencia de progresión espontánea desde PanIN iniciales a ADP infiltrante sugiere que son necesarias otras alteraciones genéticas para dicha progresión (Morris J.P. et al., 2010). Cuando sólo está activado el oncogen KRAS, PanIN iniciales se desarrollan tempranamente, pero la progresión a PanIN de alto grado y ADP se retrasa. Este proceso se acelera sustancialmente cuando hay mutaciones asociadas de p53, p16, o SMAD4, sugiriendo que las proteínas codificadas por estos genes inhiben las señales de proliferación mediadas por KRAS mutado (Bardeesy N. et al., 2005; Hingorani S.R. et al., 2005).

Los resultados de nuestra serie demuestran un incremento en la expresión de la mayoría de las proteínas estudiadas, involucradas en las vías de señalización activadas por KRAS, a medida que van progresando las lesiones precursoras en casos de pancreatitis crónica (PC) hasta evolucionar a adenocarcinoma infiltrante, confirmando tanto la activación de la vía PI-3K, MAPK e Hippo. En nuestra serie observamos una diferencia de expresión significativa de diversas proteínas en el ADP en comparación con su expresión en la PC, con una sobreexpresión en los casos de 4E-BP1 citoplásmico y nuclear (ambas con $p=0.000$), p4E-BP1 citoplásmico ($p=0.008$), F4E citoplásmico ($p=0.000$), pElF4e citoplásmico y nuclear (ambos con $p=0.000$), pMAPK citoplásmica y nuclear ($p=0.018$ y $p=0.002$ respectivamente), p16 citoplásmico ($p=0.010$), TP53/p53 ($p=0.000$), Ki67 ($p=0.000$) y YAP 1 nuclear ($p=0.000$). Chunling Yi y colaboradores demuestran, tanto en estudio en cultivos celulares como en su modelo animal, que la inactivación de YAP detiene la proliferación de células neoplásicas en cultivo y la progresión de las lesiones precursoras de bajo grado hacia ADP en ratones, definiéndolo como un efector oncogénico de la vía KRAS (Zhang W. et al., 2014).

En siete de los marcadores inmunohistoquímicos se obtuvo un punto de corte con una sensibilidad (S) y/o especificidad (E) mayores de 75% y con un valor predictivo positivo elevado, que podría ser útil a la hora de valorar biopsias pequeñas en las que, muchas veces, perdemos la referencia arquitectural y es difícil discernir entre una proliferación ductal reactiva/MAD versus un ADP bien diferenciado. Así mismo, sería útil a la hora de valorar la afectación del margen quirúrgico (4E-BP1 c: mejor punto de corte $AUC \geq 15$; 4E-BP1 n: mejor punto de corte $AUC \geq 35$; eIF4E c : mejor punto de corte $AUC \geq 60$; pEIF4E c: mejor punto de corte $AUC \geq 110$; pEIF4E n; mejor punto de corte $AUC \geq 40$; YAP1 n: mejor punto de corte $AUC \geq 2$ y Ki67: mejor punto de corte $AUC \geq 20$). No obstante, el hecho de haber observado una tinción inmunohistoquímica heterogénea de las proteínas valoradas, limita en cierto modo su utilidad si la muestra es poco representativa. Dicha limitación no afecta al marcador inmunohistoquímico Ki67 (técnica por otra parte disponible en todos los laboratorios de anatomía patológica, a diferencia del resto de marcadores), con un VPP del 100% en un punto de corte mayor o igual a 20. Podría ser un marcador a implantar en la práctica clínica a la hora de abordar el diagnóstico de cualquier pieza de resección para valorar márgenes quirúrgicos.

Observamos una disminución en los niveles de expresión de pmTOR y pS6, pero con sobreexpresión de 4E-BP1 y eIF4E, lo que sugiere que la vía CAP independiente de mTOR no se activa en la progresión desde lesiones precursoras a ADP ni en los casos de PC y que los efectores de la cascada 4E-BP1 y eIF4E se activarían por la interacción de otras vías/quinasas. Está descrito en la literatura que algunos carcinomas humanos presentan niveles elevados de p4E-BP1 no siempre asociados con niveles elevados de pmTOR. Estas observaciones sugieren que otras quinasas puedan estar implicadas en la fosforilación de 4E-BP1. Ramon y Cajal estudió una serie de quinasas (LRRK2, RAF-1, AMPKalfa, implicadas en la estabilidad de 4E-BP1; o CDK1, PDK1 implicadas en la fosforilación de 4E-BP1) en líneas celulares de cáncer de mama, concluyendo que la disminución (“down regulation”) de LRRK2 se asociaba a disminución de la proteína 4E-BP1 y que el silenciamiento (“knockdown”) de LRRK2 se asociaba a un elevado índice proliferativo en células normales (Pons B. et al., 2012). Asimismo observamos una disminución significativa de la expresión de pS6 citoplasmático ($p=0.028$).

5.3. Los “ADP primarios” vs “ADP secundarios” no muestran parámetros diferenciales entre sí.

La pancreatitis crónica (PC) es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de ADP (Lowenfels A.B. et al., 1993; Maitra A. et al., 2002). Se sabe que la inflamación crónica, causada por un daño pancreático repetido, ya sea medioambiental o por factores genéticos, aumenta sustancialmente el riesgo de padecer cáncer pancreático (Yadav D. y Lowenfels A.B., 2013). Recientemente estudios epidemiológicos han sugerido una correlación beneficiosa de los AINEs y el riesgo de cáncer pancreático (CP) ((Bonifazi M. et al., 2010; Bradley M.C. et al., 2010). Asimismo, se ha visto que pacientes a los que se les somete a cirugía por PC tienen una incidencia muy baja de ADP (Ueda J. et al., 2012). Gerra y Kopp demostraron, en un modelo animal, que la PC era un componente esencial para el desarrollo de

CP, ya que aceleraba el desarrollo de PanIN (Guerra C. et al., 2007, 2011; Kopp J.L. et al., 2012). Se ha descrito una relación tanto con pancreatitis crónica como con pancreatitis aguda, aunque la primera interactúa más intensamente con el oncogen KRAS.

En nuestra serie, basándonos en esta asociación, agrupamos los casos en “ADP primario” (aquellos casos no asociados a PC de base + casos asociados a PanIN 1, sin evidencia de PC ni PanIN de alto grado (PanIN 2 y/o 3)) y en “ADP secundario” (aquellos casos en los que se observa PC de base y/o PanIN de alto grado asociados a la neoplasia), con una clara predominancia de casos de ADP secundario vs primario (95’31% vs 4’68% de los casos). No observamos diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a expresión de las proteínas estudiadas involucradas en las diferentes vías de señalización activadas en el ADP. En relación a parámetros clínico-patológicos, en nuestra serie tampoco observamos diferencias significativas entre ambos grupos. Así mismo, no se observan diferencias en cuanto a asociación con mutación de KRAS entre los dos grupos ($p=0.534$). En relación a la supervivencia, los “ADP primarios” muestran una supervivencia global ligeramente menor en comparación con los “ADP secundarios”, sin llegar a tener significación estadística ($p=0.690$). La supervivencia libre de progresión es prácticamente la misma en ambos grupos ($p=0.868$). Estos resultados no significativos pueden ser debidos a la baja representación de “ADP primarios” en nuestra serie, lo cual dificulta la comparación de grupos.

5.4. Estado mutacional de la serie.

Como ya se ha mencionado en la introducción, el gen KRAS aparece mutado en el 75-90% de los ADP y representa la mutación más frecuente y temprana, observándose ya en lesiones precursoras pancreáticas de bajo grado (Morris J.P. et al, 2010; Aichler M. et al, 2012).

El protooncogen KRAS codifica para una GTPasa de 21kDa, que actúa entre los estados activos de la unión GTP e inactivos de la unión GDP. El cambio al estado activo está promovido por factores intercambiadores de nucleótidos de la guanina (GEF). Por consiguiente, la inactivación de KRAS está mediada por proteínas activadoras de GTPasas (GAP), que inducen la hidrólisis de GTP.

Las mutaciones activadas de KRAS que se producen en el ADP implican una actividad GTPasa intrínseca de la proteína KRAS, que bloquea la interacción entre KRAS y GAP, provocando una activación constitutiva del mismo y un estímulo continuo de la cascada de las vías de señalización que, como consecuencia, activan la mayoría de los procesos determinantes del cáncer, como son la proliferación celular no controlada, reprogramación metabólica celular, anti-apoptosis, remodelación del microambiente, evasión de la respuesta inmune, migración celular y metástasis (Pylayeva-Gupta Y. et al, 2011).

En nuestra serie, del total de 64 casos, 57 (89’06%) presentaron mutación de KRAS y 7 (10’94%) fueron Wild-type, tanto para mutación de KRAS como para mutación de NRAS, coincidiendo con estudios de

series largas (1% de 147 casos recopilados en la base de datos TCGA y 1% de 100 casos recopilados en la base de datos de ICGC, Nature 2012)

La gran mayoría de las mutaciones puntuales observadas en los ADP, capaces de activar al proto-oncogen KRAS, ocurren en el codón 12 (98% de todas las mutaciones de KRAS en ADP), aunque también existen mutaciones del mismo tipo en los codones 13 y 61. En nuestra serie se observa una predominancia de la mutación en el codón 12 (73,67%), en pocos casos se observó mutación en el 61 (3'07%) y no se observaron mutaciones en el codon 13, 117 o 146, coincidiendo con las series recogidas en el TCGA e ICGC (Nature 2012), con resultados similares en series que recopilan respectivamente 126 casos (93,56% codón 12, 6,34% para codón 61, 0% de casos para codones 117 y 146) y 95 casos de ADP (94'7% para el codón 12, 5,26% codón 61, 0% para codones 117 y 146).

5.5. Se confirma la activación de varias cascadas de señalización que regulan funciones determinantes para la tumorigénesis.

El estudio de las vías de señalización que están implicadas en el crecimiento y ciclo celular, así como en la apoptosis, ha contribuido a entender los mecanismos patogénicos de los tumores. La aparición de dianas terapéuticas, factores pronósticos y factores predictivos de resistencia tumoral han contribuido asimismo a incrementar el interés por este estudio. A pesar de los recientes avances, el oncogen KRAS sigue siendo un objetivo terapéutico extremadamente desafiante (Wang Y. et al., 2013; Thomson H., 2013). Por ello, el esfuerzo está dedicado a la identificación de los efectores críticos oncogénicos en la vía de KRAS.

5.5.1. Vía PI-3K/AKT/mTOR:

En muchos cánceres, la síntesis de proteínas está aumentada. El incremento en la síntesis de proteínas por activación de la vía PI-3K se relaciona con el incremento en la formación del complejo de iniciación eIF4F, formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G, que se asocia a la estructura cap 5' de mRNA y estimula la iniciación de traslación cap dependiente (Gingras A.C. et al, 1999). La actividad de eIF4E está regulada por factores de crecimiento por medio de dos mecanismos diferentes (Mnk y 4E-BPs). En concreto, 4E-BP1 es una proteína de unión que tiene un papel fundamental en el control de la síntesis de proteínas (Mamane Y. et al, 2004). La familia de proteínas supresoras (4E-BPs) se unen al eIF4E, previniendo la formación del complejo eIF4F y su unión al cap. (Marcotrigiano J. et al, 1999). Cuando 4E-BP1 está activo (hipofosforilado 4E-BP1), se une y secuestra eIF4E en el citoplasma y bloquea la traducción de proteínas. Sin embargo, cuando 4E-BP1 está fosforilado, libera al eIF4E, éste se une a la estructura cap RNAm y promueve la formación del complejo de iniciación y la unión del ribosoma, comenzando así la traducción de proteínas dependiente de cap (De Benedetti A. y Graff J.R., 2004). El aumento de la concentración citoplasmática de p4E-BP1 observada en tumores de mal pronóstico puede ser la

traducción de su hiperfosforilación e, indirectamente, una consecuencia de alteraciones en la vía PI-3K/AKT/mTOR, o bien por otras quinasas de la vía Ras-Raf-MEK-MAPK (Herbert T.P. et al., 2002).

En nuestro estudio hemos evaluado tanto pmTOR, 4E-BP1 total y fosforilado como eIF4E total y fosforilado y pS6. El estudio de expresión mediante score se realizó en el núcleo y el citoplasma independientemente

En nuestra serie observamos expresión citoplasmática de pmTOR en el 92'18% de los ADP, coincidiendo con la sobreexpresión descrita en estudios de tumores en otros órganos, como el realizado por Ronellenfisch en los glioblastomas (Harter P.N. et al, 2015), por Calvisi en hepatocarcinomas en modelos animales (Delogu S. et al, 2015), por Sánchez-Céspedes en pulmón (Conde E. et al., 2006) o por Garcia-Patos en carcinomas escamosos de pene (Ferrandiz-Pulido C. et al, 2013). En este último estudio demuestran una correlación entre la sobreexpresión de pmTOR con afectación ganglionar. Bose, asimismo, en un estudio que engloba 145 carcinomas de mama invasivos concluye que neoplasias con sobreexpresión de mTOR triplican el riesgo de recurrencia (Bose S. et al., 2006). En nuestra serie no identificamos una relación significativa entre la expresión citoplasmática de pmTOR y parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico, progresión o estado mutacional. Sí destacar una ligera tendencia a la sobreexpresión a medida que aumenta el estadio tumoral ($p=0.285$) y en casos con invasión linfática ($p=0.441$).

En relación a la valoración de 4E-BP1 total, en nuestro estudio observamos expresión de 4E-BP1 total, tanto citoplasmático como nuclear, en el 96,8% de los ADP. No observamos correlación entre la expresión de 4E-BP1 con factores pronóstico ni estado mutacional. Hemos de resaltar, sin embargo, una tendencia a la disminución de la expresión en los tumores con invasión linfática (4E-BP1 c: $p=0.605$, 4E-BP1 n: $p=0.376$) e invasión perineural (4E-BP1 c: $p=0.709$; 4E-BP1 n: $p=0.408$). Chen demuestra, en sus modelos animales, como el bloqueo de la cascada 4E-BP1/eIF4E por 4E-BP1A4, una forma no fosforilable de 4E-BP1, disminuye significativamente la hepatocarcinogénesis inducida por AKT/RAS (Wang C. et al, 2015).

En relación a la valoración de p4E-BP1, en nuestra serie observamos expresión citoplasmática de p4E-BP1 en el 90,74% y nuclear en el 70,3% de los ADP. La sobreexpresión nuclear de p4E-BP1 fue descrita por varios autores en diferentes tumores humanos (Castellví J. et al., 2006; Benavente S. et al, 2009) y corroborada posteriormente por Sonenberg mediante estudios de inmunofluorescencia *in vitro* (Rong L. et al., 2008). Otros grupos han descrito sobreexpresión de p4E-BP1 en carcinomas de próstata (Kremer CL, 2006) y en cánceres del aparato digestivo (Martín M.E. et al., 2000). A diferencia de lo descrito por Castellví y Rojo, con estudios que demuestran que la sobreexpresión de p4E-BP1 se asociaba a recurrencias y mal pronóstico en adenocarcinomas de ovario y mama (Castellví J et al., 2006; Armengol G. et al., 2007), en nuestra serie observamos una disminución significativa de la expresión en aquellos

casos que presentan invasión linfática ($p=0.003$). Con el resto de parámetros pronóstico, progresión o estado mutacional no se observan relaciones significativas.

En relación a la valoración de eIF4E total, en nuestra serie observamos expresión citoplasmática en el 76,56% y nuclear en el 35,9% de los ADP. El eIF4E es un oncogen cuyos niveles se han visto elevados en muchos cánceres humanos, como el cáncer de mama, cáncer colorectal, de vejiga urinaria, de cérvix uterino o carcinoma escamoso de cabeza y cuello (De Benedetti et al., 2004), con valor pronóstico en varios de ellos (Gelder. et al., 1995; Li B.D. et al., 1998)

Sonenberg describe, en estudios in vitro, como eIF4E induce transformación maligna a través de la regulación de múltiples propiedades celulares, como son la proliferación, la supervivencia y la independencia a la adhesión (Lazaris-Karatzas A. et al, 1990). En nuestra serie, sin embargo, no identificamos una relación significativa entre la expresión citoplasmática o nuclear de eIF4E total y parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico o estado mutacional. Sí destacar una tendencia a la sobreexpresión en los tumores que progresan ($p=0.227$) y con invasión vascular ($p=0.213$) y linfática ($p=0.723$).

En relación a pEIF4E, Ramon y Cajal y colaboradores describen que la fosforilación de eIF4E aumenta la habilidad de clonación y confiere resistencia a fármacos (Martínez A. et al., 2015) y que la sobreexpresión de pmTOR y pEIF4E se correlaciona con peor pronóstico (Ferrández-Pulido C. et al., 2013). Anteriormente, otros grupos de investigación, Travis en pulmón (Yoshizawa A et al., 2010), Bose en cáncer de mama (Bose S. et al., 2006), Ayala en cáncer de próstata (Li L. et al., 2008), Martinez-Guitarte en endometrio (Pallares J. et al., 2005) o Louis en glioblastomas (Riemenschneider et al., 2006), han demostrado un aumento de la expresión de pEIF4E en diversos cánceres. Dicho aumento se asocia a progresión de la neoplasia y peor pronóstico. Otros autores concluyen que la regulación de la unión del eIF4E al cap es una diana potencial para la intervención terapéutica en el cáncer (Meric F. y Hunt K.K, 2002). En nuestra serie observamos expresión citoplasmática en el 98,43% y nuclear en el 95,31 de los ADP. No identificamos una relación significativa entre la expresión citoplasmática y nuclear de pEIF4E y parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico o estado mutacional. Sí que cabe destacar una ligera tendencia a la sobreexpresión en los tumores que progresan ($p=0.741$). En cuanto a la expresión nuclear de eIF4E, a diferencia de lo descrito en la literatura, observamos una disminución de la expresión significativa en aquellos casos con invasión perineural ($p=0.048$). Con el resto de parámetros (pronóstico, progresión o estado mutacional) no se observan relaciones significativas con la expresión nuclear de dicho marcador.

Otra proteína estudiada en nuestra serie es la S6. La fosforilación de S6 ribosomal y eIF4E está controlado directa e indirectamente por mTOR. Sonenberg estudió sus expresiones en cáncer de pulmón, pero concluye que sus funciones en el desarrollo del cáncer no están claros (Mamane Y. et al.,

2006). Ledoux describe que la elevación de la expresión de pS6 se asocia a metástasis en el adenocarcinoma de pulmón (McDonald JM et al., 2008). En nuestra serie observamos expresión citoplasmática en el 85'93% de los ADP, sin relación significativa entre la expresión de dicha proteína y parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico, progresión o estado mutacional. Destacar en nuestros resultados una tendencia a la sobreexpresión a medida que aumenta el estadio ($p=0.319$), y en los pacientes que progresan ($p=0.461$).

A la hora de estudiar la correlación entre todas las proteínas mencionadas en este apartado y el estado mutacional, no observamos diferencias significativas en cuanto a expresión de las mismas y presencia o no de mutación de KRAS (pmTOR: $p=0.804$; 4E-BP1: $p=0.927$; p4E-BP1: $p=0.845$, eIF4E: $p=0.796$; peIF4E: $p=0.172$; pS6: $p=0.261$). Estos resultados pueden deberse al hecho de tener una representación tan pequeña de los casos wild type en nuestra serie (N=7 casos de 64), lo cual dificulta el estudio estadístico.

5.5.2. Vía RAS-MEK-ERK:

La vía MEK es una de las cascadas quinasa mejor caracterizada en la biología celular del cáncer. Se activa vía estimulación de diversos factores de crecimiento o por la activación de mutaciones de las principales proteínas oncogénicas, siendo RAS y RAF las más frecuentes. El estudio dirigido de estas quinastas ofrece la opción de nuevas terapias. Los inhibidores de MEK están actualmente en evaluación en ensayos clínicos y muchos han mostrado efectividad (Neuzillet C. et al., 2014). La inhibición farmacológica de componentes de la vía MAPK se ha perseguido como un medio para inhibir indirectamente efectores de RAS, cuya inhibición farmacológica sigue siendo un reto (Belden S. et al., 2012).

La desregulación de esta vía se observa con frecuencia en muchas neoplasias, y juega un papel principal en su carcinogénesis y mantenimiento. Collisson y colaboradores demostraron que la activación selectiva de la vía RAF-MEK-ERK en modelos con BRAF mutado en el páncreas murino induce el desarrollo de PanIN y ADP. En su modelo, la activación del oncogén derivó en un fenotipo más agresivo con más lesiones de PanIN en comparación con el modelo clásico KRAS G12D. Así, la activación de la vía MAPK canónica a nivel de RAF es suficiente para producir cambios neoplásicos en el páncreas (Collisson E.A. et al., 2012).

En nuestra serie observamos expresión citoplasmática de pMAPK en el 81'25% y nuclear en el 93'75% de los ADP. Identificamos una relación significativa entre la sobreexpresión citoplasmática y nuclear de pMAPK y la pancreatitis crónica de base ($p=0.005$ y $p=0.009$ respectivamente) y, coincidiendo con lo descrito en la literatura (Lyikesici M.S. et al., 2014) en nuestra serie observamos una correlación entre la expresión citoplasmática y nuclear en aquellos casos con invasión linfática ($p=0.0450$ y $p=0.049$ respectivamente). Con el resto de parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico no se observa

relación significativa. Sí destacar una tendencia a la sobreexpresión en los tumores que progresan ($p=0.466$).

En cuanto a la relación entre la expresión de pMAPK y estado mutacional, a diferencia de las proteínas estudiadas pertenecientes a la vía PI-3K/AKT/mTOR, observamos un aumento significativo de la expresión, tanto citoplasmática como nuclear, en los pacientes con mutación de KRAS en comparación con los wild type ($p=0.006$ y $p=0.004$ respectivamente). A la hora de buscar un punto de corte, con una sensibilidad y especificidad significativas, que nos pudiera predecir la presencia de mutación de KRAS, dicho punto de corte se establece, en el caso de pMAPK citoplasmático, en una expresión ≥ 5 , y en el caso de pMAPK nuclear, se establece en una expresión ≥ 20 . Ambos valores de expresión no son determinantes, teniendo en cuenta que dichos puntos de corte se incluyen dentro de la horquilla de expresión de los casos no mutados para RAS de nuestra serie.

5.5.3. Genes supresores de tumores p53, p16/ INK4:

Muchos autores han sugerido una posible asociación entre la patogénesis o la progresión de los ADP y la alteración de las proteínas del ciclo celular, en particular, los reguladores de la fase G1-S, tales como la p16INK4 (Schneider-Stock R, 2005), p27 (Pruneri G. et al., 2003), Ciclina D3 (Pruneri G et al., 2003) y p53 (Pauser U. et al., 2008).

La pérdida de la función de las mutaciones en p16 (INK4a) (CDKN2A) ocurre aproximadamente en el 80% de los ADP, contribuyendo a su progresión precoz. Los estudios de algunos autores (Heilmann AM et al., 2014) establecen que, actuando sobre ciertas vías en ADP con pérdida de la proteína p16 se consigue reprimir su crecimiento. A su vez, Georgiadou sostiene que la sobreexpresión de ciclina D1 y posiblemente la pérdida de p16 en ADP parecen ser factores de mal pronóstico. Por consiguiente, un aumento en la expresión de p16 se asocia a mejor supervivencia. (Georgiadou D. et al., 2014). La mayoría de los estudios han relacionado la pérdida de función de p16 con una menor supervivencia y mayor tamaño y frecuencia de las metástasis (Soto JL. et al., 2006; Garcea G et al., 2005). En nuestra serie observamos una expresión citoplasmática de p16 en el 15'62%, nuclear en el 17'18% y en el estroma en el 82'81% de los ADP. Cabe destacar una tendencia a la disminución de los niveles de expresión de proteína p16, tanto en citoplasma como en núcleo, en aquellos casos de ADP que progresan en comparación con los casos que no progresan, pero dicha diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.491$, $p=0.171$ respectivamente). Asimismo, observamos una tendencia a la disminución de la expresión citoplasmática y nuclear de p16 en los casos con mutación de KRAS respecto a los wild type ($p= 0.741$ y $p=0.538$ respectivamente).

En cuanto a la valoración de p16 en el estroma del ADP, coincidiendo con lo descrito por varios autores, Aboussekhra en su estudio en cultivos celulares de fibroblastos correspondientes a muestras de cáncer de mama, concluye que p16 inhibe los efectos pro-cancerígenos de los fibroblastos del estroma que

acompañan al cáncer de mama (Al-Ansari N.M et al., 2013). Yang, en un estudio en carcinomas escamosos de esófago inducido en ratones con delección del gen que codifica para el receptor de TGFbeta en fibroblastos, demuestra un aumento de la inflamación y del daño al epitelio neoplásico, con una pérdida asociada de p16, entre otros inhibidores de la ciclina-dependiente de kinasa, contribuyendo todo ello al desarrollo de carcinomas escamosos invasivos. En nuestra serie destaca un aumento en la expresión en el estroma en aquellos casos que progresan, sin llegar a una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.396$)

No obstante, no observamos correlación entre la expresión de p16 e inflamación asociada al tumor ($p=0.702$)

Por otro lado, Hingorani y Tuveson demostraron la expresión endógena concomitante de otro gen supresor (p53) y KRAS en el páncreas de ratones, y el posterior desarrollo cooperativo entre ambas de carcinoma invasivo y altamente metastásico (Hingorani S.R. et al., 2005). Guerra lo confirmó pocos años después, en sus modelos animales, observando que los ratones con expresión endógena de KRAS y pérdida funcional de p53 desarrollaban PanIN y ADP más agresivos, que provocaban la muerte del animal en los primeros 4-5 meses (Guerra C. et al., 2007), con unos resultados similares obtenidos en el contexto de ratones adultos con expresión del oncogen KRAS y sometidos a daño pancreático (Guerra C. et al., 2013). En nuestra serie observamos una expresión nuclear de p53 en el 40'62% de los ADP. A diferencia de lo descrito por dichos autores, en nuestra serie no demostramos una relación significativa entre la expresión de p53 y parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico, progresión o estado mutacional. Si destacar un aumento de los niveles de expresión en aquellos casos de ADP con invasión linfática, pero dicha diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.120$).

5.5.4. Transición epitelio-mesénquima (EMT) y cadherinas:

La transición epitelio-mesénquimal (EMT) es un proceso biológico que permite a las células epiteliales someterse a los cambios bioquímicos para adquirir un fenotipo mesénquimal que les aporta mayor capacidad migratoria, invasividad, elevada resistencia a la apoptosis, y aumento de la producción de componentes de la matriz extracelular (ECM) (Kalluri R. y Weinberg R.A., 2009). EMT se caracteriza por la pérdida de adhesión celular, aumento de la motilidad celular, disminución de la expresión de E-cadherina y la adquisición de marcadores mesénquimales, que incluyen la N-cadherina, la vimentina, y la fibronectina (Peinado H. et al, 2007; Thiery J.P. et al, 2009).

Se han descrito características de EMT en modelos de cáncer de mama (Trimboli A.J. et al, 2008), cáncer de ovario (Vergara D. et al., 2009), colon (Brabletz T. et al., 2005) y esófago (Usami Y. et al, 2008). Hebrok y colaboradores describieron que el oncogen KRAS induce diferenciación de las células acinares del componente regenerativo hacia estructuras ductal-like por mecanismo que implica una disminución de la expresión de beta-catenina (Heiser P.W. et al, 2008). Asimismo Xue Chen demuestra, en cultivo celular de células de ADP "knocked down" para beta catenina, una alteración de los marcadores relacionados

con la transición epitelio-mesénquim (TEM), con un aumento a su vez de N-cadherina y vimentina y una inhibición de la migración y capacidad de invasión de las células (Xue C. et al, 2015). En nuestra serie observamos una expresión de N-cadherina citoplasmática en el 100% de los casos, de membrana en el 50% y en el estroma tumoral en el 86% de los ADP. A diferencia de lo descrito por Hazan y colaboradores en cáncer de mama (Hulit J. et al, 2007), los cuales demuestran que la expresión *de novo* de N-cadherina en los ductos mamarios favorece la metástasis de neoplasias de mama vía activación de la vía de señalización MAPK/ERK, en nuestra serie no identificamos una relación significativa entre la expresión de N-cadherina citoplasmática y el desarrollo de metástasis. Si observamos, sin embargo, sobreexpresión en el estroma desmoplásico que acompaña al ADP en aquellos casos con progresión a metástasis hepáticas, pero dicha diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.123$). A la hora de valorar correlación entre la expresión de N-cadherina e inflamación y desmoplasia asociada al tumor, no encontramos correlación ($p=0.530$ y $p=0.539$, respectivamente)

Asimismo tampoco encontramos asociación significativa entre los parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico, progresión o estado mutacional. Si destacar una tendencia a la sobreexpresión citoplasmática de N-cadherina en aquellos casos de ADP de nuestra serie con invasión vascular ($p=0.259$).

5.5.5. Vía Hippo. YAP1.

La vía Hippo regula, y está regulada, por varias propiedades celulares vinculadas a la tumorigénesis, como son la proliferación celular, supervivencia celular, invasión tumoral y potencial metastásico, entre otros (Tapon N. et al., 2002; Huang J. et al., 2005). Está bien documentado que la vía Hippo se altera con mucha frecuencia en un gran número de neoplasias, incluyendo el cáncer de pulmón, colorrectal, de ovario, de hígado y de próstata (Dong J. et al., 2007; Steinhardt A.A. et al., 2008), y que a menudo se correlaciona con un mal pronóstico (Zhang X. et al., 2011; Hall C.A. et al., 2010; Xu M.Z. et al., 2009).

Muchos de los genes implicados en la vía de señalización Hippo son reconocidos como genes supresores tumorales, mientras que YAP/TAZ se identifican como un oncogen. De hecho, YAP se ha encontrado elevado en algunos cánceres humanos, incluyendo cáncer de mama, cáncer colorrectal, y cáncer de hígado (Kango-Singh M. et al., 2009; Zender L. et al., 2006; Steinhardt A.A. et al., 2008).

En nuestra serie observamos una expresión de YAP1 citoplásmico en el 62'18% y nuclear en el 90'62% de los ADP.

Coincidiendo con lo descrito por varios grupo de investigación, como Luk en el estudio de YAP en hepatocarcinomas (Xu M.Z. et al, 2009), Goode en carcinomas de ovario (Hall C.A. et al., 2010), Zhao en el estudio del carcinoma gástrico (Hu X. et al, 2014), o Lee en el estudio de cáncer colo-rectal (Lee KW. et al, 2014), en nuestra serie la sobreexpresión de YAP1 nuclear se comporta como un factor de mal pronóstico, ya que se asocia a progresión/ desarrollo de metástasis hepáticas ($p=0.028$). Calculamos un punto de corte que nos pudiese predecir la progresión hacia metástasis hepáticas, y dicho punto de corte

se establece en nuestra serie en una expresión nuclear mayor o igual a 60, con un VPP del 88%, sin ser un factor pronóstico independiente a mutación de KRAS y otras variables clínico-patológicas ($p=0.1968$).

Pero la mayoría de los estudios que apoyan este papel de la vía Hippo en el cáncer han sido muy recientes, y carecen de evidencias claras entre eventos de mutación en los genes de dicha vía y la etiología y/o progresión de los tumores. Aunque la existencia de mutaciones directas que afectan a la vía Hippo parecen ser poco frecuentes, se sabe que la actividad de la vía Hippo se altera debido a la interferencia con otras vías de señalización, que a menudo albergan mutaciones oncogénicas, en especial a nivel de las oncoproteínas YAP y TAZ. Se han descrito diversas interacciones funcionales de la vía Hippo con otras vías que con frecuencia están mutadas en diferentes cánceres humanos, como son las vías Wnt/beta-catenina, transformig growth factor-beta (TGFbeta)-bone morphogenic protein (BMP), Hedgehog (HH), Notch, IGFR-1 y mTOR (Konsavage W.M. Jr. et al., 2012; Wang Y. et al., 2013; Irvine K.D., 2012; White B.D. et al., 2012; Bellam N. y Pashe B., 2010;). Varios estudios sugieren que mutaciones somáticas en proteínas involucradas en estas vías de señalización causan hiperactivación de YAP y TAZ, aún en presencia de una red de la vía Hippo Wild Type. A pesar de todo, en la actualidad, los mecanismos que vinculan estas vías a la vía Hippo siguen siendo poco conocidos.

Asimismo, se describe la asociación entre la activación de YAP1 y una baja respuesta al tratamiento con Cetuximab en pacientes con cáncer colo-rectal (Lee K-W. et al, 2014). Sería importante describir biomarcadores predictivos para elaborar ensayos clínicos para terapias dirigidas sobre la vía Hippo.

5.6. SUPERVIVENCIAS:

La supervivencia global en nuestra serie es de 13.60 meses, con una tasa de supervivencia al año del diagnóstico del 62'03% y a los 5 años del 33'40%, mayor que la descrita en la literatura a los 5 años en aquellos pacientes con neoplasia resecable (20-25%) (Cáncer.net, revisión Oct del 2013; Lim J.E. et al., 2003; Conlon K.C. et al., 1996). La supervivencia libre de progresión en nuestra serie es de 13,40 meses.

Desde el punto de vista clínico, la mutación de KRAS ha sido relacionada con peor supervivencia (Kroorstra J.B.M. et al., 2008). En nuestra serie los casos WT muestran un tiempo medio de supervivencia global mayor que los casos con mutación de KRAS ($p=0.0233$), y lo mismo se repite con supervivencia libre de progresión ($p=0.0312$). En nuestra serie, si analizamos la influencia del tipo de mutación sobre la supervivencia global y libre de progresión, observamos que los casos WT muestra un tiempo medio de supervivencia global y libre de progresión mayor comparado con todos los tipos de mutaciones, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0.282$ para SG y $p=0.336$ para SLP).

En relación a la expresión de proteínas observamos que la sobreexpresión de YAP nuclear se asocia a peor supervivencia global, actuando como factor independiente a mutación de KRAS y otras variables clínico-patológicas ($p=0.0320$). El resto de proteínas estudiadas no muestra relación significativa.

En cuanto a parámetros clínico-patológicos en nuestra serie observamos que los ADPs localizados en cabeza tienen una ligera tendencia a presentar mayor supervivencia que los localizados en cuerpo y cola, con 13'60, 12'93 y 12'30 meses de tiempo mediana respectivamente, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas. Confirmamos que los ADPs localizados en cola muestran supervivencia menor, coincidiendo con lo descrito en la literatura (Orr R.K., 2010; Fernandez-Cruz L. et al., 2012).

Si analizamos la influencia del grado histológico sobre la supervivencia global a partir de curvas de Kaplan-Meier, observamos que los ADPs bien diferenciados tienen tendencia a presentar mayor supervivencia que los ADPs con diferenciación moderada o poco diferenciados, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0.1653$).

En relación a progresión, en nuestra serie observamos que los pacientes que progresan tienen una supervivencia global ligeramente mayor que los que no progresan, 13.60 vs 13.33 respectivamente y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p= 0.0103$). Este resultado, contrario a lo que cabría esperar, puede ser debido a la mayor representación en nuestra serie de pacientes que progresan (44 pacientes que progresan vs 19 pacientes que no progresan).

En cuanto a parámetros pronóstico establecido, varios grupos de investigación confirman, en estudios de series largas y en revisiones bibliográficas, que el estadio y la afectación del margen quirúrgico son los factores pronóstico más importantes en pacientes sometidos a cirugía (Benassai G. et al., 2000; Han H. y von Hoff D.D., 2013). En nuestra serie, el estadio tumoral se asocia a peor supervivencia global ($p=0.0014$) y la afectación del margen quirúrgico (R1) se asocia tanto a peor supervivencia global ($p=0.0000$) como a peor supervivencia libre de progresión. Y ambas actúan como factor pronóstico independiente. Otros factores pronóstico incluyen el tamaño tumoral, la afectación de vasos de gran calibre y el grado de diferenciación tumoral (Benassai G. et al., 2000; Gebhardt C. et al., 2000; Kuhlmann K.F. et al., 2004; Lim J.E .et al., 2003). Los resultados de nuestra serie confirman que a medida que aumenta el tamaño tumoral disminuye la supervivencia global ($p=0.0251$).

Otros indicadores de mal pronóstico descritos en la literatura en pacientes con carcinomas de páncreas resecados incluyen un índice mitótico elevado, la invasión perineural y la invasión vascular (Hruban R.H., 2007). Diversos estudios han evidenciado una correlación significativa entre la expresión de Ki67, el grado de malignidad y el pronóstico en diversos tumores (Ross W., 1995; Hall P.A., 1990). En nuestra serie se observa una asociación significativa entre Ki67 con el grado de diferenciación tumoral ($p=0.039$), sin evidenciarse asociación con otros parámetros con valor pronóstico, presencia de mutación de KRAS,

progresión o supervivencias. Con el resto de parámetros con valor pronóstico (invasión vascular, linfática o perineural), en nuestra serie no observamos una supervivencia global peor (invasión vascular ($p=0.553$), linfática ($p=0.510$) y perineural ($p=0.601$)) respecto a los que no la presentan. Lo mismo pasa cuando valoramos la supervivencia libre de progresión ($p=0.601$, $p=0.861$ y $p=0.826$ respectivamente).

La presencia de metástasis hepática es otro factor de mal pronóstico descrito en la literatura (Kim H.W. et al, 2015). En nuestra serie, el hecho de evidenciar metástasis hepáticas implica una supervivencia global mucho menor respecto a los pacientes que no presentan progresión o la presentan en otras localizaciones diferentes (local, pulmonar, ósea,...) ($p=0.0259$).

5.7. COMENTARIOS ADICIONALES:

Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el ADP es un tumor muy agresivo y áltamente metastatizante y, en la mayoría de pacientes, el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad. Incluso cuando el tumor se diagnostica en una etapa precoz y se realiza cirugía con intención curativa, sólo el 20% de los pacientes sobreviven a los 2 años. Por ello, es necesario avanzar en múltiples frentes para reducir la mortalidad por ADP. Entre ellos cabe destacar la identificación de factores de riesgo y la caracterización del proceso de progresión tumoral.

Asimismo, se sabe que el ADP es resistente a todos los tratamientos actuales, excepto a la cirugía en etapas tempranas de la enfermedad. El tratamiento estándar de primera línea utilizada es la Gemcitabina, que prolonga la supervivencia en pocas semanas (Li D. et al., 2004) y, en combinación con otros fármacos, tiene resultados modestos; la resistencia innata o adquirida del ADP a los fármacos sigue siendo el principal obstáculo para el éxito en su control (Adesso L. et al., 2013). Por ello, es necesario encontrar nuevas y más efectivas dianas terapéuticas para poder tratar esta enfermedad.

Las vías de señalización activadas por el oncogen KRAS son muy complejas y se caracterizan por la activación de varias vías efectoras, interconectadas entre sí a distintos niveles de activación y con existencia de circuitos de retroalimentación. El conocimiento profundo de los requerimientos genéticos para la iniciación y progresión del ADP, así como de estas interconexiones es esencial para la detección específica y el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas. El desarrollo de las mismas se necesita con urgencia para mejorar el mal pronóstico de los pacientes que sufren de cáncer impulsado por KRAS. En la última década ha aumentado el esfuerzo en caracterizar el EMT y el microambiente que rodea al ADP (Whatcott C. et al., 2013), con descripción de numerosos inductores de EMT en estudios de líneas celulares cancerígenas (TGF- β , Wnt, Snail/slug, Twist y Six 1) (Zavadil J. y Bottinger E. P., 2005; Huber M.A. et al., 2005; Savagner P. et al., 1997; Martinez-Alvarez C. et al., 2004), así como del microambiente inflamatorio, demostrando que contribuye a un compromiso de la respuesta inmune antitumoral a través de células T reguladoras de la inmunosupresión y de células supresoras derivadas de la médula

(Pilayeva-Gupta Y. et al., 2011, Steele et al., 2013). Asimismo, este estímulo inflamatorio activa, a su vez, células estrelladas y fibroblastos, que producen remodelación fibrótica del tejido pancreático que, a su vez promueve la activación de de las vías de señalización oncogénicas dependientes de KRAS, ya descrito en modelos murinos de Guerra y colaboradores (Guerra C. et al. ,2007) y por Pilayeva-Gupta (Pilayeva-Gupta Y. et al, 2011).

Como reflexión global, tiene gran importancia aportar información sobre parámetros clínico-patológicos y moleculares de los ADPs, con el fin de mejorar el conocimiento sobre su comportamiento biológico, necesario para describir nuevas dianas terapéuticas y desarrollar terapias dirigidas. Seguramente existan otros factores, todavía no descritos, que influyan en el comportamiento biológico de los ADPs. El grupo de tumores wild-type es especialmente interesante de cara a identificar otras eventuales alteraciones moleculares a parte de KRAS y NRAS, con incidencia en el curso evolutivo de los ADPs. La intención en un futuro es ampliar la serie para conseguir resultados significativos que permitan obtener más conclusiones.

CONCLUSIONES

1. En relación con los parámetros clínico-patológicos:

1.1. En nuestra serie se validan los criterios clínico-patológicos establecidos como factores con valor pronóstico: tamaño tumoral, margen quirúrgico afecto (R1), invasión vascular, invasión linfática, invasión perineural, metástasis hepáticas y estadios avanzados.

1.2. Los niveles de Ca19.9 en suero se correlacionan con grado de respuesta inflamatoria asociada al tumor ($p=0.021$), no así los niveles tisulares de Ca19.9 en ADP ($p=0.325$).

2. En relación al modelo de progresión PanIN-ADP:

2.1. Existe un aumento en la expresión de la gran mayoría de las proteínas estudiadas desde la proliferación ductal reactiva en pancreatitis crónica (PC) a la expresión en el ADP.

2.2 El valor de $Ki67 \geq 20\%$ puede ser un biomarcador que ayude a la hora de discernir entre proliferación ductal reactiva / metaplasia acinar ductal (MAD) o ADP bien diferenciado en las biopsias pequeñas o en los márgenes quirúrgicos de piezas de resección ($p=0.000$).

3. En relación al estudio genético de RAS:

3.1 En nuestra serie ningún caso presenta mutación para NRAS, y el 89% de los ADP presentan mutaciones de KRAS.

3.2 La presencia de mutación de KRAS se asocia a menor supervivencia global ($p=0.0233$) y disminución del tiempo libre de progresión ($p=0.031$).

4. En relación con los factores de señalización celular en ADP:

4.1. La sobreexpresión nuclear de p4E-BP1 se asocia a invasión linfática ($p=0.003$).

4.2. La sobreexpresión citoplasmática de eIF4E se asocia a invasión perineural ($p=0.039$).

4.3. La sobreexpresión de YAP1 nuclear se asocia a mayor incidencia de metástasis hepáticas metacrónicas y a menor supervivencia global, con significación estadística en el estudio multivariante, como factor independiente ($p=0.0322$).

4.4. La sobreexpresión de YAP1 nuclear, eIF4E citoplasmático y p4E-BP1 nuclear definen un subgrupo de ADP de peor pronóstico

4.5. No existe relación significativa entre la expresión de las proteínas estudiadas, implicadas en las vías de señalización, con los parámetros clínico-patológicos relacionados con estroma peritumoral (p16, desmoplasia, inflamación).

RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL

El adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) constituye aproximadamente el 85% de los tumores del páncreas. Es el tumor en el que menos avances clínicos se han producido en los últimos 50 años y sigue teniendo un pronóstico muy malo. Por ello, es necesaria la identificación de factores de riesgo y la caracterización del proceso de progresión tumoral, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

En esta Tesis Doctoral estudiamos el estado de las vías de señalización celular en una serie de ADP convencionales, así como en ductos de pancreatitis crónicas (PC) y las lesiones precursoras asociadas (PanIN). El objetivo principal del presente trabajo es el estudio inmunohistoquímico y molecular de diversos factores implicados en las vías de señalización celular y de transición epitelio-mesénquima (PI-3K-AKT-mTOR, Ras-Raf-MAPK, Hippo, p53, N-cadherina y p16), con el objetivo de poder definir un modelo de progresión desde lesiones de PanIN en PC a ADP infiltrante, así como demostrar la relación de los niveles de expresión de dichos factores con una serie de parámetros clínico-patológicos con valor pronóstico, estado mutacional y supervivencias, en el ADP.

Los resultados del estudio de nuestra serie validan, por una parte, los criterios establecidos como factores con valor pronóstico: tamaño tumoral, margen quirúrgico afecto (R1), invasión vascular, invasión linfática, invasión perineural, metástasi hepáticas y estadios avanzados. En relación al modelo de progresión PanIN-ADP, demostramos que existe un aumento en la expresión de la gran mayoría de proteínas estudiadas desde su expresión en ductos de PC y la expresión en ADP. Asimismo, proponemos un valor de Ki67 \geq a 20% como biomarcador útil a la hora de discernir entre proliferación ductular reactiva o ADP bien diferenciado en las biopsias pequeñas o en los márgenes quirúrgicos de piezas de resección. En relación al estudio genético de RAS, confirmamos que ningún caso presenta mutación para NRAS, a diferencia del 89% de los ADP, que presentan mutaciones de KRAS, y que la presencia de dicha mutación implica peor pronóstico. En cuanto a los factores de señalización celular en ADP, se confirma que la expresión de algunas proteínas (p4E-BP1, eIF4E y YAP1) se asocia a factores de mal pronóstico y peor supervivencia. No evidenciamos en el estudio relación significativa entre la expresión de las proteínas estudiadas con parámetros clínico-patológicos relacionados con estroma peritumoral (p16, desmoplasia, inflamación).

Nuestros resultados concluyen que el estudio de los factores de las vías de señalización celular complementan el estudio anatomopatológico de los ADP. La determinación de Ki67 con un valor superior a 20% permite discernir entre una proliferación ductular reactiva/metaplasia acinar ductal y ADP bien diferenciado y lo proponemos como marcador a la hora de valorar margen quirúrgico de piezas de resección y biopsias pequeñas. La sobreexpresión de YAP1 nuclear, eIF4E citoplasmático y p4E-BP1 nuclear definen un perfil molecular de ADP de peor pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Aichler M, Seiler C, Tost M, et al. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*. 2012 Apr;226(5):723-34.
- Adesso L, Calabretta S, Barbagallo F, et al. Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway. *Oncogene* 2013;32:2848-2857.
- Adsay NV, Bandyopadhyay S, Basturk O, et al. Chronic pancreatitis or pancreatic ductal adenocarcinoma?. *Semin Diagn Pathol*. 2004;21:268-76.
- Ahlgren JD. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol* .1996;23:241-50
- Alguacil J, Kauppinen T, Porta M, et al. Risk of pancreatic cancer and occupational exposures in Spain. PANKRAS II Study group. *Ann Ocup Hyg*. 2000;44(5): 391-403.
- 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 Jan;270(1):248-60.
- Al-Ansari MM, Hendrayani SF, Shehata AI, Aboussekhra A. p16(INK4A) represses the paracrine tumor-promoting effects of breast stromal fibroblasts. *Oncogene*. 2013 May 2;32(18):2356-64.
- Altmann M, Handschin C, Trachsel H. mRNA cap-binding protein: cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987;7(3):998-1003.
- Andea A, Sarkar F, Adsay NV. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2003; 16:996-1006.
- Ansieau, S. EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Lett*. 2013 Sept;338 (1): 63-8.
- Antonetti DA, Kimball SR, Horetsky RL, Jefferson LS. Regulation of rDNA transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1993; 268(34):25277-84.
- Armengol G, Rojo F, Castellví Jet al. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7551-5.

B

- Badouel C, Garg A, McNeill H. Herding Hippos: Regulating growth in flies and man. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21 (6): 837–43
- Bao Y, Spiegelman D, Li R, et al. History of peptic ulcer and pancreatic cancer risk in men. *Gastroenterology* 2010;138:541-549.

- Bardeesy N, KH Cheng, JH Berger, et al. Smad4 is dispensable for normal páncreas development yet critical in progression and tumor biology of páncreas cáncer. *Genes Dev.* 2005; 20:3130-3146.
- Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, et al. Both p16 (Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:5947-5952
- Barton JG, Bois JP, Sarr MG, et al. Predictive and prognostic value of CA 19-9 in resected pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2009 Nov;13(11):2050-8.
- Belden S, Flaherty KT. MEK and RAF inhibitors for BRAF-mutated cancer. *Expert Rev Mol Med.* 2012. Oct 12;14.
- Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res.* 2010;155:85-103.
- Benassai G, Mastroiilli M, Quarto G, et al. Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *J Surg Oncol.* 2000 Apr;73(4):212-8.
- Benavente S, Vergés R, Hermosilla E, et al. Overexpression of phosphorylated 4E-BP1 predicts for tumor recurrence and reduced survival in cervical carcinoma treated with postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Dec 1;75(5):1316-22.
- Bonifazi M, Gallus S, Bosetti C, et al. Aspirin use and pancreatic cancer risk. *Eur J Cancer Prev.* 2010 Sep;19(5):352-4.
- Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol.* 2006;19:238-45.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(7):495-507.
- Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1-2):56-65.
- Bradley MC, Hughes CM, Cantwell MM, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Br J Cancer.* 2010 Apr 27;102(9):1415-21.
- Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, et al. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut* 2007; 56:1460-1469.
- Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, et al. Progression of pancreatic intraductal neoplasia to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:163-9.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(11):657-64.

- Browning KS, Gallie DR, Hershey JW, et al. Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(5):284.

- Burris HA, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997;15:2403-2413.

C

- Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, et al. Yap1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol.* 2007;17, 2054-2060.

- Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreatoduodenectomies. *Ann Surg.* 2006;244:10-15.

- Carney CP, Jones L, Woolson RF, et al. Relationship between depression and pancreatic cancer in the general population. *Psychosom Med.* 2003;65:884-8.

- Castellvi J, Garcia A, Rojo F, et al. Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer.* 2006 Oct 15;107(8):1801-11.

- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, et al. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* 2005;129 (2):504-511.

- Chian R, Young S, Danilkovitch-Miagkova A, et al. Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant. *Blood* 2001;98(5):1365-73.

- Collisson EA¹, Trejo CL, Silva JM et al. A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2012 Aug;2(8):685-93. Epub 2012 May 24.

- Conde E, Angulo B, Tang Met al. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12 (3 Pt 1):710-7.

- Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg.* 1996 Mar;223(3):273-9.

- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011; 364:1817.

- Cordensoni M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cell. *Cell* 2011;147, 759-772.

- Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol.* 2005;23(23):5357-64.

- Coughlin SS, Calle EE, Patel AV, Thun MJ. Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes Control* 2000 Dec;11(10):915-23.
- Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Pancreas cancer. I. Duct adenocarcinoma. A clinical-pathologic study of 380 patients. *Pathol Annu.* 1978;13 (Pt.1):241-89.
- Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Classification of pancreatic cancer (nonendocrine). *Mayo Clin Proc.* 1979;54:449-458.

D

- Delogu S, Wang C, Cigliano A, et al. SKP2 cooperates with N-Ras or AKT to induce liver tumor development in mice. *Oncotarget.* 2015 Feb 10;6(4):2222-34.
- Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(1):49-54.
- Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, et al. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 2001;294(5544):1102-5.
- Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a universal universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* 2007;130, 1120-1133.
- Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, et al. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:297-306.
- De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004 Apr 19;23(18):3189-99.

E

- Eagle H, Levine, EM. Growth Regulatory Effects of Cellular Interaction. *Nature* 1967;213 (5081): 1102-6.
- Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer: a metaanalysis. *JAMA.* 1995;273:1605-1609.
- Ewen ME. The cell cycle en the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev.* 1994;13:45-66.

F

- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, et al. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 2001;294(5548):1942-5.
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:453-81.

- Fernández-Cruz L, Sabater L, Fabregat J, Boggi U. Complicaciones después de una pancreaticoduodenotomía. *Cirugía Española* 2012; 90(4): 222-232.
- Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Toll A, et al. mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pelf4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. *J Urol.* 2013 Dec;190(6):2288-95.
- Fukushima N, Sato N, Ueki T, et al. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2001; 160:1573-81.
- Fundación AECC. El cancer de páncreas en cifras. Octubre 2007.

G

- Gangi S, Fletcher JC, Nathan MA, et al. Time interval between abnormalities seen in CT and the clinical diagnosis of pancreatic cancer: retrospective review of CT scan obtained before diagnosis. *AJR Am Roentgenol.* 2004;182:897-903.
- Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, et al. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 2005;41:2213-36.
- Gebhardt C, Meyer W, Reichel M, Wunsch PH. Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch Surg.* 2000 Jan;385(1):14-20.
- Kerekatte V, Smiley K, Hu B, et al. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int J Cancer.* 1995 Feb 20;64(1):27-31.
- Georgiadou D, Sergentanis TN, Sakellariou S et al. Cyclin D1, p16(INK) (4A) and p27(Kip1) in pancreatic adenocarcinoma: assessing prognostic implications through quantitative image analysis. *APMIS.* 2014 Dec;122(12):1230-9.
- Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 2007;56:1134-52.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-63.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 2001;15(7):807-26.
- Goggins M. Identifying molecular markers for the early detection of pancreatic neoplasia. *Semin Oncol.* 2007;34(4):303-310.
- González Sastre F, Guinovart JJ. *Patología Molecular.* 1ª Edición. Barcelona: Masson, S.A.; 2003.
- Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells; role of cyclins, cyclin-dependent Kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin dependent inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995; 11: 211-219.

- Grote T, Logsdon CD. Progress on molecular markers of pancreatic cancer. *CD Curr Opin Gastroenterol* . 2007 Sep;23(5):508-14.
- Guan KL, Jenkins CW, Li Y, et al. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 1994;8(24):2939-52
- Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007 Mar;11(3):291-302.
- Guerra C, Barbacid M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Oncology* 2013;7:232-247.

H

- Halder G, Johnson RL. Hippo signalling: growth control and beyond. *Development* 2011;138, 9-22.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996, 271(5247):350–353.
- Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol.* 1990; 43(3):184-92
- Hall PA, Ray A, Lemoine NR, et al. p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. *Lancet* 1991;338:513.
- Hall CA, Wang R, Miao J, et al. Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene. *Cancer Res.* 2010;70, 8517-8525.
- Haller F, Gunawan B, von Heydebreck A, et al. Prognostic role of E2F1 and members of the CDKN2A network in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6589-97.
- Hamidi H, Lu M, Chau K, et al. KRAS mutational subtype and copy number predict in vitro response of human pancreatic cell lines to MEK inhibition. *Br J Cancer* 2014 Oct;111(9):1788-801.
- Han H, Von Hoff DD. SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer Cell.* 2013 Mar 18;23(3):424-424.e1.
- Hanahan, D, Weinberg, RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100 (1): 57–70.
- Harter PN, Jennewein L, Baumgarten P, et al. Immunohistochemical Assessment of Phosphorylated mTORC1-Pathway Proteins in Human Brain Tumors. *PLoS One.* 2015 May 19;10(5):e0127123.
- Hartwig W, Werner J, Jäger D, et al. Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* 2013 Oct;14(11):e476-85.
- Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway- an emerging tumor-supressor network. *Nature Rev. Cancer* 2007;7:182-191.

- Haugk B. Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer?. *Histopathology* 2010; 57 (4):503-14.
- Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun.* 1997;4(6): 399-411.
- Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signalling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 2011;332, 458-461.
- Heilman AM, Perera RM, Ecker V, et al. CDK4/6 and IGF1 receptor inhibitors synergize to suppress the growth of p16INK4A-deficient pancreatic cancers. *Cancer Res.* 2014;74(14):3947-58.
- Heinmöller E, Dietmaier W, Zirngibl H, et al. Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 2000;157(1):83-92
- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* 2003a;21(23):4342-9
- Heiser PW, Cano DA, Landsman L, et al. Stabilization of beta-catenin induces pancreas tumor formation. *Gastroenterology.* 2008 Oct;135(4):1288-300.
- Herbert TP, Tee AR, Proud CG. The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11591-6.
- Hernández-Muñoz I, Skoudy A, Real FX, Navarro P. Pancreatic ductal adenocarcinoma: cellular origin, signaling pathways and stroma contribution. *Pancreatology* 2008;8(4-5):462-9.
- Hershey JWB, Miyamoto S. Translational control of gene expression, In: Sonnenberg N, Hershey JWB, Mathews MB (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York pp 637-654. 2000.
- Hidalgo M, 2010. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.*2010;362:1605-1617.
- Hingorani SR, EF Petricoin, A Maitra, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4: 437-450.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, et al. Trp53 r172h and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469-483.
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, et al. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol.* 1995;15(5):2672-81
- HiramaT, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; 86:841-854.

- Howard JM, Hess W. History of the pancreas: mysteries of a hidden organ. Science and technology. New York: Kluwer Academy/Plenum publisher; 2010.
- Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *An J Pathol.* 1993;143 (2):545-554.
- Hruban RH., Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol.* 2000: 156, 1821-1825.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons JL, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:2969-72.
- 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;25:579-86.
- Hruban RH, Takaoro K, Klimstra DS, et al. An illustrated consensus of the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28:977-987.
- Hruban RH, Bishop M, Klimstra DS. AFIP atlas of Tumor Pathology, 4th Series, Fascicle 6. Washington DC: American Registre of Pathology; 2007.
- Huang J, Wu S, Barrera J, et al. The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* 2005;122 (3): 421–34.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct;17(5):548-58.
- Hult J, Suyama K, Chung S, et al. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 2007; 67(7): 3106-16.

I

- Iodice S, Gandini S, Maissonneuve P, et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arc Surg.* 2008;393(4):535-545.
- Ippeita D, Watanabe, NM, Kusumi, A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends in Cell Biology* 2001;11 (5): 220–30.
- Irvine KD. Integration of intercellular signalling through the Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23, 812-817.

J

- Japanese Pancreas Society. Classification of pancreatic carcinoma, 2nd English ed. Tokyo: Kanehara & Co; 2003.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:8-106-30.

- Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321:1801-1806.

K

- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8.

- Kango-Singh M, Singh A. Regulation of organ size: Insights from the *Drosophila* Hippo signaling pathway. *Developmental Dynamics* 2009;238 (7): 1627–37.

- Kapoor A, Wantong Y, Haoqiang Y, et al. YAP1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell* 2014; 158:185-197

- Katz MH, Pisters PW, Evans DB, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: The Importance of this emerging stage of disease. *J Am Coll Surg*. 2008;206(5):833-846

- Keith W, Evans TR, Glasspool RM. Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality. *J Pathol*. 2001;195(4):404-14.

- Keppke AL, Miller FH. Magnetic resonance imaging of the pancreas: the future is now. *Semin Ultrasound CT MR*. 2005 Jun;26(3):132-52.

- Kern SE, Hruban RH. Molecular biology of pancreas cancer. In: Principles and Practice of Oncology, 8th EDs: De Vita VT, Lawrence TS and Rosenberg SA. Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia (USA), 2008: 1078-86.

- Kim HW, Lee JC, Paik KH, et. Initial Metastatic Site as a Prognostic Factor in Patients With Stage IV Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Medicine*. 2015 Jun;94(25):e1012.

- Kimball SR, Shantz LM, Horetsky RL, Jefferson LS. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11647-52

- Kitamura Y, Go S. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood* 1979;53 (3):492-7.

- Klein WM, Hruban RH, J P Klein-Szanto A, E Wilentz R. Direct Correlation between Proliferative Activity and Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN): Additional Evidence for a Recently Proposed Model of Progression. *Mod Pathol*. 2002;15(4):441–447

- Klimstra DS, Hameed MR, Marrero AM, et al. Ductal proliferative lesions associated with infiltrating ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Int J Pancreatol*. 1994;16:224-5.

- Konsavage WM Jr, Killer SR, Rennoll SA, et al. Wnt/beta-catenin signalling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem*. 2012;287:11730-11739.

- Koopman J, Fedarko NS, Jain A, et al. Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:487-91.
- Kopp JL, von Figura G, Mayes E, et al. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012 Dec 11;22(6):737-50.
- Klöppel G, Lingenthal G, von Bülow M, Kern HF. Histological and fine structural features of pancreatic ductal adenocarcinomas in relation to growth and prognosis: studies in xenografted tumours and clinico-histopathological correlation in a series of 75 cases. *Histopathology* 1985 Aug;9(8):841-56.
- Köppel H, Solcia E, Longnecker DS. Histological typing of tumors of the exocrine pancreas. International classification of tumors; 2nd ed Berlin:Springer 1996.
- Kremer CL, Klein RR, Mendelson J, et al. Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *Prostate*. 2006 Aug 1;66(11):1203-12.
- Krishnan S, Rana V, Janjan NA, et al. Induction chemotherapy selects patients with locally advanced, unresectable pancreatic cancer for optimal benefit from consolidative chemoradiation therapy. *Cancer* 2007;110(1):47.
- Kroorstra JBM, Hustinx SR, Offerhaus GJ. Pancreatic Carcinogenesis. *Pancreatology* 2008;8:110-125.
- Krystal GW. Receptor tyrosine kinase mutations: molecular indicators for therapeutic response or signposts marking important signaling pathways?. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(12):1417-8.
- Kuhlmann KF, de Castro SM, Wesseling JG, et al. Surgical treatment of pancreatic adenocarcinoma; actual survival and prognostic factors in 343 patients. *Eur J Cancer* 2004 Mar;40(4):549-58.

L

- Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*. 1990 Jun 7;345(6275):544-7.
- Lee KW, Lee SS, Kim SB, et al. Significant association of oncogene YAP1 with poor prognosis and cetuximab resistance in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2015 Jan 15;21(2):357-64.
- Lee MJ, Lee HS, Kim WH, et al. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol*. 2003; 16: 403-10.
- Leopold, PL, Vincent J, Wang H. A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization. *Semin Cancer Biol*. 2012 Oct; 22(5-6): 471-83.
- Li BD, McDonald JC, Massar R, et al. Clinical outcome in stage I to III breast carcinoma and eIF4E overexpression. *Ann Surg*. 1998;227:756-61.

- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004;363:1049-57,
- Li L, Ittmann MM, Ayala G, et al. The emerging role of the PI3-K-Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2005;8:108-18.
- Lian I, Youngmok K, Hideki O, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2010;24:1106-1118.
- Lim JE, Chien MW, Earle CC. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg*. 2003;Jan;237(1):74-85.
- Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Frequency of K-Ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005;7:7-23.
- Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Oct;31(10):1053-74.
- Lowe SW, Sherr CJ Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(1):77-83.
- Lowenfels AB, Maissonneuve P, Cavallini G, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 1993;328 (20):1433-1437.
- Lowenfels AB, Maissonneuve P, DiMagna EP, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Nat Cancer Inst*. 1997;89:442-446.
- Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol*. 1996;16(12):6917-25.
- Lüttges J, Stigge C, Pacena M, Klöppel G. Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years. *Cancer* 2004 Jan 1;100(1):173-82.
- Iyikesici MS, Basaran G, Dane F, et al. Associations between clinicopathological prognostic factors and pAkt, pMAPK and topoisomerase II expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2014 May 15;7(5):1459-64. eCollection 2014.
- Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol*. 2009;170:403-413.

M

- Ma J, Benz C, Grimaldi R, et al. Nuclear DBF-2-related Kinases Are Essential Regulators of Cytokinesis in Bloodstream Stage *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285 (20): 15356–68.

- Maissonneuve P, Lowenfels AB, Bueno de Mesquita HB, et al. Past medical history and pancreatic cancer risk: results from a multicenter case-control study. *Ann Epidemiol.*2010;20 (2):92-98.
- Maitra A, Leach SD. Disputed paternity: the uncertain ancestry of pancreatic ductal neoplasia. *Cancer cell* 2012;22: 701-703.
- Maitra A, Ashfaq R, Gunn CR, et al. Coclooxigenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging. *Am J Clin Pathol* .2002;118:194-201.
- Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006; 20:211-26.
- Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, et al. eIF4E-from translation to transformation *Oncogene* 2004; 23:3172–3179.
- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer.*Oncogene.* 2006 Oct 16;25(48):6416-22.
- MarcheseR, Muleti A, Pasqualetto P, et al. Low correspondence between K-ras mutations in pancreatic cancer tissue and detection of K-ras mutation in circulating DNA. *Pancreas* 2006; 32 (2):171-177.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell.*1999;3 (6):707-16.
- Martín ME, Pérez MI, Redondo C, et al. 4E binding protein 1 expression is inversely correlated to the progression of gastrointestinal cancers. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 Jun;32(6):633-42.
- Martin RF, Zuberi KA. The evidence for technical considerations in pancreatic resections for malignancy. *Surg Clin N Am.*2010;90:265-285.
- Martinez A, Sesé M, Hernandez Losa J, et al. Phosphorilation of eIF4E confers resistance to cellular stress and DNA-damaging agents through an interaction with 4E-T: a rationale for novel therapeutic approaches. *Plos One* 2015, Apr; 29:1-22
- Martínez-Alvarez C, Blanco MJ, Pérez R, et al. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev Biol.* 2004 Jan 1;265(1):207-18.
- Matsuno S, Egawa S, Fukuyama S, et al. Pancreatic Cancer Registry in Japan: 20 years of experience. *Pancreas* 2004 Apr;28(3):219-30.
- Mauro MJ, Druker BJ. STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2001;3(3):223-7.
- McClaine JR, Lowy AM, Sussman JJ, et al. Neoadjuvant therapy may lead to successful surgical resection and improved survival in patients with borderline resectable pancreatic cancer. *HBP (Oxford).* 2010;12(1):73-79.

- McClelland RA, Finlay P, Walker KJ, et al. Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer Res.* 1990; 50(12):3545-50
- McDonald JM, Pelloski CE, Ledoux A, et al. Elevated phospho-S6 expression is associated with metastasis in adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 1;14(23):7832-7.
- Merchant NB, Colon KC, Saigo P, et al. Positive peritoneal cytology predicts unresectability of pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg.* 1999;188:421-6.
- Meric F, Hunt KK. Translation initiation in cancer: a novel target for therapy. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(11):971-9.
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010 Jun, 15(2): 117-34.
- Michaud DS, Giovannucco E, Willet WC, et al. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA.* 2001;286:921-929.
- Miron M, Verdú J, Lachance PE, et al. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2001;3(6):596-601.
- Misek DE, Patwa TH, Lubman DM, Simeone DM. *J Natl Compr Canc Netw.* 2007 Nov;5(10):1034-41.
- Moore MJ, Godstein D, Hamm 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. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:1960-6.
- Morris JP 4th, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2010 Oct;10(10):683-95.
- Mössner J. What is the epidemiologic impact of pancreatic cancer?. *Clinical Pancreatology for Practising Gastroenterologists and Surgeons.* JE Dominguez-Muñoz. Chapter 41:331-350.
- Mukada T, Yamada S. Dysplasia and carcinoma in situ of the exocrine pancreas. *Tohoku J Exp Med.* 1982;137:115-24.
- Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1998;4(2):271-5.

N

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines (www.nccn.org)
- Navas C, Hernández-Porras I, Schumacher AJ, et al. EGF Receptor signaling is essential for K-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 22(3):318-330
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma. Version 2. 2010.

- Neglia JP, FitzSimmons SC, Maisonneuve P, et al. The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *N Engl J Med*. 1995 Feb 23;332(8):494-9.

- Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. European Study Group for Pancreatic Cancer. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *Med*. 2004 Mar 18;350(12):1200-10.

- Neuhaus P. CONKO-001: Final results of the randomized, prospective, multicenter phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients with resected pancreatic cancer (abstract). *JCO* 2008:1009s

- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, et al. MEK in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2014, feb;142 (2): 16-71.

- Newill VA. Distribution of cancer mortality among ethnic subgroups of the white population of New York City, 1953-58. *J Natl Cancer Inst*. 1961 Feb;26:405-17.

- Nieman M, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol*. 1999;147(3): 631-44.

- Nolo R, Morrison, CM, Tao C, et al. MicroRNA is a Target of the Hippo Tumor-Suppressor Pathway. *Current Biology* 2006;16 (19): 1895-904.

- Nonomura A, Kiono N, Mizukami Y, et al. Duct-acinar-duct cell tumor of the pancreas. *Ultrastructural Pathol*. 1992;16:317-29.

- Norton ID, Petersen BT, Miller IJ, et al. Frequency of familial history of pancreatic malignancy in patients with pancreatic malignancy. *Pancreas* 1998;17:451.

O

- O'Brien P, Kapusta L, Dardick I, et al. Multiple familial gastrointestinal autonomic nerve tumors and small intestinal neuronal dysplasia. *Am J Surg Pathol*. 1999;23(2):198-204.

- Ohlund D, Lundin C, Ardnor B, et al. Type IV collagen is a tumor stroma-derived biomarker for pancreas cancer. *Br J Cancer* 2009 Jul 7;101(1):91-7.

- Okenga J, Vogel A, Teich N, et al. UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphism increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2003;124:1802-1808.

- Okusata T, Okada S, Ueno H, et al. Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings. *Pancreas* 2000;22:279-284

- Orr RK. Outcomes in pancreatic cancer surgery. *Surg Clin N Am*. 2010;90: 219-234.

P

- Pallares J, Bussaglia E, Martinez-Guitarte JL, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Mod Pathol*.2005;18:719-27.
- Park DI, Lee JK, Kim JE, et al. The analysis of resectability and survival in pancreatic cancer patients with vascular invasion. *J Clin Gastroenterol*.2001;32:231-4.
- Paspulati RM. Multidetector CT of the pancreas. *Radiol Clin North Am*. 2005 Nov;43(6):999-1020, viii.
- Pauser U, Schmedt Auf der Günne N, Klöppel G, et al. P 53 expression is significantly correlated with high risk of malignancy and epithelioid differentiation in GISTs. An immunohistochemical study of 104 cases. *BMC Cancer*. 2008 Jul 23;8:204.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer* 2007;7(6): 415-28.
- Pertschuk LP, Eisenberg KB, Carter AC, Feldman JG. Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. Correlation with biochemistry and clinical endocrine response. *Cancer* 1985; 55(7):1513-8.
- Pinho AV, Chantrill L, Rooman I. Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2014;345:203-209.
- Pons B, Armengol G, Livingstone M, et al. Association between LRRK2 and 4E-BP1 protein levels in normal and malignant cells. *Oncol Rep*. 2012 Jan;27(1):225-31.
- Porta M, Malats N, Guarner L, et al. Association between coffee drinking and K-Ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *J Epidemiol Community Health* 1999;53 (11):702-709.
- Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N, et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedge-hog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res*.2005;65:1619-26.
- Pruneri G, Mazzarol G, Fabris S, et al. Cyclin D3 immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors is independent of cyclin D3 gene amplification and is associated with nuclear p27 accumulation. *Mod Pathol*. 2003 Sep;16(9):886-92.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011 Oct 13;11(11):761-74.

Q

- Qiao JG, Zhang YQ, Yin YC, Tan Z. Expression of surviving in pancreatic cancer and its correlation to expression of bcl-2. *World J Gastroenterol*.2004; 10: 2759-61

R

- Raderer M, Wrba F, Kornek G, et al. Association between Helicobacter pylori infection and pancreatic cancer. *Oncology* 1998;55(1):16-19.
 - Rapp K, Schroeder J, Klerk J, et al. Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145.000 adults in Austria. *Br J Cancer* 2005;93:1062-1067.
 - Ricci R, Arena V, Castri F, et al. Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(1):35-43.
 - Riemenschneider MJ, Betensky RA, Pasedag SM, Lous DN. AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signalling. *Cancer Res.* 2006;66:5618-23.
 - Rizk MK, Gerke H. Utility of endoscopic ultrasound in pancreatitis: a review. *World J Gastroenterol.* 2007 Dec 21;13(47):6321-6.
 - Robinson BS, Huang J, Hong Y, Moberg KH. Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signalling in Drosophila via the FERM-domain protein expanded. *Curr. Biol.* 2010;20:582-590 .
 - Rode J, Dhillon AP, Doran JF, et al. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 1985;9(2):147-58.
 - Roder JD, Thorban S, Pantel K, Stiewert JR. Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer. *World J Surg.* 2003;23:888-91.
 - Rong L, Livingstone M, Sukarieh R, et al. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA.* 2008 Jul;14(7):1318-27.
 - Ross W, Hall PA. Ki67: from antibody to molecule to understanding?. *Clin Mol Pathol.* 1995; 48(3):M113-M117.
 - Rosty C, Ueki T, Argani P, et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol.* 2002;160: 45-50.
 - Rugstgi AK. The molecular pathogenesis of pancreatic cancer: clarifying a complex circuitry. *Genes Dev.* 2006;20:3049-53.
 - Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(1):94-1001.
 - Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet.* 1979;20:357-459. Review.
- S**
- Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16INK4A expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2004;17(11):1364-71.

- Saucedo LJ, Edgar BA. Filling out the Hippo pathway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8 (8): 613–21.
- Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol.*2010. Oct; 21 Suppl 7: vii89-92.
- Scheper GC, Morrice NA, Kleijn M, Proud CG. The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(3):743-54.
- Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, et al. Yap1 acts downstream of alfa-catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 2011;144: 782-795.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123(3):513-22.
- Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, et al. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2003;21(9):1688-97.
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;12: 937-943.
- Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 731-737.
- Shian W, Huang J, Dong J, Pan D. Hippo Encodes a Ste-20 Family Protein Kinase that Restricts Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003;114 (4): 445–56
- Shimada A, Kimura S, Abe K, et al. Immunocytochemical staining of estrogen receptor in paraffin sections of human breast cancer by use of monoclonal antibody: comparison with that in frozen sections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(14):4803-7.
- Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, et al. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans?. *Epidemiology* 2003, Jan;14 (1):45-54.
- Soto JL, Barbera VM, Saceda M, et al. Molecular biology of exocrine pancreatic cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2006; 8(5):306-12.
- Stauffer JK, Scarzello AJ, Jiang Q, Wiltrott RH. Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver: a unique neighborhood for novel intersections. *Hepatology* 2012;56:1567-1754.
- Steinhardt, AA, Gayyed MF, Klein AP, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human Pathology* 2008;39 (11): 1582–9
- Stelow EB, Adams RB, Moskaluk CA. The prevalence of pancreatic intraepithelial neoplasia in pancreata with uncommon types of primary neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:36-41.

- Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, et al. Pancreatic Cancer Meta-analysis Group. Meta-analysis of randomized adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2005;92(8):1372.
- Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, et al. Helicobacter pylori seropositive as a risk for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(12):937-941.
- Swierczynski SL, Maitra A, Abraham SC, et al. Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol.* 2004; 35: 357-66.

T

- Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993, 5(5): 806-11.
- Tamm EP, Bhosale PR, Lee JH. Pancreatic ductal adenocarcinoma: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging features. *Semin Ultrasound CT MR.* 2007 Oct;28(5):330-8.
- Tapon N, Harvey KF, Bell DW, et al. Salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 2002;110:467-478.
- Tascilar M, Offerhaus GJ, Altink R, et al. Immunohistochemical labeling for the Dpc4 gene product is a specific marker for adenocarcinoma in biopsy specimens of the pancreas and bile duct. *Am J Clin Pathol.* 2001 Dec;116(6):831-7.
- Tascilar M, van Rees BP, Sturm PD, et al. Pancreatic cancer after remote peptic ulcer surgery. *J Clin Pathol.* 2002;55(5):340-345.
- Teich N, Mössner J. Hereditary chronic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2008;22(1):115-30. doi: 10.1016/j.bpg.2007.10.019.
- Thiery JP, Acloque H, Huang R, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5): 871-90.
- Thomas RP, Farrow BJ, Kim S, et al. Selective targeting of the nuclear factor-kappaB pathway enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated pancreatic cancer cell death. *Surgery* 2002 Aug;132(2):127-34.
- Thompson LD, Heffess CS. Renal cell carcinoma to the pancreas in surgical pathology material. *Cancer* 2000;89:1076-88.
- Thompson BJ, Cohen SM. The Hippo Pathway regulates the bantam microRNA to Control Cell Proliferation and Apoptosis in Drosophila. *Cell* 2006. 126 (4): 767–74
- Thomson H. US National Cancer Institute's New Ras targets an old foe. *Nat Med.* 2001.;19:949-950.
- Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):937-45.

U

- Ueda J, Tanaka M, Ohtsuka T, Tokunaga S, Shimosegawa T; Research Committee of Intractable Diseases of the Pancreas Surgery for chronic pancreatitis decreases the risk for pancreatic cancer: a multicenter retrospective analysis. *Surgery*.2013 Mar;153(3):357-64. .
- Ujiki MB, Talamonti MS. Surgical management of pancreatic cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2005 Oct;15(4):218-25
- Usami Y, Satake S, Nakayama F, et al. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol*. 2008 Jul;215(3):330-9.

V

- Valent P, Bonet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Rev Cancer* 2012;12:767-775.
- Valls C, Andia E, Sanchez A, et al. Dual-phase helical CT of pancreatic adenocarcinoma: assessment of resectability before surgery. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;178:821-6.
- Van Heek T, Rader AE, Offerhaus GJ, et al. K-ras, p53, and DPC4 (MAD4) alterations in fine-needle aspirates of the pancreas: a molecular panel correlates with and supplements cytologic diagnosis. *Am J Clin Pathol*.2002; 117: 755-65.
- Van Laethem JL, Hammel P, Mornex F, et al. Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/ GERCOR phase II study. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4450.
- Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, et al. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer*. 2000 Sep 15;87(6):809-11.
- Vergara D, Merlot B, Lucot JP, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2010 May 1;291(1):59-66.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-84.
- Vincent A, Herman J, Sculick R, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378: 670-620.
- Vitone LJ, Greenhalf W, McFault CD, et al. The inherited genetics of pancreatic cancer and prospects for secondary screening. *Nest practical Rees Clin Gastroenterol*. 2006;20(2):253-283.
- Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 2013;369:1691-703.

W

- Wadler S. Molecular targeting in pancreatic cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2007;2(1):69-75
- Wang K., Degerny C, Xu M, et al. YAP, TAZ, and Yorkie: A conserved family of signal-responsive transcriptional coregulators in animal development and human disease. *Biochemistry and Cell Biology* 2009;87 (1): 77–91.
- Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signalling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2009;8, 2103-1209 .
- Wang Y, Dong Q, Zhang Q et al. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis on non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2010;101, 1279-1285.
- Wang Y, Kaiser CE, Frett B, Li HY. Targeting mutant kras for anticancer therapeutics: a review of novel small molecule modulators. *J Med Chem*. 2013;56, 5219-5230.
- Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, et al. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):1871-80.
- Whatcott C, Han H, Posner RG, Von Hoff DD. Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(1-2):135-51.
- Wilbur DC, Willis J, Mooney RA, et al. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from breast carcinoma: a comparison of immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay. *Mod Pathol*. 1992;5(1):79-84.
- White BD, Cjien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signalling in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2012;142, 219-232.
- Wolff A.C, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013.
- Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *Cancer Journal for Clinicians* 2013: 63 (5): 318-48
- World cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. Chapter 5.7. ISBN 92-832-0429-8.

X

- Xu MZ, Yao TJ, Lee NP, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2009;115: 4576-4858.
- Xue C, Xinjuan L, Haibo L, et al. S100 calcium-binding protein A6 promotes epithelial-mesenchymal transition through b-catenin in pancreatic cancer cell lines. *Plos One* 2015 March;10 (3).

Y

-Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013 Jun;144(6):1252-61.

- Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, et al. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(6):1527-32.

- Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.*2009;28(1-2): 15-33.

- Yoshizawa A, Fukoka J, Travis D, et al. Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(1):240-48.

Z

- Zavadil J, Böttlinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 2005 Aug 29;24(37):5764-74.

- Zender L, Spector MS, Xue W, et al. Identification and Validation of Oncogenes in Liver Cancer Using an Integrative Oncogenomic Approach. *Cell* 2006;125 (7): 1253–67

- Zhang W, Nandakumar N, Shi Y, et al. Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Signal.* 2014 May 6;7(324):ra42.

- Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, et al. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):7732-7.

- Zhang X, George J, Deb S, et al. Hippo pathway transcriptional co-activator YAP is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene* 2011;30:2810-2822.

- Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007;21 (21): 2747.

- Zhao B, Li L, Wang L, et al. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induces anoikis. *Genes Dev.* 2012;26:54-68.