

**Universidad de Santiago de Compostela**

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses



**Alteraciones epigenéticas en el Adenocarcinoma Ductal de Páncreas.**

**Impacto clínico-patológico.**

Memoria que presenta, para obtener al grado de Doctor,

**Elena Evgenyeva**

Santiago de Compostela, 2011



El Doctor ***D. Jerónimo Forteza Vila***, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela, y el Doctor ***D. Michel Herranz Carnero***, Director del Programa de Imagen Molecular, Fundación IDICHUS de Santiago de Compostela

CERTIFICAN:

Que la presente memoria que lleva por título “**Alteraciones epigenéticas en el Adenocarcinoma Ductal de Páncreas. Impacto clínico-patológico.**”, de la licenciada en Medicina por la Academia Superior Pública de Medicina de Yaroslavl, Rusia, *Elena Evgenyeva*, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 16 de Mayo de 2011.

Prof. Dr. Jerónimo Forteza Vila

Dr. Michel Herranz Carnero



*“Estoy satisfecho con el misterio de la vida eterna y con un conocimiento, un sentimiento, de la maravillosa estructura de la existencia, así como del humilde intento de entender incluso una pequeña porción de la Razón que se manifiesta en la naturaleza”.*

**Albert Einstein.**

***The World As I See It (El mundo como yo lo veo), 1934***

*“Muchas veces nos centramos en averiguar el verdadero nombre de las cosas, pero el hecho de poder poner nombre a esas cosas no nos garantiza saber lo que realmente son. En realidad, el conocer qué es algo, no tiene absolutamente nada que ver con el ser capaz de ponerle un nombre.*

*Para saber qué es algo, debemos ser capaces de describirlo, de comprender su funcionamiento, su entorno y todo lo que podamos aprender. En ese momento, si alguien nos pregunta por algo, quizá no sepamos ponerle un nombre, pero sí que seremos capaces de describir todo lo necesario sobre ese algo para que la otra persona lo pueda identificar, y además saber mucho más sobre ello que si simplemente hubiera respondido con el nombre.”*

**R. P. Feynman.**

***The difference between knowing the name of something and knowing something. 2011***



*A **Toñi**, siento no haber sabido más...*



# AGRADECIMIENTOS



## AGRADECIMIENTOS.

No es nada nuevo ni original que la Tesis Doctoral significa unos años de vida de alta intensidad. Circunstancialmente me apliqué en todas las etapas desde el inicio, llevando en la mano la historia clínica de cada paciente, cada bloque de parafina, y cada molécula de ADN. Agradezco al Destino por darme esta Oportunidad y esta Experiencia, al margen del dolor y de la euforia, que me ha tocado vivir. Seguro que llegará un día, cuando estos momentos serán unos de los mejores periodos de mi vida. He aprendido mucho más que imagino, y aún necesito tiempo para valorarlo y apreciarlo...

No obstante, este trabajo de investigación no carece de ambiciones científicas, ya que nunca se ha tratado de una mera meta en la carrera ni un trámite correspondiente. Siendo una patóloga práctica, llevaba pensando en este problema pésimo, una dolencia personal, cada vez que firmaba el diagnóstico de la enfermedad, un tipo de cáncer sin esperanza a día de hoy... Tal vez, nuestros resultados formen parte del Conocimiento Global con una aplicación humanitaria en el futuro.

Durante este camino compartí tiempo con mucha gente, amigos y muy amigos, conocidos y respetados, con la gente que hace su labor día a día con una dignidad y profesionalidad, y que contribuyeron generosamente con su tiempo, su conocimiento y su alma, para llevar a cabo este proyecto.

Corriendo el riesgo de errores por valor lo invaluable, entre muchas personas, nombraré a algunos, cuyo esfuerzo personal me ha resultado más cercano, y que se aplicaron, cada uno a su manera, para poder llegar a escribir esta reflexión:

- **Dr. Forteza**, el Padrino del Proyecto, el Director y Jefe Espiritual, capaz de cruzar las bibliografías, las ideas (y los cables, como no); un Amigo de verdad y, un Caballero, que nunca se rinde ni ha permitido que me rinda y con quien comparto el lema vital: “Lo imposible es lo único realizable en este mundo” (Daniel Barenboim”).
- **Michel Herranz**, el Director y el Jefe Creativo. El trabajo ha nacido sobre las ideas que aportas; está confeccionado sobre la habilidad que multiplica por 4 la mano de obra. Cuando nos metemos en el Laboratorio a “metilar”; he podido aprender de tu arte en el manejo de la imagen y de la escritura, hasta el último punto, sobre el café, el chocolate y....de tu optimismo ... El contador de “gracias” se reventó, pero sinceramente espero que no sea el final del trayecto.
- **Albert**, mi querido Profesor y Doctor. No me dejaste caer cuando estuve más frágil, me motivaste cuando estuve más desesperada, me enseñaste que la Ciencia, y Las Leyes del Murphy, son universales, y me aseguraste que se acaba todo, hasta la Tesis...sin olvidar de disfrutar de la vida, que, aunque parezca mentira, hay algo fuera del mundo de la metilación.
- Gracias a mi **Padre**, que me inculcó la inquietud (“La Doctora”) desde mi infancia, como seguidora de su intención, que no pudo cumplir por “culpa” de mi nacimiento, y a mi **Madre**, que nos seguía...

- **Dr. José Manuel Cameselle**, por explicarme en dos frases la Filosofía y las Fases de una Tesis. Lo comprobé en mi pellejo... y ¡funcional!
- **Enrique Domínguez y el Servicio de Digestivo** (en particular de ECO-endoscopia). Era el punto “cero”, el primer pan y el primer arte...
- **Natalia Camarasa**, tu ejemplo me sirvió siempre de referencia, con esperanza, que tras malos momentos y obstáculos inevitables, llegará el día de la Victoria.
- Gracias a las personas, tan queridas, del **Servicio de Anatomía Patológica (CHUS)**, que hicieron que mi llegada fuese como estar en casa...Trabajando una temporada con vosotros he dejado un pedazo de mi corazón a su lado, y me pagáis con ese famoso cariño gallego cada vez que vuelvo...ahora me toca quitar las zapatillas de la taquilla.
- **Magalí**, comparto la mitad del éxito contigo, te agradezco la rapidez, la calidad y la amabilidad, gracias a las cuales ha salido un producto limpio y con un excelente índice de pureza.
- **Elena, Raquel, Marta, Ángel** ....mini-equipo de mega-función, gracias por el ánimo y por la paciencia de soportar un “alien”, un “elefante en una tienda de cristal”, un novato del Mundo del Laboratorio de Biología Molecular
- **Olga** (española), mi espejo rubio rizado, mi amiga del alma.... No te doy las gracias por esto, sino por la puntualidad, en el sentido estricto de la palabra. Te ha tocado separar la avalancha mental de las alucinaciones nocturnas con punto y coma, punto y coma...
- **Olga** (rusa), mi familia no de sangre, sino de espíritu, que siempre tiene la visión alternativa, hasta rebelde, en el bien y en el mal. Me has salvado de muchas acciones absurdas que me empujaban al otro lado del Mundo.
- **Paqui, Bego, Fanny, Eva, Judit**...mis queridas “pitufitas” mediterráneas, las TEAPs primorosas y estupendas colaboradoras...el apoyo moral que cada día suma, gota a gota...
- **Manuel y Juan**...Siempre quedan cosas por aprender.

Gracias a todos, a quién he mencionado y quién no, a los que creyeron en mí, y a los que no, a estos últimos, para demostrarles que se habían equivocado...

---

# ***ABREVIATURAS***



- A- Adenina
- ADN/DNA- Acido desoxirribonucleico
- ADP- Adenocarcinoma ductal de páncreas
- AFIP- Armed Forces Institute of Pathology
- AJCC-American Joint Committee on Cancer
- BPDE-Benzopiren diol epoxide
- BRCA2-Breast Cancer Type 2 susceptibility protein
- C-Citosina
- CAM-Campo del aumento mayor
- CDKN1C/p57KIP2- Cyclin-dependent kinase inhibitor
- CEA-Antígeno carcinoembrionario
- c-erbB-2-HER2/neu -Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2
- CHUS- Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
- DNMTs (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) -DNA methyltransferase
- dNTPs-Desoxirribonucleótidos trifosfato
- EDTA-Ethylenediaminetetraacetic acid
- EGFR-Rreceptor del factor de crecimiento epidérmico
- FAMM- Síndrome familiar de lunares atípicos múltiples-melanoma,
- FDA-Food and Drug Administration
- G- Grado de diferenciación histológica
- G1- Grado de diferenciación histológica -Bien diferenciado
- G2- Grado de diferenciación histológica -Moderadamente diferenciado
- G3- Grado de diferenciación histológica -pobremente diferenciado
- G- Guanina
- GSTP1- Gluthatione S-transferase p11
- H&E- Hemotoxilina y eosina
- HHIP- Human Hedgehog Interacting Protein
- HIN1- High -in normal-1
- HNPCC- Carcinoma colorrectal hereditario no polipósico
- ICF-Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome
- IPMN- Neoplasia papilar mucinosa intraductal
- IVD-In vitro Methylated DNA
- JNK- c-Jun N-terminal kinases
- KAI1-Kangai 1
- KRAS (kras-V-Ki-ras2)- Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
- LOH- Pérdida de heterocigosidad
- MDS- Síndrome mieloproliferativo crónico
- MECP2 -Methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)
- MGMT-Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
- MLH1- MutL homolog 1
- MSP-PCR específica de metilación

- MUC1-Mucin 1, cell surface associated
- MUC3- Mucin 3, cell surface associated
- MUC5/6 Mucin 5/6, cell surface associated
- NPTX2- Neuronal pentraxin-2
- OMS- Organización Mundial de la Salud
- p16/CDKN2A - Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
- PanIN- Pancreatic intraepithelial neoplasia
- PCR- Polymerase Chain Reaction /Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PHYLIP- PHYLogeny Inference Package
- pM -Metástasis a distancia
- pM0 - Ausencia de metástasis a distancia
- pM1 - Metástasis a distancia
- pN -Ganglios linfáticos regionales
- pN0 - Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales
- pN1 - Metástasis en ganglios linfáticos regionales
- pNx - Afectación ganglionar linfática no definida
- ppENC- Preproenkefalina
- pT0 - Sin evidencia de tumor primario
- pT1 - Tumor limitado en páncreas, menos de 2 cm del diámetro mayor
- pT2 - Tumor limitado en páncreas, más de 2 cm del diámetro mayor
- pT3 - Tumor que extiende a tejidos parapancreáticos, sin afectación del eje celiaco o de la arteria mesentérica superior
- pT4 - Tumor afecta el eje celiaco o la arteria mesentérica superior (tumor primario irresecable)
- PTEN- Phosphatase and tensin homolog
- pTis - Carcinoma in situ
- pTNM-Clasificación histológica de TNM
- pTx - Tumor primario no definido
- QMSP- PCR cuantitativa específica de metilación
- R0 - Resección completa
- R1 - Margen resección macroscópicamente negativo, af. microscópicamente
- R2 - Margen de resección afectado macroscópicamente y microscópicamente.
- RARbeta2- Retinoic Acid Receptor- beta 2
- RASSF1A- Ras association domain family 1 isoform A
- Rb- Retinoblastoma protein
- RNA/ARN- Acido ribonucleico/e RiboNucleic Acid
- RXRs- Retinoid-X receptors
- SAH-S-adenosilhomocisteina
- SAM-S-adenosilmetionina
- SNP- Single Nucleotide Polymorphism/ Polimorfismo de nucleótido simple
- SPARC- Secreted Protein Acidica and Rich in Cysteine
- STK11/LKB1 - Serine/threonine kinase 11

# ***ÍNDICE DE FIGURAS***



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía y fisiología de páncreas -----	17
<b>Figura 2.</b> Topografía del páncreas -----	18
<b>Figura 3.</b> Imagen macroscópica del ADP -----	21
<b>Figura 4.</b> ADP de distinto grado de diferenciación y variantes histopatológicas -----	22
<b>Figura 5.</b> Perfil de expresión inmunohistoquímico del ADP -----	23
<b>Figura 6.</b> Rutas de señalización celular y cáncer -----	29
<b>Figura 7.</b> Alteraciones del ciclo celular en el ADP y lesiones precursoras -----	32
<b>Figura 8.</b> Vías de señalización y procesos alterados en el ADP -----	34
<b>Figura 9.</b> Diagrama de alteraciones estructurales cromosómicas en 44 ADPs -----	35
<b>Figura 10.</b> Metilación del ADN -----	41
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de silenciamiento génico por metilación -----	43
<b>Figura 12.</b> Perfil de hipermetilación del promotor en diferentes neoplasias humanas -----	44
<b>Figura 13.</b> Conversión de la Citosina tras tratamiento del ADN con bisulfito sódico -----	59
<b>Figura 14.</b> PCR específica de metilación (MSP) -----	60
<b>Figura 15.</b> Esquema y resultados de secuenciación por terminador fluorescente --	67
<b>Figura 16.</b> Ruta de actuación de <i>GSTP1</i> -----	68
<b>Figura 17.</b> Ruta de actuación de <i>p16</i> y <i>Ciclina D2</i> -----	69
<b>Figura 18.</b> Ruta de actuación de <i>RAR beta 2</i> -----	70
<b>Figura 19.</b> Ruta de actuación de <i>RASSF1A</i> -----	70
<b>Figura 20.</b> Perfiles tumorales, resultantes del estudio con el software PHYLIP--	78
<b>Figura 21.</b> PCR Específica de Metilación (MSPs) para los genes de estudio -----	80
<b>Figura 22.</b> Secuenciación de Bisulfito -----	82
<b>Figura 23.</b> Perfil de metilación -----	83
<b>Figura 24.</b> Árbol comparativo según los perfiles de metilación -----	84
<b>Figura 25.</b> Correlación entre agrupaciones de tumores en base a sus características clínico-patológicas y los perfiles epigenéticos- I -----	86
<b>Figura 26.</b> Correlación entre agrupaciones de tumores en base a sus características clínico-patológicas y los perfiles epigenéticos- II -----	86
<b>Figura 27.</b> Perfiles de metilación de tumores primarios y sus metástasis -----	88
<b>Figura 28.</b> Metilación en tumores primarios versus metástasis -----	89
<b>Figura 29.</b> Metilación no concordante en tumores primarios versus metástasis ---	90



# ***\_\_\_\_\_ÍNDICE DE TABLAS***



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grado histopatológico del ADP -----	24
<b>Tabla 2.</b> Correlación entre estadio clínico y patológico -----	26
<b>Tabla 3.</b> Supervivencia a los 5 años de pacientes operados de ADP -----	27
<b>Tabla 4.</b> Supervivencia a los 5 años de pacientes no operados de ADP -----	27
<b>Tabla 5.</b> Vías de señalización genéticamente alteradas en la mayoría de los ADP -----	33
<b>Tabla 6.</b> Síndromes genéticos e incremento del riesgo de desarrollo del ADP ----	37
<b>Tabla 7.</b> Nuevos agentes de tratamiento epigenético -----	50
<b>Tabla 8.</b> Parámetros clínico-patológicos -----	57
<b>Tabla 9.</b> Secuencias de primers de MSP -----	64
<b>Tabla 10.</b> Parámetros clínico-patológicos no numéricos de la serie -----	75
<b>Tabla 11.</b> Perfil de los tumores codificados con cuatro categorías para cada variable -----	77
<b>Tabla 12.</b> Agrupación tumoral al asociar 4 categorías en cada variable -----	79
<b>Tabla 13.</b> Agrupación tumoral según el perfil de metilación -----	85



# ***ÍNDICE***

---



**ÍNDICE:**

<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS GENERALES DEL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS</b>	<b>17</b>
1.1 Definición de Adenocarcinoma Ductal de Páncreas	17
1.2 Anatomía y fisiología del páncreas	17
1.3 Epidemiología del ADP	18
1.4 Origen celular y lesiones-precursoras del ADP	20
1.5 Características histopatológicas del ADP	21
1.5.1 Descripción macroscópica y microscópica del ADP	21
1.5.2 Perfil histoquímico e inmunohistoquímico del ADP	23
1.5.3 Criterios de graduación del ADP	24
1.6 Estadio patológico y clínico del ADP (TNM)	25
1.7 Factores pronósticos en el ADP	26
<b>2. BASES MOLECULARES "CLÁSICAS" DEL ADP</b>	<b>28</b>
2.1 Cáncer como enfermedad genética	28
2.2 Alteraciones moleculares en el ADP	31
2.2.1 Secuencia global del genoma y ADP	33
2.2.2 Alteraciones citogenéticas en el ADP	34
2.2.3 Síndromes hereditarios y ADP	35
2.3 Trabajo previo de caracterización del ADP	38
<b>3. EPIGENÉTICA</b>	<b>39</b>
3.1 Definición	39
3.2 Vista histórica y paradigma de la epigenética	39
3.3 Bases bioquímicas de la metilación del ADN. Islas CpG	41
3.4 Papel de la metilación del ADN en procesos de desarrollo y enfermedad	42
3.5 Epigenética y cáncer. Metilación aberrante del genoma	43
3.6 Papel de la metilación del ADN en el ADP	45
3.6.1 Alteraciones epigenéticas en las vías clásicas del ADP	45
3.6.2 Metilación aberrante del promotor en genes reguladores. Interacción epitelio-matriz en el ADP	46
3.6.3 Metilación aberrante y la vía de señalización <i>Hedgehog</i> en el ADP	47
3.6.4 Estudios globales de metilación en el ADP	47
3.7 Nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas del cáncer basadas en alteraciones epigenéticas	48
<b>II HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>	<b>52</b>

<b>III MATERIAL Y MÉTODOS</b>	54
1. Selección del material	54
1.1 Pacientes	54
1.2 Selección de muestras	55
2. Estudio histopatológico	56
3. Parámetros clínico-patológicos utilizados en estudio	56
4. Extracción del ADN	58
5. Prueba de metilación específica mediante PCR (MSP)	59
5.1 Conceptos generales de la MSP y modificación del ADN con bisulfito	59
5.2 Protocolo de MSP	61
5.2.1 Tratamiento con bisulfito sódico	61
5.2.2 Precipitación y purificación del ADN tratado	63
5.2.3 PCR específica de mutilación	63
5.2.4 Electroforesis del producto de PCR y visualización del resultado	65
5.3 Secuenciación del ADN	66
6. Selección y descripción de los genes	68
6.1 <i>GSTP1</i>	68
6.2 <i>p16</i>	69
6.3 <i>Ciclina D2</i>	69
6.4 <i>RAR beta 2</i>	70
6.5 <i>RASSF1A</i>	70
6.6 <i>HIN-1</i>	71
7. Estadística	71
<b>IV RESULTADOS</b>	74
1. Datos clínico-patológicos	74
1.1 Perfil de los tumores	76
2. Resultados epigenéticos	80
2.1 MSP	80
2.2 Secuenciación de bisulfito	81
2.3 Perfiles de mutilación	83
3. Correlación entre resultados epigenéticos y datos clínico-patológicos	86
3.1 Perfil epigenético versus perfil de tumores	87
3.2 Perfil epigenético tumor versus metástasis	88
<b>V DISCUSIÓN</b>	92
1. Aspectos clínico-patológicos del ADP. Desafíos y dimensión del problema	92
1.1 Estudios epidemiológicos prospectivos y retrospectivos en el ADP	93
1.1.1 Factores y grupos del riesgo	94
1.1.2 Epidemiología genética	95
1.1.3 Aspectos preventivos y screening del ADP	95
1.2 Factores pronósticos en el ADP. Hipótesis de progresión tumoral	96
1.3 Avances diagnósticos y tratamiento del ADP	97

2. Epigenética-----	98
2.1 Importancia de la epigenética en la traslación en cáncer-----	98
2.2 Resultados del trabajo actual en la caracterización de las alteraciones epigenéticas en el ADP y su impacto clínico- patológico-----	99
2.2.1 Selección de los genes-----	99
2.2.2 Agrupaciones tumorales-----	100
2.2.3 Agrupaciones epigenéticas-----	102
3. Nuestros resultados comparados con otros estudios-----	103
3.1 Perfiles epigenéticos y rutas metabólicas en el estudio-----	103
3.1.1 <i>GSTP1</i> -----	103
3.1.2 <i>p16</i> y <i>Ciclina D2</i> -----	104
3.1.3 <i>RAR beta 2</i> -----	105
3.1.4 <i>RASSF1A</i> -----	107
3.1.5 <i>HIN1</i> -----	108
3.2 Perfil epigenético: tumores primarios versus metástasis-----	109
4. "Huella epigenética". Análisis comparativo de las agrupaciones tumorales y epigenéticas-----	111
5. Aportación de las nuevas vías de control celular en el manejo de los pacientes con diagnóstico de ADP-----	113
<b>VI CONCLUSIONES-----</b>	<b>115</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>117</b>



# ***INTRODUCCIÓN***



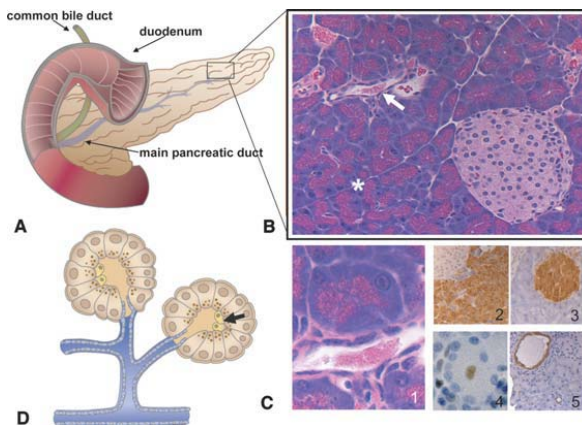
# I. INTRODUCCIÓN

## 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS GENERALES DEL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

### 1.1 Definición de Adenocarcinoma Ductal de Páncreas

El Adenocarcinoma Ductal de Páncreas (ADP) es una neoplasia que se origina probablemente a partir del epitelio ductal pancreático, mostrando un fenotipo similar, con producción de mucina y un patrón de citoqueratinas característico (Hamilton, 2000).

### 1.2 Anatomía y fisiología de páncreas.

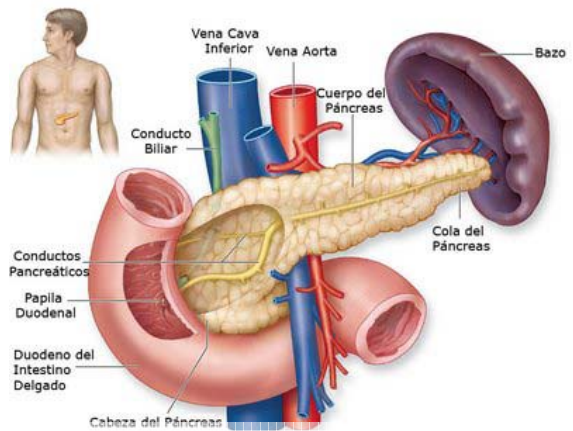


El páncreas es un órgano glandular del aparato digestivo, con derivación embriológica endodermal. La diversidad celular y compartimiento exocrino y endocrino regula los procesos claves de digestión de carbohidratos y de homeostasis de la glucosa.

**Figura 1: Anatomía y fisiología del páncreas.** A. Imagen general del páncreas en relación con el duodeno y conducto biliar común. B: Componentes histológicos del páncreas, que incluyen islote de Langerhans (zona derecha abajo), porción acinar (asterisco) y conducto pancreático (flecha). H&E C: Imágenes histológicas con tinción H&E e inmunohistoquímica que muestran la diversidad celular pancreática: imagen de la unión ductulo – acinar (1, H&E, 40x); unidad acinar que expresa el anticuerpo anti-amilasa (2); isleta de Langerhans positiva para anticuerpo de insulina (3); células centroacinares positivas para Hes1 (4); células ductales positivas para citoqueratina 19 (5). D: Esquema de la relación ductos y ácinus con células centroacinares (flecha) situadas en la unión ductulo-acinar (Hezel, 2006)

La porción exocrina (80%), está compuesta por una red ramificada de células ductales y acinares que producen y expulsan gránulos zymógenos, que secretan las células acinares, con transporte posterior al tubo intestinal a través del sistema de conductos. La porción endocrina, unida en los islotes de Langherhans, es responsable de la secreción de insulina inmediata a los vasos sanguíneos (Figura 1) (Kumar, 2005)

Topográficamente, el páncreas se define como una glándula alargada lobulada, localizada retroperitonealmente entre el duodeno e hilio esplénico, y se divide en cabeza, cuello, cuerpo y cola. Sin embargo, desde el punto de vista práctico quirúrgico, les dan importancia a la porción derecha, la cabeza, que incluye el proceso



**Figura 2. Topografía del páncreas**

ucinado y está limitada por la confluencia de la vena mesentérica superior y la vena porta; el cuerpo, situado entre esta confluencia y el margen izquierdo de la aorta; y la porción izquierda: la cola (Edqe, 2009) (Figura 2).

### 1.3 Epidemiología del ADP

El ADP representa un 3% de todos los tumores malignos, es responsable del 5% de la mortalidad por cáncer y tiene una incidencia anual a nivel mundial de 200,000 casos. En Estados Unidos en 2008, han sido registrados 37,700 casos del ADP y 34,300 pacientes fallecidos por esta enfermedad (Jemal, 2008).

De los fallecimientos por tumor primario de origen desconocido entre 50,000 y 80,000 casos corresponden al ADP (Michaud, 2004; Matthias-Löhr, 2005).

El ADP representa más del 85% de las neoplasias primarias de páncreas (Hamilton, 2000). Es la segunda neoplasia en frecuencia del tracto gastrointestinal. Constituye la cuarta causa de muerte por cáncer, siguiendo al carcinoma pulmonar, de próstata y colorrectal en los hombres y al carcinoma pulmonar, de mama y colorrectal en las mujeres. Tienen una supervivencia media inferior a 6 meses, y un rango de uno y cinco años de 25% y 3-5% respectivamente (Cabner, 2008). Este tipo de cáncer ocurre casi exclusivamente en adultos, aumenta de forma exponencial a partir de los 40 años, y alcanza un pico entre la séptima y la octava década.

En el momento actual las causas que originan el ADP siguen siendo desconocidas, con una evidencia de aumento de riesgo entre 2,5% y 3,6% de desarrollo de este tipo de cáncer en los fumadores (Hassan, 2007). Hay datos limitados de otros factores ambientales con respecto al riesgo carcinogénico, tales como el consumo de alcohol, consumo de café y aspirina. Algunos estudios hacen referencia a los posibles factores de riesgo en pacientes con pancreatitis crónica, y aunque menos probable en los pacientes con cirrosis hepática, colecistectomía previa o factores dietéticos ricos en grasas o colesterol (Lowenfels, 2006).

Historia del cáncer pancreático familiar la presentan entre el 5-10% de los pacientes; está demostrado el aumento de riesgo de esta enfermedad en 57 veces, en familias con más de cuatro miembros afectados (Tersmette, 2001; Shi, 2009), relacionado probablemente con mutación germinal de genes-reparadores de ADN (*BRCA2*) (Couch, 2007).

La naturaleza letal del ADP, es un resultado tanto de sus propiedades biológicas, como de su capacidad para la diseminación rápida por vía linfática con metástasis ganglionares y orgánicas. Esta agresividad biológica, así como su resistencia a la terapéutica convencional, hace que esta neoplasia represente el típico caso clínico de enfermedad avanzada metastásica en el momento del diagnóstico, y por consiguiente, frecuentemente incurable, dicho de otra forma “early is too late” (Real, 2003). Sólo

aproximadamente el 20% de pacientes presentan, al inicio, el tumor localizado y potencialmente curativo (Hidalgo, 2010)

#### **1.4 Origen celular y lesiones-precursoras del ADP**

A nivel morfológico, el caso típico de ADP está compuesto por células epiteliales de distinto grado de diferenciación glandular, con un componente prominente de estroma desmoplásico (Hernandez-Muñoz, 2008). La hipótesis de origen ductal del ADP se basa en una frecuente asociación de neoplasia infiltrante, con alteraciones hiperplásicas y displásicas en conductos pancreáticos. A favor de esta teoría, existe la evidencia de un perfil inmunohistoquímico común para el epitelio ductal y neoplásico (positividad para citoqueratina 7 y citoqueratina 19), así como hallazgos de alteraciones genéticas que ocurren en lesiones precursoras del ADP (Adsay, 2005).

Al respecto de las lesiones preneoplásicas, están descritas tres tipos: neoplasia pancreática intraductal (PanIN), neoplasia mucinosa quística y neoplasia mucinosa papilar intraductal (Hruban, 2000; Singh, 2007).

Otro modelo experimental animal, sugiere posible origen de células tumorales del ADP tras metaplasia de células acinares (transdiferenciación) (Real, 2008). La hipótesis se basa en una observación en ratones transgénicos Ela-TGF-alfa, que a partir de procesos metaplásicos y displásicos en 50% de casos, desarrollan carcinoma acinar, y otra mitad el ADP o un carcinoma ductal-acinar mixto (Wagner, 2001).

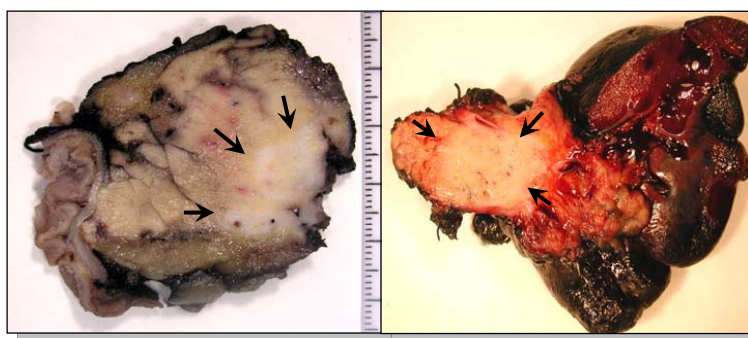
Además de estas hipótesis, entre las células tumorales se identifica una población minoritaria entre 1% y 5% con capacidad ilimitada de autorrenovación y división asimétrica, conocidas como células-madre o células troncales (“stem cells”). La resistencia a los agentes de quimioterapia y radioterapia de estas células, puede explicar la ausencia de respuesta completa al tratamiento, y proponen un reto de interés científico al tratamiento de estas células específicas (Hermann, 2007; Hidalgo 2010).

## 1.5 Características histopatológicas del ADP

### 1.5.1 Descripción macroscópica y microscópica del ADP

La mayoría de los casos del ADP (60-70%) se encuentran localizados en la cabeza de páncreas, en particular en su porción superior, y menos frecuente en el proceso ucinado (Solcia, 1997). Raramente el ADP se desarrolla sobre el tejido pancreático ectópico (Tanimura, 1979).

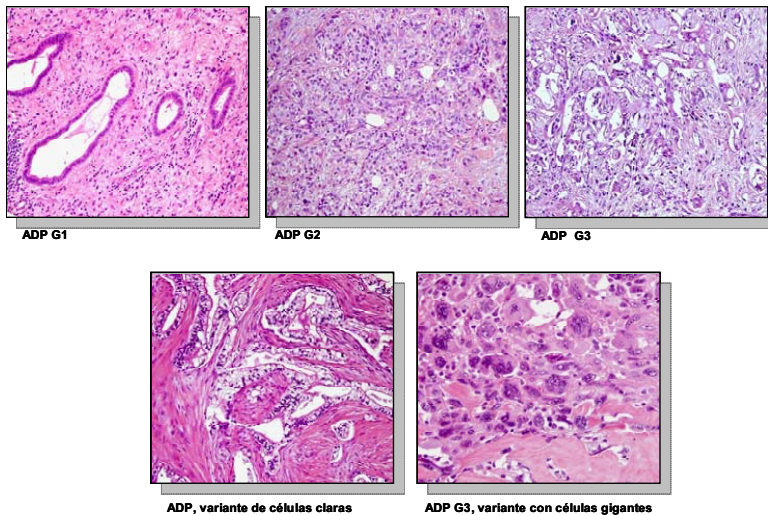
Macroscópicamente, el ADP es un nódulo sólido firme y mal delimitado. Presenta la superficie de color grisáceo-blanquecino, homogéneo o con algunas áreas microquísticas. Necrosis y hemorragias son infrecuentes (Figura 3). Carcinomas localizados en la cabeza del páncreas habitualmente afectan el conducto pancreático, y/o colédoco, y producen estenosis con dilatación proximal en ambos sistemas. Los carcinomas avanzados típicamente invaden la pared duodenal, ampolla de Vater, eje de tronco celíaco y la pared de la vena cava. A pesar de una cirugía radical, la afectación del margen radial de resección es un hallazgo muy típico y bastante frecuente.



**Figura 3. Imagen macroscópica del ADP.** La zona tumoral marcada con flechas; a la izquierda - duodenopancreatectomía cefálica, a la derecha - pancreatectomía izquierda.

La mayoría de los ADP son adenocarcinomas bien o moderadamente diferenciados, con una imagen morfológica típica de estructuras glandulares bien definidas, con distinto grado de producción de mucina, que de cierto modo imitan ductos pancreáticos normales, rodeados por estroma desmoplásico (Figura 4) (Hamilton,2000).

Los variantes histopatológicos del ADP poco frecuentes (1-7%) incluyen carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células claras, carcinoma indiferenciado (anaplásico y tumor de células gigantes de tipo osteoclastos), carcinoma mucinoso no quístico y carcinoma con células en anillo de sello (Figura 4). Estos tipos de cáncer se consideran como variantes del ADP, porque a pesar de ser formas pobremente diferenciadas, en la mayoría de ellos se puede encontrar algunos focos glandulares de diferenciación ductal (Chen, 1985).



**Figura 4. ADP de distinto grado de diferenciación y variantes histopatológicas**

### 1.5.2 Perfil histoquímico e inmunohistoquímico del ADP.

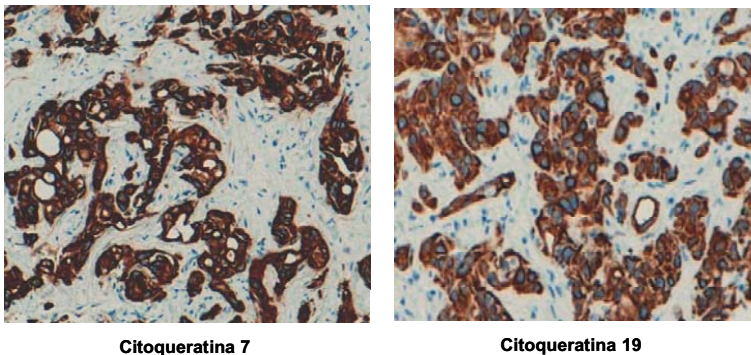
Actualmente no existen marcadores histoquímicos y/o inmunohistoquímicos específicos que puedan definir el ADP. Se utilizan un conjunto de marcadores que ayudan a diferenciar un carcinoma exocrino de páncreas de otras neoplasias, con morfología ductal u otros carcinomas del tracto gastrointestinal.

Habitualmente el ADP se tiñe con mucinas ácidas, pero sólo focalmente con la mucina neural.

En cuanto las técnicas de inmunohistoquímica, la mayoría de los ADP expresan *MUC1*, *MUC3* y *MUC5/6*, *CA 19.9*, *Du-Pan 2*, *Span-1*, *CA 125* y *TAG 72* (Sessa, 1990). La utilización de estos marcadores está restringida por una reacción cruzada con el epitelio no tumoral en pancreatitis crónica, en algunos adenomas serosos y en células de carcinoma acinar.

El anticuerpo monoclonal *CEA* discrimina la inmunoreactividad en células no tumorales en hiperplasia ductal, a diferencia de las células neoplásicas (Batge, 1986).

El patrón inmunohistoquímico de expresión de citoqueratinas en el ADP coincide con el del epitelio ductal normal, siendo positivo para citoqueratinas 7, 8, 18, 19 y negativo para citoqueratina 20 (Figura 5)



**Figura 5. Perfil de expresión inmunohistoquímica del ADP.** Las células tumorales son positivas para citoqueratina 7 y citoqueratina 19.

Las células tumorales del ADP son negativas para vimentina, marcadores neuroendocrinos (salvo las células aisladas en los carcinomas bien diferenciados), así como para enzimas pancreáticas como tripsina, quimotripsina y lipasa (Schussler, 1992).

Se ha visto sobre-expresión en las células del ADP de *EGFR*, *c-erB-2*, *TGF-alfa*, metaloproteínas y cadherina E (patrón de membrana).

En la práctica rutinaria hospitalaria, los marcadores inmunohistoquímicos se aplican para una orientación diagnóstica y diagnóstico diferencial de la enfermedad metastásica, utilizando sobre todo un panel de citoqueratinas 7,19 y 20. En todos los casos, un diagnóstico correcto requiere una precisa correlación clínico-patológica y los datos de imagen radiológica.

### 1.5.3. Criterios de graduación del ADP

El sistema reciente de graduación del ADP se basa en la combinación de los criterios histopatológicos, citológicos y en la actividad mitótica (Tabla 1, Figura 4)

Grado tumoral	Diferenciación glandular	Producción de mucina	Mitosis (en 10 CAM)	Atipia nuclear
<b>Grado1</b>	Bien diferenciado	Intensa	≤5	Leve polimorfismo. Polaridad nuclear
<b>Grado2</b>	Moderadamente diferenciados estructuras ductales y tubulares	Irregular	entre 6 y 10	Moderado polimorfismo
<b>Grado3</b>	Pobremente diferenciados glándulas, estructuras mucoepidermoides y pleomórficos	Abortiva	>10	Marcado polimorfismo y aumento del tamaño nuclear

**Tabla 1: Grado histopatológico del ADP (Luttges, 2000)**

## **1.6 Estadío patológico y clínico del ADP (TNM).**

La clasificación **pTNM** define las siguientes categorías histopatológicas para los ADP, que a su vez correlacionan con los estadios clínicos (Tabla2):

### ***Tumor primario (pT)***

pTx – Tumor primario no definido.

pT0 – Sin evidencia de tumor primario.

pTis – Carcinoma in situ.

pT1 – Tumor limitado en páncreas, menos de 2 cm del diámetro mayor.

pT2 – Tumor limitado en páncreas, más de 2 cm del diámetro mayor.

pT3 – Tumor que se extiende a tejidos parapancreáticos, sin afectación del eje celíaco o de la arteria mesentérica superior.

pT4 – Tumor que afecta al eje celíaco o a la arteria mesentérica superior (tumor primario no resecable).

### ***Ganglios linfáticos regionales (pN)***

pNx – Afectación ganglionar linfática no definida.

pN0 – Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales.

pN1 – Metástasis en ganglios linfáticos regionales.

### ***Metástasis a distancia (pM)***

pM0 – Ausencia de metástasis a distancia.

pM1 – Metástasis a distancia.

Dada la importancia en el pronóstico del ADP, la clasificación pTNM debe de incluir una característica adicional del estado de margen de resección:

R0 – Resección completa.

R1– Margen de resección macroscópicamente negativo, pero afectado microscópicamente.

R2 – Margen de resección afectado macroscópicamente y microscópicamente.

<b>Estadio clínico</b>	<b>pT</b>	<b>pN</b>	<b>pM</b>
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio III	T4	N0, N1	M0
Estadio IV	T1,T2,T3,T4	N0, N1	M1

**Tabla 2. Correlación entre estadio clínico y patológico**

### **1.7. Factores pronósticos en el ADP**

Los factores pronósticos clásicos independientes en el ADP son: el tamaño tumoral y la afectación ganglionar linfática. El último se convierte en un factor dominante respecto a la respuesta al tratamiento adyuvante, que actualmente sólo la afectación del margen de resección meticulosamente estudiado, puede competir con el estado metastático ganglionar en relación con la supervivencia postquirúrgica (Luttges, 1998; Pazdur, 2003).

Por estos motivos, la valoración de los márgenes quirúrgicos, tanto pancreático como radial, está incluido como un apartado de la clasificación TNM en el protocolo del informe anatomopatológico de los ADP. Se ha demostrado, en las series grandes de los centros hospitalarios de referencia, que la resección quirúrgica curativa (R0) se realiza en el 63%-81% de los casos y que los resultados, a largo plazo, refieren una supervivencia del 25% en 5 años, y menor del 10% a los 10 años, hecho que marca una diferencia considerable con las cifras medias del 3% para el mismo periodo (Schneider, 2005). Otros autores revelan una supervivencia del 20% al 40% a los 5 años con R0, frente a una supervivencia nula en los casos de R1 o R2 (Yeo, 1995).

La supervivencia media de los pacientes operados con una enfermedad localizada no metastásica oscila entre 12-20 meses. Pacientes con ADP localmente avanzado no metastático tienen una supervivencia media de 6-10 meses, y los que se manifiestan con cáncer metastático, tienen una supervivencia de 3-6 meses (Tablas 3 y 4) (Bilimoria,2007).

Estadio clínico	Número De pacientes	(%)	1 año (%)	2 años (%)	3 años (%)	4 años (%)	5 años (%)	SuV media (meses)
IA	1886	8.8	71.3	50.2	40.7	34.7	31.4	24.1
IB	2364	11	67.3	45.4	35.3	29.6	27.2	20.6
IIA	3846	17.9	60.7	34.9	23.8	18.4	15.7	15.4
IIB	7828	36.4	52.7	23.8	14.4	10.2	7.7	12.7
III	2850	13.2	44.5	19.3	11	8.1	6.8	10.6
IV	2738	12.7	19.2	8.4	5.3	3.7	2.8	4.5
Total	21.512							12.6

**Tabla 3: Supervivencia a los 5 años de pacientes operados de ADP**

Estadio clínico	Número de pacientes	(%)	1 año (%)	2 años (%)	3 años (%)	4 años (%)	5 años (%)	SuV media (meses)
IA	3.412	4.4	29.2	10.5	6.2	4.6	3.8	6.8
IB	4.298	5.4	26.0	9.4	5.7	4.0	3.4	6.1
IIA	8.486	10.1	25.0	7.7	4.1	2.8	2.4	6.2
IIB	6.570	11.8	26.9	7.7	3.8	2.6	2.0	6.7

**Tabla 4: Supervivencia a los 5 años de pacientes no operados de ADP**

Entre otros factores pronósticos desfavorables se mencionan el alto grado, la invasión perineural, embolización vascular y elevación de CA 19-9 (Edge, 2009).

## **2. BASES MOLECULARES “CLÁSICAS” DEL ADP.**

Los estudios sobre las bases moleculares del carcinoma de páncreas en las últimas décadas han supuesto numerosos avances en el conocimiento de los múltiples factores implicados en el desarrollo y la progresión tumoral, cuyos objetivos finales se han dirigido a la búsqueda de marcadores biológicos para el diagnóstico precoz, factores relacionados con el pronóstico y el descubrimiento de dianas terapéuticas (Feldmann, 2008; Ranganathan, 2009; Saif, 2007; Sakorafas, 2001)

### **2.1 Cáncer como enfermedad genética.**

El cáncer, neoplasia o tumor, puede considerarse una enfermedad genética que se desarrolla en organismos superiores, en la mayoría de tejidos y en todo tipo de células somáticas. Bajo el nombre genérico de cáncer, se engloba un conjunto de enfermedades que tienen en común un crecimiento celular desordenado (tumor), y una colonización tisular (metástasis), todo ello determinado por una mutación inicial, seguida de la acumulación de otras mutaciones sucesivas (Volgelstein, 1993).

Al igual que todas las enfermedades moleculares, el cáncer se manifiesta en alteraciones bioquímicas de todo tipo a nivel celular, tisular y, particularmente, por la aparición de marcadores tumorales y tisulares (Tennant, 2009).

Las alteraciones genéticas encontradas en las células cancerosas pueden ser de tipo mutación puntual, translocación, amplificación, delección, y ganancia/pérdida de todo un cromosoma. Existen genes que son más susceptibles a sufrir mutaciones que desencadenen el cáncer. Esos genes, cuando están en su estado normal, se llaman protooncogenes, y cuando están mutados se llaman oncogenes. Lo que esos genes codifican suelen ser receptores de factores de crecimiento, de manera que la mutación genética hace que los receptores producidos estén permanentemente activados, o bien



Hoy son bien conocidas como causa de cáncer las mutaciones que afectan esencialmente a genes de dos tipos: los protooncogenes y los genes oncosupresores (o genes supresores de tumores).

El análisis bioquímico y funcional de los productos de varios genes tumorales indica que éstos juegan papeles fundamentales en procesos de transducción de señales implicados en el control de la proliferación, diferenciación o muerte celular (Figura 6). Estos estudios han esclarecido cómo la progresión normal del ciclo celular es el resultado de una interacción cuidadosamente balanceada entre múltiples reguladores, codificados por protooncogenes y genes supresores. No es sorprendente, por tanto, que cualquier alteración funcional a nivel de uno de estos múltiples reguladores, produzca un ciclo celular alterado, que finalmente desemboca en la progresión neoplásica. Esta simplificación conceptual ha permitido definir al cáncer, a nivel molecular, como una “enfermedad genética del ciclo celular”. También permite empezar a entender la naturaleza multifásica del cáncer, un proceso de múltiples etapas, que requiere la acumulación de sucesivos eventos de mutación somática (oncogenes, genes supresores, genes de susceptibilidad) y de selección clonal, que producen variantes en la descendencia celular, con propiedades de crecimiento cada vez más agresivas (Spencer, 2006).

La participación de los genes en la carcinogénesis puede seguir dos tipos de mecanismos:

1.-La mayoría de los cánceres se deben a cambios genéticos inducidos por mutaciones. La célula inicial afectada crece con mayor rapidez de lo normal, y si no existe un control de ese crecimiento, llega a formar un tumor primario en el tejido circundante (neoplasia), o un tumor secundario (metástasis) en tejidos lejanos (Blagosklonny, 2005)

2.- Por otro lado, algunos cánceres se deben a cambios epigenéticos, aún no bien conocidos, que afectan a la expresión de algunos genes, y pueden permanecer en

estado latente durante toda la vida de la célula. Por ejemplo, son abundantes los agentes mutágenos que modifican la expresión génica, alterando la metilación del ADN (Macaluso, 2003).

Los importantes avances recientes en la identificación de las alteraciones genéticas y moleculares de las células tumorales humanas, están siendo utilizados con éxito en aplicación a nivel clínico. Así, por ejemplo, secuencias específicas de ácidos nucleicos, están siendo utilizadas con gran precisión como marcadores de progresión tumoral en situaciones clínicas variadas. Igualmente, la gran cantidad de información acumulada recientemente sobre el genoma humano y de organismos modelos, está empezando a ser utilizada, por medio de aproximaciones genéticas tradicionales, para el diseño y caracterización de fármacos antitumorales. Finalmente, tecnologías recientes tales como la microdissección por láser y los diversos tipos de “*microarrays*” de ácidos nucleicos o de proteínas, utilizados en Genómica y Proteómica, ofrecen esperanzas significativas de completar en un futuro próximo la identificación de las “*firmas moleculares*” de los diferentes tipos de tumores y/o estadios de los mismos.

La disponibilidad actual de fármacos para el tratamiento del cáncer por quimioterapia se verá superada algún día por novedosos tipos de abordajes, basados en la terapia génica, en la inhibición génica, así como en la inhibición específica de la angiogénesis, la metástasis y la apoptosis (Feero, 2011).

## **2.2 Alteraciones moleculares en el ADP**

El desarrollo y progresión de las neoplasias epiteliales es el resultado de la pérdida del equilibrio entre los factores promotores e inhibidores de la proliferación celular y de la apoptosis (Hruban, 2008; Jaffe, 2002) (Figura 7). En el control del ciclo celular, existen unas combinaciones “clave” para la carcinogénesis, que son los trastornos genéticos y las alteraciones moleculares específicas para cada tejido, y que constituyen el objetivo de las dianas terapéuticas (Abdulkader, 2005).

El mecanismo genético en la progresión del ADP se caracteriza por una serie de eventos precoces y otros más tardíos (Yamamoto, 2000; Vogelstein, 1993). Los acontecimientos precoces más relevantes, incluyen la mutación de *K-ras*, los eventos intermedios son la inactivación de *p16* (Wileniz, 1998), la actividad de la telomerasa y la mutación del gen *Her-2/neu*; mientras que las alteraciones tardías implican la inactivación de *p53* y de *SMAD4/DPC*, la mutación de *BRCA2* (Goggins, 1996) y la sobre-expresión de la *Ciclina D1* (Hezel, 2006).

El oncogén *K-ras* está mutado en más del 90% de los casos (Hruban, 1993, Hingorani 2005). El gen supresor tumoral *p16* está inactivado en el 90% de los casos (Schutte, 1997; Attir, 2005). *p53* está inactivado en el 50-75% (DiGiuseppe, 1994) y *DPC4* tan sólo en la mitad (Luttges, 2001)

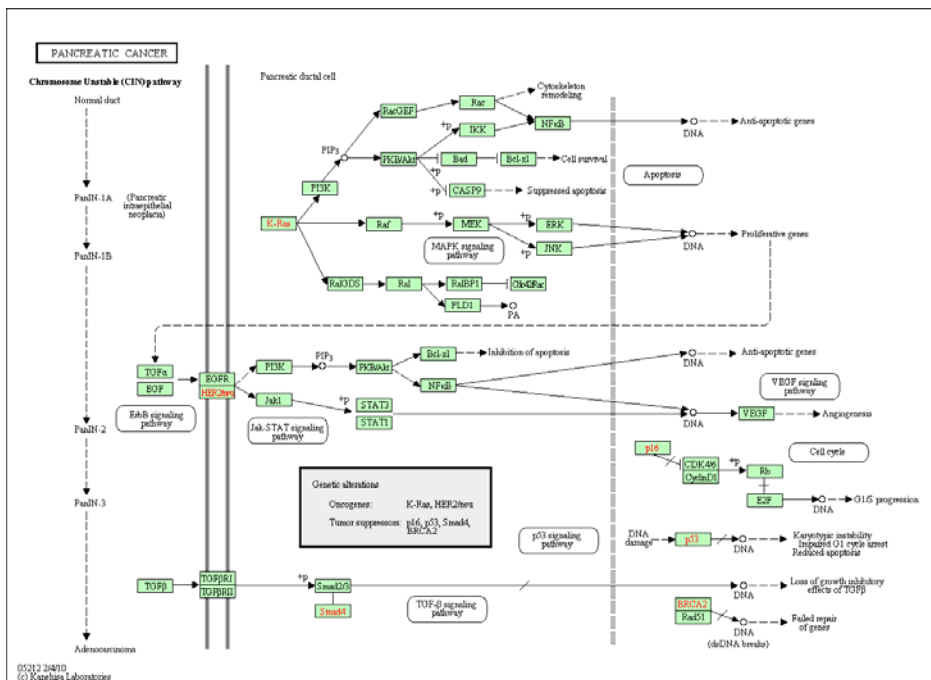


Figura 7. Alteraciones del ciclo celular en el ADP y lesiones precursoras.

### 2.2.1 Secuencia global del genoma y ADP.

Dentro del proyecto del estudio global de cáncer, se han publicado resultados de estudios-piloto de alteraciones genéticas en cáncer de páncreas, basados en una secuencia global del genoma de 24 casos de ADP, analizando mutaciones somáticas en 20.661 genes codificantes utilizando 1Mb SNP arrays. Se han encontrado 63 mutaciones intragénicas y/o delección homocigótica y amplificación, que se agruparon en 12 vías de señalización implicadas al desarrollo y progresión entre 67% y 100% de ADP (Tabla 5 y Figura 8) (Jones, 2008)

Regulatory process or pathway	Number of genetically altered genes detected	Fraction of tumors with genetic alteration of at least one of the genes	Representative altered genes
Apoptosis	9	100%	<i>CASP10, VCP, CAD, HIP1</i>
DNA damage control	9	83%	<i>ERCC4, ERCC6, EP300, RANBP2, TP53</i>
Regulation of G <sub>2</sub> /S phase transition	19	100%	<i>CDKN2A, FBXW7, CHD1, APC2</i>
Hedgehog signaling	19	100%	<i>TBX5, SOX3, LRP2, GLI1, GLI3, BOC, BMPR2, CREBBP</i>
Homophilic cell adhesion	30	79%	<i>CDH1, CDH10, CDH2, CDH7, FAT, PCDH15, PCDH17, PCDH18, PCDH9, PCDHB16, PCDHB2, PCDHGA1, PCDHGA11, PCDHGC4</i>
Integrin signaling	24	67%	<i>ITGA4, ITGA9, ITGA11, LAMA1, LAMA4, LAMA5, FN1, ILK</i>
c-Jun N-terminal kinase signaling	9	96%	<i>MAP4K3, TNF, ATF2, NFATC3</i>
KRAS signaling	5	100%	<i>KRAS, MAP2K4, RASGRP3</i>
Regulation of invasion	46	92%	<i>ADAM11, ADAM12, ADAM19, ADAM5220, ADAMTS15, DPP6, MEPIA, PCSK6, APG4A, PRSS23</i>
Small GTPase-dependent signaling (other than KRAS)	33	79%	<i>AGHGEF7, ARHGEF9, CDC42BPA, DEPDC2, PLCB3, PLCB4, RP1, PLXNB1, PRKCG</i>
TGF-β signaling	37	100%	<i>TGFBR2, BMPR2, SMAD4, SMAD3</i>
Wnt/Notch signaling	29	100%	<i>MYC, PPP2R3A, WNT9A, MAP2, TSC2, GATA6, TCF4</i>

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 321 26 SEPTEMBER 2008

**Tabla 5. Vías de señalización genéticamente alteradas en la mayoría de los ADP.**

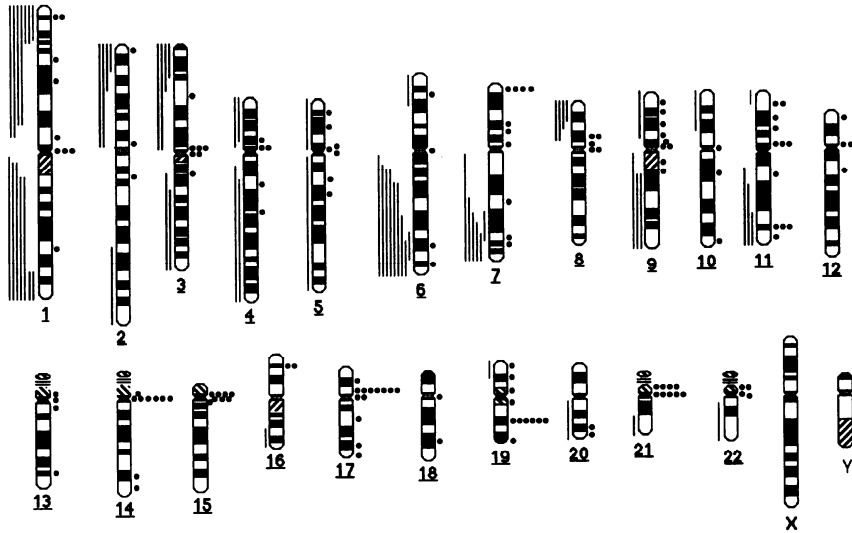


**Figura 8. Vías de señalización y procesos alterados en el ADP.**

### **2.2.2 Alteraciones citogenéticas en ADP.**

La complejidad genética de muchas neoplasias humanas refleja numerosas alteraciones estructurales cromosómicas. Sin embargo, los conocimientos de anomalías somáticas en el ADP eran casi nulos hasta los años 90 del siglo pasado, cuando un grupo de investigadores de Baltimore (Maryland, USA) publicaron resultados de estudios citogenéticos en cáncer de páncreas. Los resultados revelan un cariotipo complejo en el ADP (más de 3 alteraciones). En una serie de 62 tumores primarios, se describen la ganancia en los cromosomas 20 y 7, como hallazgo frecuente, seguido de delección en los cromosomas 18, 13, 12, 17 y 6. Asimismo se encontraron 209 “breakpoints”, entre ellos las translocaciones frecuentes se observaron en 1p, 6q, 7q y 19p (Figura 9) (Griffin, 1995).

Los estudios posteriores del mismo centro en una serie mas corta de 16 ADP, demostraron un cariotipo anormal en 14 neoplasias, entre ellos un 65% de pérdida de heterocigidad (LOH) y delecciones más frecuentes en cromosomas 13 y 18 (Brat, 1997)



**Figura 9. Diagrama de alteraciones estructurales cromosómicas en 44 ADP.** Las líneas en la parte izquierda indican áreas de deleciones frecuentes; los puntos en la parte derecha corresponden a "breakpoints" de translocaciones.

### 2.2.3 Síndromes hereditarios y ADP

Aproximadamente 3%-10% de los ADP pertenecen al grupo de cáncer familiar sin una causa genética reconocida en la mayoría de los casos (Lynch, 1990). Algunos estudios demuestran la agregación familiar del ADP, lo que sugiere etiología genética de posible forma de herencia autosómica dominante (Ghadirian, 1991).

Sin embargo, existen síndromes familiares canónicos que aumentan el riesgo de desarrollo del ADP (Tabla 6).

Entre ellos se destacan la pancreatitis hereditaria, causada por una mutación en línea germinal del *tripsinógeno catiónico*, que cursa con brotes de pancreatitis aguda severa y riesgo aumentado en el 40% de padecer ADP en personas afectadas (Lowenfels, 1997).

Otro síndrome conocido FAMM (Familiar Atypical Multiple Mole Melanoma) asociado con mutación germinal del gen *p16* incrementa el riesgo de desarrollo tanto de melanoma como de ADP (Whelan, 1995).

La mutación germinal de *BRCA2* descrita en cáncer familiar de mama, se encuentran en un 7% de los ADP con predisposición familiar sobre todo en la población judía (Ozcelik H, 1997).

Los pacientes con el síndrome de Peutz-Jegher e inactivación bialélica del gen *STK11/LKB1* pueden padecer ADP (Su, 1999).

Por último, el síndrome de cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), asociado con mutación germinal en los genes reparadores del ADN (“mismatch repair”) e inestabilidad de microsatélites, se manifiesta con un riesgo de aparición de múltiples cánceres (endometrial, colorrectal, gástrico y ovárico). Se han descrito también casos de ADP en este síndrome, y por otro lado los mismos defectos genéticos se encuentra en un 4% de los ADP (Goggins, 1998).

Síndrome	Tipo de herencia	Gen (cromosoma)	Riesgo de desarrollo del ADP (%)
Adenocarcinoma pancreático familiar precoz asociada a diabetes méltus	autosómico dominante	desconocido	30%; aumento en 100 veces del riesgo del ADP
Pancreatitis hereditaria	autosómico dominante	<i>trypsinogen catiónico</i> (7q35)	30%; aumento en 50 veces el riesgo del ADP
FAMM	autosómico dominante	<i>p16/CMM2</i> (9p21)	10%
Cáncer de mama familiar	autosómico dominante	<i>BRCA2</i> (13q12-q13)	5-10% población judía
Ataxia-telangiectasia	autosómico recesivo	<i>ATM</i> , <i>ATB</i> , otros (11q22-q23)	desconocido
Peutz-Jegher	autosómico dominante	<i>STK11/LKB1</i> (19p)	desconocido
HNPCC	autosómico dominante	<i>MSH2</i> (2p), <i>MLH1</i> (3p), otros	desconocido
Cáncer pancreático familiar	posible autosómico dominante	desconocido	desconocido, incremento en 5-10 veces con parientes de 1er grado afectados por ADP

**Tabla 6. Síndromes genéticos e incremento del riesgo de desarrollo del ADP.** (Mendelian Inheritance in Man: [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)): FAMM- síndrome de nevus atípico múltiple-melanoma; HNPCC- síndrome de cáncer de colon hereditario no polipósico

### 2.3 Trabajo previo de caracterización del ADP.

El estudio propuesto en esta Tesis nace como ampliación de un trabajo previo, presentado en el contexto del Diploma de Estudios Avanzados (DEA), 09/2008: “Adenocarcinoma ductal de páncreas: características inmunofenotípicas y moleculares asociadas a progresión tumoral”.

Las conclusiones que obtuvimos en la serie reducida de 28 casos de ADP eran las siguientes:

1. La resección completa o incompleta del tumor, o la existencia de la enfermedad residual microscópica, son los datos clínicos más importantes en relación con la supervivencia de los enfermos.
2. Las mutaciones de *K-ras* constituyen un evento que aparece en el 48% de los tumores cuando se examina el exón 2 (codón 12), pero no existe una relación entre dicha mutación y la supervivencia de los pacientes.
3. La “inmunohistoquímica molecular” asociada al uso de “tissue microarrays”, es una buena herramienta de investigación, que aporta información útil en el contexto clínico. En concreto se ha constatado que:
  - a) La expresión de la proteína p16 y la negatividad para p53 se asocian con peor pronóstico.
  - b) La expresión de la ciclina B1 y la ciclina D2, guardan relación con una menor supervivencia.

### **3. EPIGENÉTICA**

#### **3.1 Definición**

La epigenética consiste en cambios hereditarios en las pautas de expresión génica, que están mediados por mecanismos diferentes a las modificaciones de la secuencia nucleotídica primaria de un gen.

La regulación epigenética incluye metilación del ADN, modificación de histonas, y alteraciones de expresión génica post-transcripcionales, basados en microRNAs de interferencia.

#### **3.2 vista histórica y paradigma de la epigenética.**

El nacimiento de la epigenética, procede de un cruce de caminos como la biología del desarrollo y la genética que ocurrió en los años 40 del siglo XX. Uno de los patriarcas en este camino de aquella época, era Sir Conrad Waddington, profesor de Genética de la Universidad de Edimburgo, que introdujo la teoría de plasticidad fenotípica y epigenética, se refería a la epigenética, como amalgama entre genética Mendeliana clásica y epigénesis, haciendo hincapié en su importancia en el desarrollo embrionario (Harlsberg, 2010). Waddington definía la epigenética como “una interacción casual entre genes y sus productos que está conformando el fenotipo”, lo que en el lenguaje contemporáneo corresponde a “una actividad heredada del ADN, que no depende de la secuencia nativa del mismo” (Esteller, 2008).

Desde las primeras publicaciones de Waddington, hasta los años 70 del siglo XX, los mecanismos de la epigenética todavía quedaban desconocidos, así como algunos fenómenos asociados, como diferenciación de célula troncal de médula ósea o desactivación del cromosoma X en los mamíferos.

Las primeras sugerencias de metilación o demetilación como un proceso biológico importante aparecieron basados en los cambios enzimáticos de la citosina en el ADN que propusieron Griffith y Mahler en 1969 en el trabajo sobre memoria a largo plazo, y más tarde Riggs (1975), que fue el primero que describió el fenómeno de desactivación del cromosoma X. Independientemente y simultáneamente Holliday y Pugh publicaron trabajos similares en 1975.

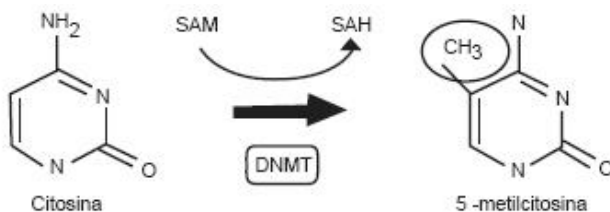
El “renacimiento” del interés por la epigenética, se debe a una revisión de estudios de Waddington, (Holliday, 1987) que fue “un papel crítico que encendió la mecha para explosión de utilización de epigenética en 1990” (Haig, 2004)

¿Cuáles son las novedades en el paradigma de la epigenética? (Halsberger, 2010)

- (i) Son cambios funcionales y no estructurales del ADN que forman parte de una maquinaria de regulación génica.
- (ii) Se observan cambios epigenéticos continuos cuantitativos que no se acumulan (a diferencia de mutaciones). Como ejemplo, se ha demostrado la importancia del ratio de hipo/hipermetilación en cáncer.
- (iii) Los cambios epigenéticos son reversibles.
- (iv) Los cambios epigenéticos son heredables.
- (v) Los cambios epigenéticos ocupan el espacio entre genes y factores medioambientales, que puede explicar algunas relaciones “misteriosas” entre mutaciones espontáneas y selección, en el contexto de la teoría neo-Darwiniana
- (vi) Los cambios epigenéticos son predictivos.

### 3.3 Bases bioquímicas de la metilación del ADN. Islas CpG

Desde el punto de vista bioquímico, la metilación consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas (C) del ADN, situadas previa y contiguamente a una guanina (G). Esta modificación se realiza y se mantiene mediante interacción de una familia de enzimas las DNA-metiltransferasas (DNMTs), que incluye DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (Okano, 1998). (Figura 10).



**Figura 10. Metilación del ADN** ocurre sobre el carbono-5 de la citosina. SAM: S-adenosil-metionina, donador del grupo de metilo; SAH: S-adenosil-homocisteína; DNMT: ADN-metiltransferasa

El papel biológico de la DNMT1 consiste en la conservación del patrón paterno de metilación en una hebra del ADN recién replicada. Otras dos enzimas de la misma familia (DNMT3a y DNMT3b) actúan como metiltransferasas en el periodo de establecimiento del genoma durante pre-implantación, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, en el periodo de pre-implantación (Okano, 1999).

Teniendo una estricta afinidad de las metiltransferasas por la secuencia CpG, está descrito el fenómeno de distribución irregular de dicha secuencia a lo largo del genoma humano. Más del 98% de las regiones CpG están situadas de forma dispersa. Sólo una fracción menor de unos 2% presenta regiones de 1000-1500 pb con alta densidad de dinucleótidos CpG ("islas CpG") y se asocian con la región promotora de aproximadamente el 60% de los genes codificantes (Bird, 1986).

En las células somáticas normales humanas, se ha descrito un cambio del perfil de metilación de islas CpG relacionado con la edad, y durante el desarrollo de ciertas enfermedades, tales como el cáncer (Matsubayashi, 2005).

Los estudios recientes de un análisis completo en series grandes de perfiles de metilación, demuestran una proporción entre 3% y 6-8% de islas CpG metiladas en tejidos normales (Weber, 2007; Dahl, 2007).

### **3.4 Papel de la metilación del ADN en procesos de desarrollo y enfermedad.**

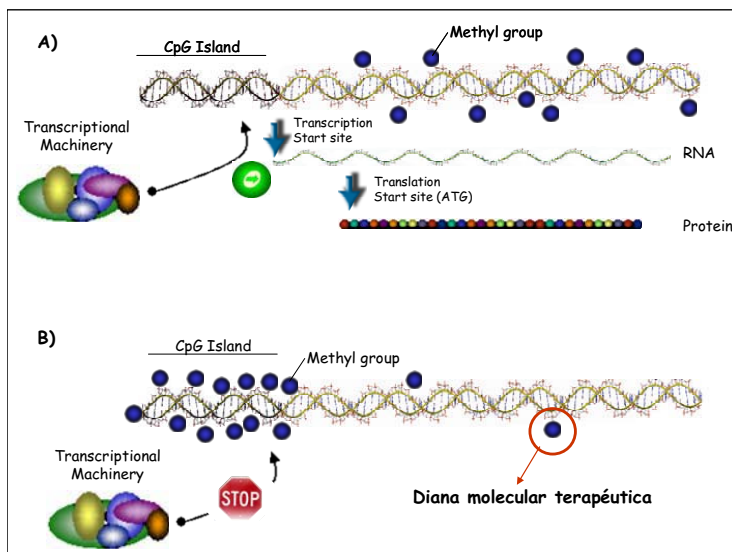
La metilación del ADN es un proceso que regula la expresión de numerosos genes en eucariotas. Ciertos procesos son constitutivamente regulados, como ocurre con el caso del “imprinting” de una de las copias del cromosoma X en mujeres, o la inactivación de las secuencias retrovirales (transposones) insertadas en el genoma. A esta metilación constitutiva y normal dentro de un organismo superior, hay que añadir aquellas que se producen en estados anormales (Paulsen, 2001).

La función de metilación del ADN es crucial en el periodo de desarrollo embrionario de los mamíferos (Holliday, 1997). En modelos de animales, se ha demostrado que ratones homocigotos knockout en DNMT1 o en DNMT3b no son viables, además, ratones knockout en DNMT3a mueren a las 4 semanas del nacimiento (Okano, 1999).

Los pacientes con mutación bialélica en DNMT3b manifiestan síndrome ICF, que cursa con inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales (Hansen, 1999). El síndrome de Rett asociado con el cromosoma X, se manifiesta con trastornos del desarrollo neural y retraso mental en mujeres, es otro ejemplo de enfermedad conocida que se basa en una mutación del gen *MeCP2*, que codifica una proteína ligada a regiones metiladas (Amir, 1999).

### 3.5 Epigenética y cáncer. Metilación aberrante del genoma.

El cáncer es una enfermedad genética y compleja, que se produce por acúmulo de alteraciones en genes de control del ciclo celular, reparación del daño en el ADN, apoptosis...etc. Desde hace algunos años se sabe que esa base genética del cáncer, tiene también mecanismos epigenéticos. La metilación de DNA es una de las alteraciones más importantes epigenéticas, y tiene un papel clave en el desarrollo de las enfermedades.



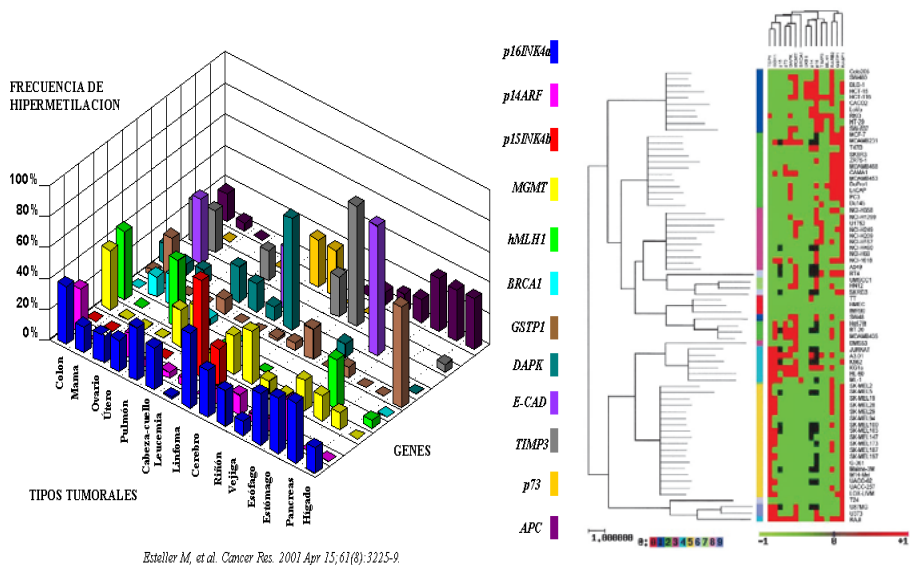
**Figura 11. Mecanismos de silenciamiento génico por metilación.**

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas, comparten dos cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina, que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; y segundo, hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores de tumor. Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes (Figura 11) y la hipometilación con la

sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (Esteller, 2001).

En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de *nov*, esta modificación se hace estable, y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad.

Respecto al fenómeno de metilación aberrante, en cáncer, se describe no sólo la diferencia cuantitativa de hipermetilación de promotor en un gen particular comparado con el tejido normal, sino la existencia de “perfiles de metilación” específicos para neoplasias derivadas de diferentes órganos (Esteller, 2001). (Figura 12).



**Figura 12.** Perfil de hipermetilación del promotor en diferentes neoplasias humanas.

Puesto que la metilación es fundamental en la regulación del silenciamiento de los genes, puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin necesidad de que se produzca una alteración en la secuencia del ADN, siendo uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica (Clark, 1994).

### **3.6 Papel de la metilación del ADN en el ADP.**

Los avances sobre estudios epigenéticos en las últimas décadas y sus aplicaciones tanto en la progresión tumoral, como en posibles dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos, abren un amplio campo de investigación en cáncer. A pesar de las multitudes alteraciones moleculares descubiertas en el ADP, este tipo de cáncer, sigue siendo un gran desafío científico, que asume los posibles mecanismos epigenéticos como un futuro de prevención, diagnóstico y tratamiento en esta enfermedad extremadamente agresiva y relativamente poco conocida (Omura, 2009).

#### **3.6.1 Alteraciones epigenéticas en las vías clásicas del ADP.**

Entre los genes supresores tumorales regulados por metilación aberrante en la región del promotor, responsable de la inactivación de la expresión, el primero y más clásico es *p16/CDKN2A*, silenciado por este mecanismo en el 30% de los casos (Schutte, 1997).

La *Ciclina D2* es otro ejemplo de gen clásico implicado en la regulación del ciclo celular. Se ha identificado desregulación de *Ciclina D2* mediante metilación aberrante del ADN en el 65,1% de los casos (en una serie de 109 tumores primarios) (Matsubayashi, 2003). Una metilación parcial de la región CpG se observa en el gen *CDKN1C/p57KIP2* que codifica para la proteína reguladora de ciclina-dependiente de kinasa, tanto en líneas celulares de ADP, como en las lesiones precursoras (IPMNs) (Sato, 2005).

La *Cadherina E* se encuentra desactivada mediante mecanismos epigenéticos en una proporción baja de los ADP, habitualmente asociado con un fenotipo

indiferenciado y mal pronóstico (Winter, 2008) Asimismo, la inactivación de *hMLH1*, de la familia de genes reparadores del ADN, no se correlaciona frecuentemente con hipermetilación del promotor en el ADP, y se asocia con inestabilidad de microsátélites y un fenotipo raro de carcinoma medular de páncreas (Yamamoto, 2001).

Otros genes supresores clásicos en el ADP, tales como *p53*, *SMAD4*, *STK11*, *VHL*, *Rb*, *PTEN* y *BRCA1*, presentan distintos mecanismos de desactivación, sin evidencia de alteraciones epigenéticas en cuando a metilación aberrante del promotor se refiere.

### **3.6.2 Metilación aberrante del promotor en genes reguladores. Interacción epitelio-matriz en el ADP.**

A parte de los estudios de mecanismos moleculares en el componente epitelial de cáncer, se han explorado genes y proteínas relacionados con microambiente neoplásico y transición epitelio-estromal, que regulan interacción entre células y matriz tumoral.

*SPARC* (Secreted Proteín Acidica and Rich in Cysteine) es un gen regulador de angiogénesis, proliferación, motilidad e interacción epitelio-estromal (Sato, 2003)

Los últimos estudios detallados sobre una serie de 40 ADP, tejido normal y pancreatitis crónica, describen un región CpG de este gen con metilación aberrante como un evento precoz en el ADP, y su utilidad como posible marcador biológico en el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas (Gao, 2010).

*TFPI-2* es una proteína que pertenece al grupo de genes inhibidores de proteasas, que protegen la matriz de la degradación, invasión y metástasis. Está demostrada la desactivación del gen *TFPI-2* tras hipermetilación del promotor en el 73% de los cánceres pancreáticos estudiados (Sato, 2005).

### **3.6.3 Metilación aberrante y la vía de señalización *Hedgehog* en el ADP.**

La vía de señalización *Hedgehog* es bien conocida por su importante papel en el periodo de embriogénesis de tejidos con derivación endodermal, en particular el tejido pancreático (Kawahira, 2003). En los últimos años se ha demostrado su implicación en la cancerogénesis de muchas neoplasias humanas.

*HHIP* (Human Hedgehog Interacting Protein) es uno de los genes de dicha familia que codifica para una glicoproteína de membrana con afinidad similar a otra proteína Patched (Ptc-1), cuya función consiste en la regulación negativa de la vía de señalización *Hedgehog*. *HHIP* se localiza en una región cromosómica (4q31.21), con frecuente pérdida alélica en cáncer de páncreas (LOH). La hipermetilación del promotor de *HHIP* en el 80% de líneas celulares de ADP, en el 46% de ADP primario y en el 78% de ADP xenograftos, con ausencia de alteraciones epigenéticas en el tejido normal, podría explicar el mecanismo de silenciamiento de este gen (Martin, 2005).

### **3.6.4 Estudios globales de metilación en el ADP.**

Los avances tecnológicos en la última década aplicados a las ciencias biomédicas, permiten realizar unos estudios masivos en varios campos de la Biología Molecular, tales como las técnicas de microarrays, que completan y amplían la visión global sobre conocimientos empíricos de mecanismos moleculares del cáncer.

Un análisis comparativo de perfiles de expresión génica en el ADP antes y después del tratamiento, ha descrito 475 genes candidatos líneas celulares de ADP, confirmándose una desregulación tras metilación aberrante del promotor en algunos de estos genes (Sato, 2003 y 2006).

Otros estudios masivos de promotores de 600 genes en líneas celulares de ADP y tejido pancreático normal, han demostrado metilación aberrante en centenares de estos genes en el ADP comparados con tejido no tumoral (Omura, 2008).

El último trabajo sobre patrón de metilación en el ADP realizó un estudio de 1505 CpG islas en 807 genes, demostrando 289 regiones CpG con metilación en el tejido tumoral diferente del normal, como resultado se presenta una lista de 23 genes candidatos hipermetilados y 35 genes hipometilados en el cáncer de páncreas (Tan, 2009).

### **3.7 Nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas del cáncer basadas en alteraciones epigenéticas.**

Los conocimientos adquiridos sobre alteraciones epigenéticas en el ADP, sobre todo los que muestran hipermetilación de promotor de determinados genes como un evento temprano y anómalo en la progresión tumoral, se convierten en una herramienta atractiva para la utilización de genes implicados como marcadores tumorales. El método sencillo y de alta sensibilidad consiste en una PCR específica de metilación (MSP) o MSP cuantitativa (QMSP), utilizando como material accesible el plasma y/o jugo pancreático.

Entre los posibles biomarcadores en el ADP, se han descrito los genes *TFPI-2*, *p16*, *ppENC* (preproenkefalina), *SPARC*, *NPTX2*, *ciclina D2* y *p14*. Se ha demostrado que la concentración de más del 1% en 2/5 genes hipermetilados (*TFPI-2*, *p16*, *ppENC*, *SPARC* y *NPTX2*) detectados mediante QMPS en jugo pancreático, revelando una clara diferencia entre pacientes con ADP y otros con pancreatitis crónica o páncreas normal (Matsubayashi, 2006).

Otros resultados de estudio en material endoscópico de cepillado de la vía biliar y conducto pancreático en 130 pacientes mediante técnicas de QMPS y un panel de 3 genes (*NPTX2*, *Ciclina D2* y *TFPI*), detectan 73,2% de casos de ADP con

hipermetilación en más de un gen, comparado con 13,6% de casos positivos en los individuos sanos (Parsi, 2008).

La validación de marcadores moleculares específicos en plasma es un medio diagnóstico en cáncer de interés clínico especial, aunque los datos actuales varían y están pendientes de confirmar y validar, es prometedor la posibilidad de detección de alteraciones genéticas y epigenéticas en el ADN de células tumorales circulantes, aunque requiere nuevos avances tecnológicos, dado que la concentración de ADN alterado tumoral en los estadios iniciales es muy baja (inferior al 0,2%) (Diehl, 2005).

El protocolo de tratamiento del ADP adyuvante tras intervención quirúrgica, y en casos no operables, incluye quimioterapia de base con Gemcitabina. Numerosos ensayos de tratamiento en combinación con este fármaco no han demostrado efecto comparable con la quimioterapia convencional (Rivera, 2009). En estos estudios, sólo una combinación de Tarceva (inhibidor de EGFR kinasa) con Gemcitabina, demostró beneficio clínico respecto a la supervivencia en pacientes con ADP (Moore, 2007). La sensibilidad de células tumorales pancreáticas para la Gemcitabina, es bien conocida y demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*, así como el fenómeno de resistencia a Gemcitabina sin identificar subyacentes a esta última.

Es deseable, por tanto, encontrar nuevos agentes alternativos de quimioterapia utilizando la patogénesis molecular del ADP. El tratamiento epigenético, es una de las ramas de quimioterapia moderna, que provoca inversión a una expresión génica normalizada mediante dianas de efectores epigenéticos, como ADN metiltransferasas y deacetilasas de histonas (Issa, 2009 y 2010), compuestos que recuperan la función de los genes supresores tumorales, inactivados por mecanismos epigenéticos. Actualmente se utilizan algunos de los nuevos fármacos basados en modificaciones epigenéticas en enfermedades hematológicas (Tabla 7)

EPIGENETIC-ACTING DRUG	CLINICAL INDICATION	MAJOR DATA	SUPPORTING LITERATURE
DNA methyltransferase inhibitors			
5-azacytidine (azacitidine)	Symptomatic MDS	16% overall response rate; 66% hematologic improvement/transfusion independence	Kaminskas 2005 <sup>137</sup> Fenaux 2009 <sup>138</sup>
5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)	Intermediate and High-risk MDS	73% objective response rate; 34% complete response rate	Kantarjian 2007 <sup>139</sup>
Histone deacetylase inhibitors			
Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat)	Progressive, persistent, or recurrent cutaneous T-cell lymphoma	30% objective response rate	Mann 2007 <sup>140</sup>
Romidepsin (depsipeptide)	Progressive, persistent, or recurrent cutaneous T-cell lymphoma	34% overall response rate; 6% complete response rate	Piekarz 2009 <sup>141</sup>

**Tabla 7. Nuevos agentes de tratamiento epigenético** aprobados por FDA en las enfermedades hematológicas (MDS: síndrome mieloproliferativo crónico) (Issa, 2010)

En el cáncer de páncreas, aún no existen agentes de tratamiento epigenético, tan solo propuestas, sobre todo relacionadas con la vía de señalización *Hedgehog* basadas en las alteraciones descritas a nivel de la acetilación de histonas (Freeman, 2009).

## — ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

Conocida la evolución fatal del ADP con las técnicas clásicas de tratamiento con quimioterapia, radioterapia y cirugía, se demuestra que las alteraciones moleculares, encontradas hasta la fecha, no aportan dianas terapéuticas, ni han sido significativas para el esclarecimiento de los fenómenos biológicos que desencadenan la enfermedad.

Se propone buscar nuevas alternativas que ayuden a dicho esclarecimiento.

Seleccionamos las alteraciones epigenéticas, como aproximación experimental. En este trabajo se muestran resultados preliminares de lo que será un estudio más complejo en el tiempo y la forma.

El objetivo, encontrar una "**huella epigenética**" que nos permita identificar diversos subtipos moleculares del ADP, que a su vez pueda tener correlación con la evolución clínica, pudiendo usarse en un futuro como factor diagnóstico y pronóstico, y/o diana terapéutica.

La misma aproximación se hará para definir diferencias epigenética (si las hubiese) entre tumor primario vs. metástasis.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **1. Selección del material.**

##### **1.1. Pacientes.**

Mediante la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica “Pat-win” del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), inicialmente hemos elegido 71 pacientes con diagnóstico de ADP en las piezas quirúrgicas de pancreatometomía parcial o total, procedentes del Servicio de Cirugía Digestiva y de Unidad de Transplantes (UTAB) del mismo centro en el periodo entre 1995 y 2009.

Los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico, llevaron un estudio radiológico preoperatorio, y a partir del año 2005 el diagnóstico preoperatorio con las técnicas de ECO-endoscopia con aspirado de material en masa tumoral para el estudio histopatológico. Clínicamente todos los casos presentaban de inicio una neoplasia resecable.

El seguimiento de la mayoría de los pacientes se realizó en el Servicio de Oncología Médica del CHUS, con el tratamiento estandarizado de quimioterapia y radioterapia adyuvante, controles periódicos con imágenes radiológicas y de marcadores tumorales de seguimiento (CA19.9 y CEA).

Los datos de cada paciente habían sido recogidos de las Historias Clínicas convencionales, y en los últimos 2 años a través del sistema informático de Historias Clínicas informatizadas “Ianus”. A partir del Archivo de Historias Clínicas del CHUS y del Archivo de Servicio de Anatomía Patológica del CHUS se consultaron los siguientes datos de cada paciente: edad, género, hallazgos quirúrgicos y tipo de intervención, estadio clínico, aparición de recidiva local y/o enfermedad metastásica y supervivencia.

## **1.2 Selección de muestras.**

De cada pieza quirúrgica de pancreatectomía parcial o total con diagnóstico de ADP, hemos seleccionado tras el estudio histopatológico 188 muestras iniciales para el estudio, correspondientes a tejido tumoral, tejido normal y metástasis. De cada muestra, que etiquetamos con su número de referencia, hemos extraído el ADN, comprobando su cantidad y calidad (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific), quedándonos al final con 76 muestras patológicas (61 de tumor primitivo, 13 de metástasis y 2 recidivas) de 61 pacientes. Paralelamente se han estudiado 62 muestras de tejidos normales. Hemos excluido el resto de muestras por problemas técnicos (ADN degradado, escasa cantidad de ADN, falta de datos clínicos, ... etc.)

## **2. Estudio histopatológico.**

Las piezas quirúrgicas de pancreatectomía remitidas de los quirófanos han sido fijadas en formol tamponado (10%) durante 24 horas, e incluidas en parafina de acuerdo con los procedimientos estandarizados del Servicio de Anatomía. De cada bloque de parafina se realizaron secciones seriadas de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, teñidas con hematoxilina-eosina (H&E).

De 71 casos diagnosticados de ADP, se disponía de bloques de parafina representativos (una media de 15 bloques por paciente) y en algunos casos de material congelado (tejido tumoral y normal). En todos los casos se revisaron las preparaciones histológicas teñidas con H&E que permitieron seleccionar los bloques de parafina más característicos.

Para cada tumor se marcaron las zonas correspondientes a tejido tumoral que supera el 80% de la muestra, tejido normal y metástasis ganglionares. El diagnóstico morfológico se evaluó de acuerdo con los criterios de la Clasificación de Tumores del Sistema Digestivo de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En aquellos casos

dudosos en los que la localización tumoral proximal y/o la morfología planteaba el diagnóstico diferencial entre el ADP y el ampuloma (carcinoma derivado del epitelio de tipo intestinal, procedente del revestimiento de conducto de Wirsung), se realizó el estudio inmunohistoquímico para determinar la expresión de citoqueratina 20 y citoqueratina 19. Tras teñir con H&E los cortes de control, para el estudio inmunohistoquímico, se utilizó un *kit* con un segundo anticuerpo universal que usa un polímero de dextrano ligado a un conjugado-peroxidasa (Dako, EnVision peroxidasa/DAB; Dako, Glostrup, Denmark), con el fin de evitar los falsos positivos por la avidina endógena.

Entre los casos elegidos para el estudio hemos consultado los datos del Banco de Tumores del Servicio de Anatomía Patológica del CHUS, encontrando 42 muestras válidas congeladas tumorales y normales. La representación y la proporción del tejido tumoral en el material congelado se verificó mediante el examen de secciones realizadas en el Criostato y teñidas con H&E.

Una vez finalizado la selección de muestras incluidas en parafina y congeladas, se realizaron cortes de las zonas marcadas (en una media de 5-10 cortes de 5 $\mu$ m) que se recogieron en tubos eppendorf rotulados con el número de referencia correspondiente para extracción del ADN, que se llevo a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del CHUS.

### **3. Parámetros clínico-patológicos utilizados en el estudio.**

Hemos elegido los parámetros clínico-patológicos clásicos (edad, género, estadio clínico, estadio histopatológico, localización y tamaño tumoral y supervivencia) que se recogen en la Tabla 8:

referencia	edad	sexo	estadio clínico pTNM ®	localiz.tumor	tamaño tum	SV	
1	56	V	IIA	pT3N0R0	cabeza	3	13
2	56	V	IA	pT1N0R0	cabeza	1,5	120+
3	66	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	4	21
4	79	V	IIB	pT3N1R0	cola	4	1
5	66	V	IIB	pT3N1R0	cab/cuerp/col	10	14
6	58	M	IB	pT2N0R0	cabeza	5,3	77
7	60	V	IIB	pT3N1M0R1	cabeza	2	4
8	70	V	IIA	pT3N0R1	cabeza	4,3	6
9	76	M	IIB	pT3N1R0	cabeza	2,3	30+
10	67	V	IIB	pT2N1R0	cabeza	3	9
11	76	M	IA	pT1N0R1	cabeza	1,6	30
12	64	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	2	24+
13	59	M	IV	pT3N0M1R0	cola	8	19
14	69	M	IIB	pT3N1M0R0	cabeza	2,4	22+
15	68	M	IIB	pT3N1R0	cabeza	2	20
16	58	M	IIB	pT3N1R0	cabeza	2	27
18	71	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,5	11+
19	74	M	IIA	pT3N0R1	cabeza	3,5	7+
20	65	M	IIB	pT3N1R0	cabeza	3,4	11+
21	44	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,7	9+
22	60	M	IIA	pT3N0R1	cola	4,1	5+
23	79	V	IA	pT1N0R0	cabeza	1,5	2
24	73	M	IIA	pT3N0R0	cabeza	2,7	9+
25	60	M	IIB	pT3N1R1	cabeza-cuerp	2,5	3+
26	73	M	IIA	pT3N0R1	cabeza	2	4+
27	70	M	IIB	pT2N1R0	cabeza-cuerp	2,8	2+
28	66	V	IV	pT3N1M1R2	cabeza-cuerp	2,5	4+
29	72	V	IA	pT1N0R0	cabeza	1	48
31	76	M	IIA	pT3N0R0	cabeza	4	57
33	51	V	IIB	pT2N1R1	cabeza	5	68
35	51	V	IIB	pT2N1R1	cabeza	5	68
36	77	M	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,3	6
39	70	V	IIA	pT3N0R0	cabeza	4	51
41	63	V	IIA	pT3N0R1	cabeza	8	17
43	63	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,5	18
45	59	M	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,5	9
47	68	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	3	6
49	68	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	3	6
50	44	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2	8
53	74	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2	6
55	74	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2	6
56	70	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	4	6
60	76	V	IA	pT1N0R0	cabeza	0,5	1
61	51	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	1,7	20
63	60	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	3,5	49
66	78	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	3,5	56
74	78	M	IV	pT3N1M1R0	cabeza	3,6	2
77	61	M	IIA	pT3N0R0	cabeza	0,8	6
79	51	V	IIB	pT1N1R0	cabeza	2	11
81	56	M	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,5	17
84	77	V	IIA	pT2N0R0	cabeza	3,2	15
86	69	M	IIA	pT3N0R0	cabeza	2	48+
88	73	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	2,5	20
114	75	V	III	pT4N1R0	cola	8,5	10
115	57	V	IIB	pT2N1R1	cabeza	5	10+
117	57	V	IIB	pT2N1R1	cabeza	5	10+
118	59	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	3	13
120	59	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	3	13
121	75	V	IIA	pT3N0R0	cabeza	0,8	3
125	74	V	IIA	pT3N0R1	cabeza	2,7	2+
127	58	V	IIA	pT3N0R1	cabeza	1,4	5
129	58	V	IIA	pT3N0R1	cabeza	1,4	5
130	72	M	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,6	6
132	72	M	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,6	6
133	41	V	IA	pT1N0R0	cabeza	1,4	8+
135	63	M	IIA	pT3N0R0	cabeza	3,4	6+
137	75	V	IIA	pT3N0R0	cabeza	3	4+
139	64	M	IIA	pT3N0R0	cabeza-cuerp	3	3+
163	58	M	IIB	pT3N1R0	cabeza	2	3
167	64	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	2	24+
172	44	V	IIB	pT3N1R1	cabeza	2,7	9+
173	60	M	IIB	pT3N1R1	cabeza-cuerp	2,5	3+
174	73	M	IIA	pT3N0R1	cabeza	2	4+
182	67	V	IIB	pT2N1R0	cabeza	3	9
187	63	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	1	46+
188	63	V	IIB	pT3N1R0	cabeza	1	46+

Tabla 8. Parámetros clínico-patológicos.

#### 4. Extracción del ADN

Se realizó según el protocolo aconsejado para el *kit de aislamiento* de ADN genómico Puregene (GENTRA, USA). Brevemente, los cortes de parafina se someten a Xilol y Etanol para su desparafinación. Los fragmentos de tejido se incubaron a 65°C en una solución de lisis celular y proteinasa K (1 mg/ml) hasta observar lisis tisular total. Las proteínas fueron eliminadas por precipitación en acetato de amonio 7,5M pH 7,5. El ADN fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol 70%, resuspendido en solución de hidratación (buffer TE pH 8,0) y almacenado a -20°C.

##### *Protocolo de extracción de ADN*

Soluciones necesarias: Buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), Proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), TE 1X pH.8 (autoclavado), Etanol o isopropanol absolutos a -20 °C y opcionalmente RNasa A (10 mg/ml).

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (unos 20 mg) en un Eppendorf de 1.5 o 2ml.
2. Agregar 500 ul de buffer de lisis y 10 ul de proteinasa K.
4. Incubar a 55°C, con agitación, un mínimo de 2 horas o hasta toda la noche.
5. Centrifugar al máximo (15.000 rpm) por 15 min.
7. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Evitar acarrear la fracción sólida del fondo
8. Agregar 300 ul de cloruro de sodio, agitar brevemente y centrifugar al máximo 15 min.
9. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de isopropanol a -20°C o doble volumen de etanol a -20°C. Agitar lentamente, luego mezclar completamente.
10. Centrifugar 15 min. Descartar el sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet.
12. Lavar con 750 ul de etanol 70°, evitando perder o disgregar el pellet.
13. Descartar el alcohol. Secar en estufa a 37°C.
14. Resuspender en 100 ul 1xTE. Agitar e incubar a 55°C por 2 horas.
15. Guardar a -20°C.

## 5. Prueba de metilación específica mediante PCR (MSP).

### 5.1 Conceptos generales de la MSP y modificación del ADN con bisulfito.

La optimización de los métodos basados en el tratamiento del DNA con bisulfito sódico, permite el análisis de un número limitado de CpGs basándose en su estado de metilación (PCR específica de metilación, MSP) (Mills, 2002).

El bisulfito sódico convierte las citosinas no metiladas en uracilos, mientras las metiladas permanecen como tales. Esta reacción permite diferenciar DNA metilado del no metilado (Figura 13).

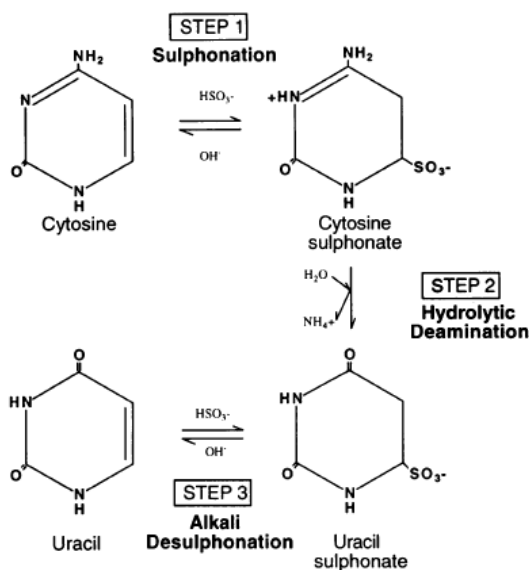


Figura 13: Conversión de la tras tratamiento del ADN con bisulfito sódico.

La PCR específica de metilación (MSP) es la técnica más utilizada para estudiar la metilación de islas CpG, comunes en los promotores de muchos genes. Las citosinas de las islas CpG se encuentran normalmente demetiladas en tejidos normales, pero se metilan en promotores de genes implicados en procesos celulares anormales como el cáncer (Figura 14).

La MSP es una de las técnicas más eficaces para estudiar los perfiles de metilación de estas regiones. Las diferencias obtenidas entre alelos metilados y demetilados al tratar con bisulfito sódico son la base de la PCR específica de metilación, y son especialmente útiles para el estudio de islas CpG por la abundancia de sitios CpG que contienen.

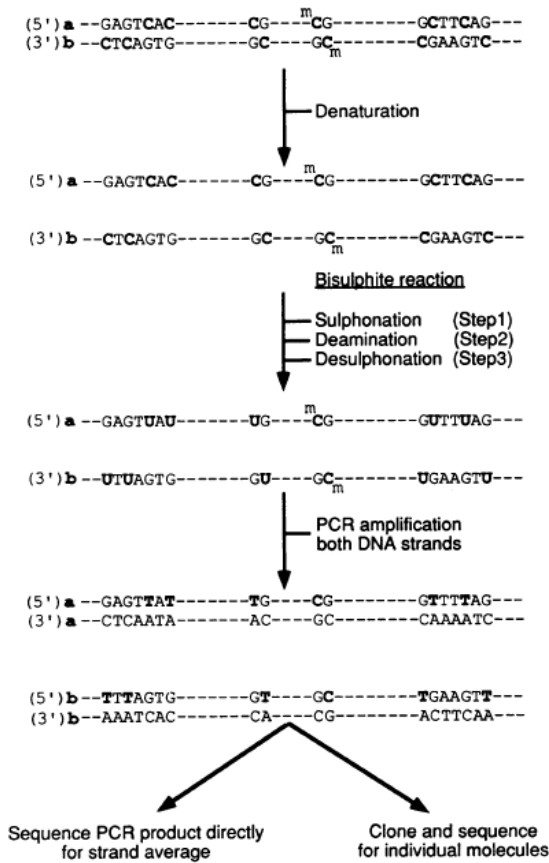


Figura 14: PCR específica de metilación (MSP)

El primer paso consiste en el tratamiento del ADN con bisulfito. Para ello se desnaturalizan las hebras del ADN nativo calentando a 95°C . Una vez abiertas las hebras se hace accesibles las regiones que contienen islas CpG para una reacción química con bisulfito sódico, que incluye sulfanización, deaminación y desulfonación de citosina no metilado, con el producto final de uracilo (Figura 13).

Tras la purificación y precipitación se obtiene fragmentos de ADN con secuencias transformadas o intactas según el estado inicial, siendo la modificación en ausencia de grupos de metilo unidos a secuencia CG y la conservación de secuencias CG unidos por grupo de metilo que impide la reacción con bisulfito (Figura 14).

El siguiente paso del proceso consiste en una PCR convencional con amplificación de regiones seleccionadas con una pareja de primers: uno de ellos está diseñado para secuencia no transformada con bisulfito (metilada), otro primer reconoce la secuencia que lleva el cambio tras el tratamiento con bisulfito sódico (C->U).

En resumen, para cada muestra de ADN modificado se realizan dos PCR, valorando el resultado en conjunto en el gel de agarosa.

## **5.2 Protocolo de MSP.**

### **5.2.1 Tratamiento con bisulfito sódico.**

Hemos utilizado un kit de metilación estandarizado (EZ DNA Methylation™ Kit, ZYMO RESEARCH, USA), que ha demostrado una alta eficiencia en el proceso de conversión de más del 99% de los residuos de Citosina no metilados a Uracilo, siendo más de 99% de protección de Citosina metilada y una cobertura de más de 80% del ADN.

Para cada reacción de PCR específica de metilación (MSP) utilizamos 1µg del ADN tratado previamente con bisulfito sódico.

El EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH, USA) consta de los siguientes componentes:

- *CT Conversion Reagent\**
- *M- Dilution Buffer*
- *M-Binding Buffer*
- *M-Wash Buffer\*\**
- *M- Desulphonation Buffer*
- *M-Elution Buffer*
- *Zymo-Spin™ IC columns*
- *Collection Tube*
- *CT Conversion Reagent* se remite en forma sólida en un tubo oscuro y se prepara para reacción al instante para uso inmediato, dada su fotosensibilidad. Para ello se añade 750µg del agua destilada y 210µg de *M- Dilution Buffer* al tubo de *CT Conversion Reagent*, agitando la mezcla durante 10 minutos en la temperatura ambiental.

\*\* Una vez iniciando la utilización del kit se diluye el *M-Wash Buffer* concentrado añadiendo 96% del etanol absoluto a 24 ml del Buffer.

El protocolo que se ha seguido fue el siguiente:

1. Añadir 5µl de *M-Dilution Buffer* a 1µl del ADN ajustando el volumen total hasta 50 µl con agua destilada en tubo de eppendorf rotulado.
2. Incubar la mezcla 30 minutos en temperatura 42°C.
3. Añadir 100 µl de *CT Conversion Reagent* recién preparado en cada tubo de mezcla.
4. Incubar los tubos 12-16 horas en 50° en Termomix en oscuridad

5. Incubar los tubos durante 10 minutos en la nevera (0-4°).

### **5.2.2 Precipitación y purificación del ADN tratado.**

6. Añadir 400 µl de *M-Binding Buffer* a *Zymo-Spin™ IC* columnas colocadas en los *Collection Tube* correctamente rotulados
7. Añadir a las mismas columnas el contenido del ADN modificado con bisulfito, cerrar las tapas de las columnas e invertir la mezcla varias veces
8. Centrifugar a máxima velocidad (14.000 x g) 30 segundos. Desechar el líquido de los *Collection Tube*.
9. Añadir 100 µl de *M-Wash Buffer* diluido a cada columna. Centrifugar a máxima velocidad 30 segundos.
10. Añadir 200 µl de *M-Desulphonation Buffer* a cada columna almacenando en la temperatura ambiente (20-30°C) durante 20-30 minutos. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
11. Añadir 200 µl de *M-Wash Buffer* a cada columna y centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos. Repetir el lavado 2 veces.
12. Colocar las columnas en tubos rotulados eppendorf de 1,5 ml. Añadir 12 µl de *M-Elution Buffer* directamente al fondo de la columnas y centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos, obteniendo ADN diluido en tubos eppendorf.
13. Guardar el ADN purificado en el arcón de -20°

### **5.2.3 PCR específica de metilación (MSP)**

La técnica de MSP se basa en el protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar.

Configuración de la reacción:

El sustrato que hemos utilizado para cada reacción consiste en 1 µl del ADN modificado con bisulfito sódico.

Los primers de PCR prediseñados se especifican en la Tabla 9 para una secuencia metilada (m) y una no metilada (u) de cada gen.

Gen		Forward primer 5'→3	Reverse primer 5'→3
<b>GSTP1</b>	M	TTCGGGGTGTAGCGGCGTC	GCCTCAATACTAAATCAGGACG
	U	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	CCACCCCAATACTAAATCACAACA
<b>p16</b>	M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC CGGACCGTAA
	U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAACCACAACCATAA
<b>Ciclina D2</b>	M	GGCGGATTTTATCGTAGTCG	CTCCACGCTCGATCCTTCG
	U	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	ACATCCTCACCAACCCTCCA
<b>RAR beta 2</b>	M	GAACGCGAGCGATTTCGAGT	GACCAATCCAACCGAAACG
	U	GGATTGGGATGTTGAGAATGT	CAACCAATCCAACCAAAACAA
<b>RASSF1A</b>	M	GTTGGTATTCGTTGGGCGC	GCACCACGTATACGTAACG
	U	GGTTGTATTTGGTTGGAGTG	CTACAAACCTTTACACACAACA
<b>HIN-1</b>	M	GGTACGGGTTTTTACGGTTCGTC	AACTTCTTATACCCGATCCTCG
	U	GGTATGGGTTTTTATGGTTTGT	CAAAACTTCTTATACCAATCCTCA

**Tabla 9. Secuencias de primers de MSP.** (M- secuencia metilada, U-secuencia no metilada)

Los componentes de reacción para una MSP de volumen final de 25 µl son los siguientes:

- Tampón de reacción 10x (*Buffer*)- 2,5 µl
- MgCl 2- 2 µl
- dNTPs – 2 µl
- *Forward* Primer- 1 µl
- *Revers* Primer – 1 µl
- Enzima polimerasa (*Taq*-polimerasa)- 0,2 µl
- ADN – 1 µl
- Agua destilada- 15,3 µl

#### **Elección de las condiciones de reacción:**

Las condiciones de reacción de una amplificación por PCR se componen del número total de ciclos a ejecutar, la temperatura y la duración de cada paso en los

ciclos. La decisión en cuanto a número de ciclos para ejecutar, se basa en la cantidad de material de ADN.

El primer paso de desnaturalización del ADN hace que todo el ADN pase a cadena sencilla, se realiza con temperatura de 94°C en 30 segundos.

El segundo paso en la que oligonucleótidos cebadores (primers) encuentran sus secuencias complementarias y se adhieren a ellas. Este punto es variable en cuanto a la temperatura (temperatura de *annealing*) que ajustamos según las características de los primers, siendo 57°C para *HIN-1*, *RASSF1A*, *Ciclina D2* y *GSTP1*, con duración de 45 segundos, y 60°C para *p16* y 55°C para *RAR-beta 2* con duración de 30 segundos.

Finalmente, el último paso en un ciclo de PCR es aquel en el que la ADN polimerasa está produciendo una copia complementaria del ADN diana a partir de la secuencia de cebador de PCR, se realiza con la temperatura habitual de 72°C, considerado como la temperatura óptima para buena estabilidad térmica de polimerasas.

Tras repetición de los ciclos descritos se añade un paso final de extensión de 7 minutos a las 72°C y conservación del producto final en la temperatura ambiente.

#### **5.2.4 Electroforesis del producto de PCR y visualización del resultado.**

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en *bufferTAE*, teñidos con bromuro de etidio.

En el gel de agarosa aparecen bandas entre 150-200 pares de bases en todas muestras amplificadas con primer no metilado por presencia de residuos de “contaminación” del tejido normal. Sin embargo la banda de la misma altura en

muestra con ADN modificado y amplificado con MSP con primer metilado aparece específicamente en los casos con regiones del promotor amplificados e islas CpG unidos a grupo de metilo

## **5.2 Secuenciación del ADN**

La Secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Durante treinta años la mayor parte de la secuenciación de ADN se llevó a cabo con el método de terminación de la cadena desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores en 1975

El método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger necesita una hebra molde de ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN, una ADN polimerasa con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN. La muestra de ADN se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y una ADN polimerasa. En cada reacción se añade solo uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). Estos didesoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer un grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de ADN.

La incorporación de un didesoxinucleótido en la cadena nascente de ADN termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de ADN de longitud variable. Los didesoxinucleótidos se añaden a concentraciones lo suficientemente bajas como para que produzcan todas las posibilidades de fragmentos y al mismo tiempo sean suficientes para realizar la secuenciación.

Una alternativa al marcado del cebador es el marcado de los terminadores de la cadena, un método conocido como "secuenciación por terminador fluorescente". La mayor ventaja de este método es que la secuenciación se puede llevar a cabo en una sola reacción, en lugar de en cuatro reacciones como en el método del cebador marcado. En una secuenciación por terminador fluorescente se marcan cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos que terminan la cadena con un colorante fluorescente diferente, con fluorescencias a diferentes longitudes de onda (Smith, 1986).

Este método es atractivo por su gran capacidad y rapidez y actualmente es el método de referencia en la secuenciación automatizada con analizadores de secuencia controlados por ordenador.

El método de secuenciado por terminador fluorescente junto con analizadores de secuencia de ADN de alto rendimiento se utiliza ahora para la inmensa mayoría de los proyectos de secuenciación, puesto que es más fácil de llevar a cabo y tiene un coste menor que los anteriores métodos de secuenciación.

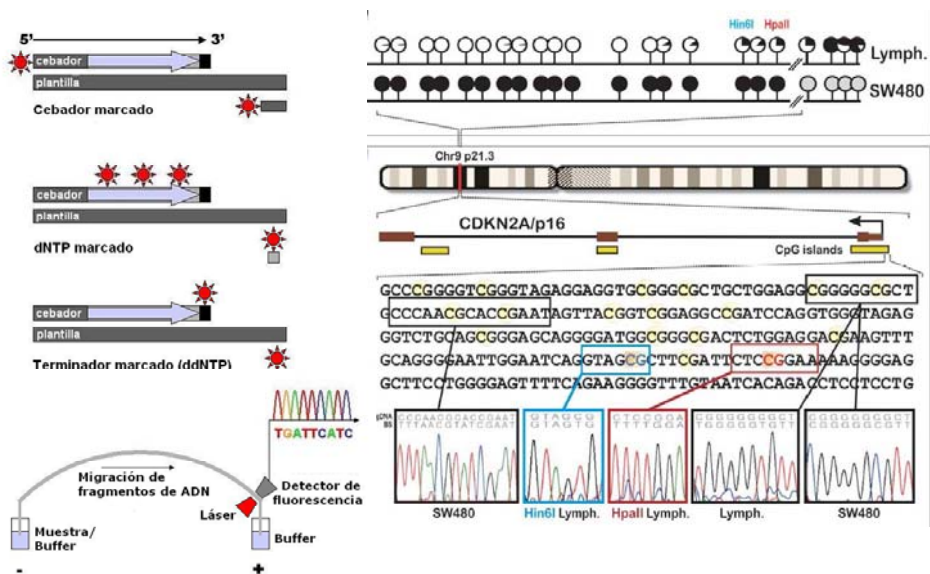


Figura 15. Esquema y resultados de secuenciación por terminador fluorescente.

## 6. Selección y descripción de los genes seleccionados.

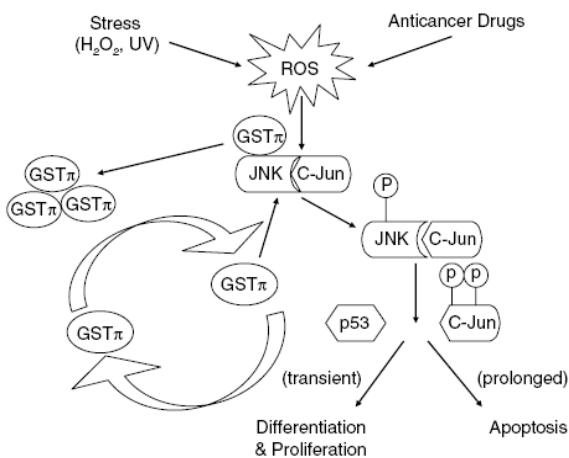
Se ha seleccionado 6 genes para el estudio mediante de PCR:

***GSTP1*, *RAR beta 2*, *p16*, *RASSF1*, *Ciclina D2* y *HIN1*,**

Para cada gen, se diseñaron dos parejas de primers para PCR dentro de la región del promotor, correspondientes a secuencia de promotor metilado (m) y no metilado (u) (Tabla 9).

### 6.1. *GSTP1* (Gluthatione S-transferase pi1).

La familia glutatión S-transferasa (GSTs) son un grupo de enzimas que juegan un papel importante en la detoxificación. Dependiendo de su estructura se dividen en 3 grandes clases alfa, mu y teta. *GSTP1* es crucial en el metabolismo xenobiótico, en la susceptibilidad en ciertos tipos de cáncer, como agente apoptótico, del desarrollo del SNC etc. *GSTP1* es un factor implicado a progresión en el carcinoma epidermoide del esófago del Barrett y en cáncer de próstata. (Strange, 1999; McIlwain, 2006)

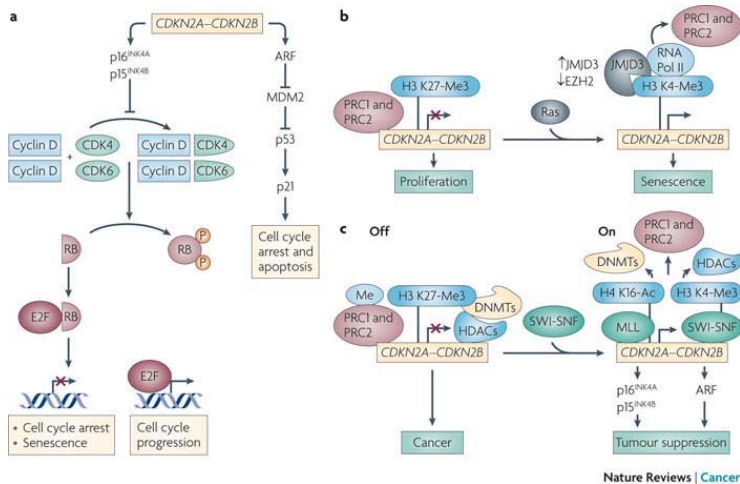


**Figura 16. Ruta de actuación de *GSTP1***

## 6.2 p16

*p16* (*CDKN2A*, cycline–depended kinase inhibitor 2A) es un gen supresor de tumor importante en el control del ciclo celular, que regula la actuación de los las ciclinas, deteniendo el ciclo celular en la fase G1 y G2 (Figura 17). Interactúa con MDM2 e impide la degradación de p53. También induce parada en G2 y apoptosis por una vía independiente de *p53*, evitando la activación del complejo Ciclina B1/CDC2. Mutaciones de *p16* van asociadas a un incremento en el riesgo de padecer numerosos tipos de cáncer (melanoma, esófago, gástrico, ADP) (Wilentz, 1998)

## 6.3 Ciclina D2



**Figura 17.**  
Ruta de actuación  
de *p16* y *Ciclina D2*

*Ciclina D2* (*CCND2*) codifica para una proteína de la familia de las ciclinas, cuya función es regular (a través de las ciclinas dependientes del cinasa) el ciclo celular (Figura 17). Ciclina D2 forma un complejo con *cdk4/cdk6*, cuya actividad es esencial para transición G1-S. También se sabe que interacciona y se involucra en la fosforilación del gen supresor del tumor *Rb* (Al-Aynati, 2004).

## 6.4 RAR beta 2

*RAR beta 2* (*Retinoic Acid Receptor beta 2*), es un receptor de hormonas nuclear que funciona como heterodímero con el retinoid-X receptors (RXRs). Los receptores del ácido retinoico transducen señales necesarias para embriogénesis correcta, diferenciación y parada celular. Se sabe que esta proteína limita el crecimiento de muchos tipos celulares, regulando la expresión génica. Se ha demostrado la importancia en el desarrollo del carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, carcinoma microcítico del pulmón (Xu, 2007)

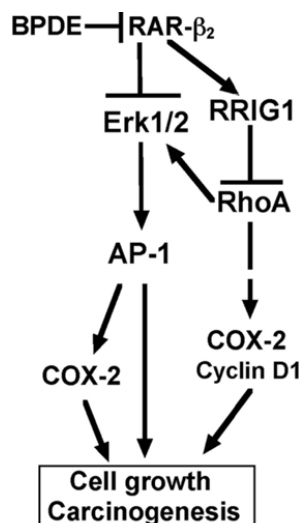


Figura 18. Ruta de actuación de *RAR beta 2*

## 6.5 RASSF1A

*RASSF1A* (*Ras association domain family 1 isoform A*) codifica para una proteína similar a los efectores de RAS. Potencial gen supresor de tumor, requerido para la apoptosis mediante “death receptor-dependent apoptosis”. Modula numerosos puntos del chequeo del ciclo celular y de control de la apoptosis. Evidencias recientes sugieren que sirve como “andamio” para reclutamiento de múltiples genes supresores del tumor, inhibiendo la señal pro-apoptótica de *K-RAS* (Donninger, 2007)

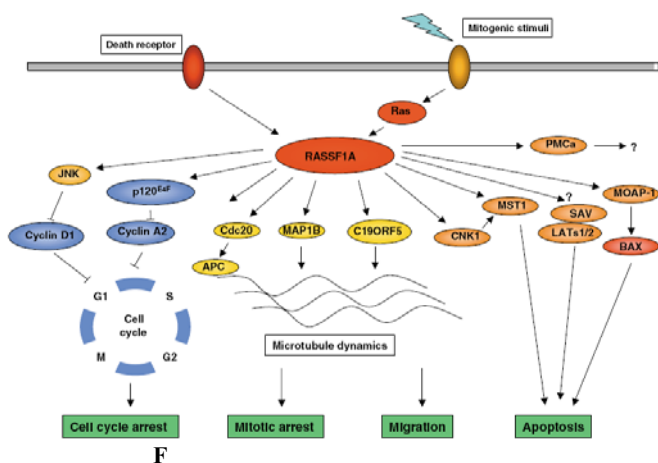


Figura 19. Ruta de actuación de *RASSF1A*

## 6.6 *HIN-1*

*HIN-1* (*High -in normal-1*) fue identificado como un gen altamente expresado en las células luminales normales de mama, y con una expresión disminuida en carcinomas de mama *in situ* e invasivos y metastáticos. *HIN-1* es una putativa citoquina sin homología con otros tipos de proteínas. (Krop, 2001 y 2004). Se sugiere un posible papel de *HIN 1* en la formación de lobulillos de mama y/o diferenciación terminal durante del embarazo. También puede estar relacionado con la regulación de la proliferación celular epitelial, diferenciación y morfogénesis.

## 7. Estadística

La correlación y agrupación de los datos se ha llevado a cabo utilizando el paquete de software filogenético/estadístico denominado PHYLIP:

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.

PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) es un paquete de 35 programas para inferir filogenia. Los métodos disponibles, permiten estudios de parsimonia, matrices de distancia, métodos de probabilidades, incluyendo “bootstrapping” y árboles consenso. Los datos son leídos de un archivo texto, y pueden ser ejecutados por tipo de dato: Búsqueda heurística de árboles, Búsqueda por ramificación limitada de árboles, Manipulación interactiva de árboles, Trazado de árboles, Conversión de datos, réplica de “bootstrap” con distancias.

Brevemente, en el caso de la metilación, se genera una secuencia de datos asociando un valor a la muestra metilada y otro a la muestra no metilada, para cada caso la secuencia ordenada para cada gen es analizada con el software PHYLIP para generar un árbol de distancias y semejanzas en forma de “phylograma”. Los grupos de perfiles de metilación similares se seleccionan como agrupaciones (ramas) en este árbol (Figura 24).

Para los tumores, se asocia cada variable en los diferentes grupos a un valor entre cuatro posibilidades como máximo; así:

- Edad (40-49, 50-59, 60-69, 70-79)
- Tamaño tumoral (<1.9, 2-2.9, 3-3.9, >4)
- Estadio tumoral morfológico pTNM (T1, T2, T3, T4)
- Clínico (IA, IIA, IIB, Otros).

Mientras que la supervivencia y localización se dividen en 3 grupos:

- SUV 1-10, 11-20, >20
- Localización (cabeza, cola, otros)
- Tipo tumoral (1:T, 2: Tc, 3:M, 4:R)

Dichas variables se analizan con el software PHYLIP para generar un árbol de distancias y semejanzas en forma de “phylograma”. Los grupos de tumores se seleccionan como agrupaciones (ramas) en este árbol (Figura 20).

Las correlaciones entre perfiles epigenéticos y agrupaciones de tumores se realizan por relación directa entre las agrupaciones (ramas) de ambos “phylogramas”.



# ***RESULTADOS***

---



## IV. RESULTADOS

### 1. Datos clínico-patológicos

En la presente serie de 61 casos de adenocarcinoma ductal de páncreas, la edad media ha sido  $66,1 \pm 8,9$  años y el rango de 44-79 años. Se encontró una mayoría ligera de varones (59%) sobre mujeres (41%). En cuanto al estadio clínico, 5 (8,2%) casos fueron clasificados como IA, 1 (1,6%) caso como IB, 19 (31,1%) casos como IIA, 33 (54,2%) casos como IIB y 3 (4,9 %) casos como estadio IV.

Al considerar la localización del tumor, se evidenció que en 53 (86,9%) casos había afectación de cabeza, en 4 (6,7%) habían localizado en cabeza y cuerpo, 3 (4,8%) en la cola y en 1 (1,6%) caso había infiltración total del páncreas.

En cuanto a las características anatomopatológicas, la media del tamaño tumoral fue de  $3,0 \pm 2,13$  cm (rango de 0,5-10 cm). Según el corte clásico de clasificación del sistema pTNM, sólo 9 (14,8%) tumores medían menos de 2 cm, y 52 (85,2%) neoplasias primarias presentaban el diámetro mayor igual o superior del 2 cm.

En relación con las metástasis ganglionares (pN), 35 casos eran pN1 (57,4%) y 26 casos (42,6%) pN0. Tras la cirugía se encontraron 3 casos (4,9%), que presentaban metástasis a distancia en el momento de intervención (estadio IV). No había afectación del margen de resección quirúrgica (pR0) en 36 casos (59,0%); la presencia de enfermedad microscópica en el margen de resección (pR1) se ha detectado en 24 casos (39,4%), y la afectación macroscópica del margen de resección (pR2) se detectó en un caso (1,6%).

En relación con la evolución clínica, a los 6 meses del diagnóstico 46 pacientes (75,4%) estaban vivos, al año sobrevivieron 42 pacientes (68,9%), a los dos años 29 pacientes (47,5%), y a los 5 años 20 pacientes (32,8%), siendo la supervivencia media  $18 \pm 25,5$  meses y el rango de 1-120 meses. Entre los 3 (10,7%) casos de éxitos

postoperatorio (rango de supervivencia entre 1 y 3 meses) uno de ellos falleció por causa de parada cardiorrespiratoria, y los otros dos pacientes por sepsis (de origen abdominal y respiratoria).

Para la fechas del fin de estudio se contabilizaron los 41 casos de éxitus (67,2%). Los resultados de este apartado se recogen en la Tabla 10.

Parámetros clínico-patológicos		n	%
Género	V	36	59
	M	25	41
Localización tumoral	cabeza	53	86,9
	cabeza-cuerpo	4	6,7
Tamaño tumoral	cola	3	4,8
	difuso	1	1,6
	<2 cm	9	14,8
Estadio histopatológico:	≥2 cm	52	85,2
	pT		
	pT1	6	9,8
	pT2	7	11,5
	pT3	48	78,7
	pN		
	pN0	26	42,6
	pN1	35	57,4
	pM		
	pM0	58	95,1
	pM1	3	4,9
Afectación a margen de resección	R0	36	59
	R1	24	39,4
	R2	1	1,6
Estadio clínico	IA	5	8,2
	IB	1	1,6
	IIA	19	31,1
	IIB	33	54,2
	IV	3	4,9
Éxitus		41	67,2
	6 meses	15	36,6
	1 año	4	9,8
	2 años	13	31,7
	5 años	7	17,1
	≥5 años	2	4,8
Supervivencia	6 meses	46	75,4
	1 año	42	68,9
	2 años	29	47,5
	5 años	22	36
	≥5 años	20	32,8

Tabla 10. Parámetros clínico-patológicos no numéricos de la serie.

## 1.1 Perfil de los tumores

Sobre la base de datos del grupo de pacientes seleccionados para el estudio, los parámetros clínico-patológicos básicos han sido agrupados según se describió en los materiales y métodos. Codificamos los intervalos de cada variable en forma de letras de secuencia del ADN (A, C, G y T). Para ello elegimos de 2 a 4 cortes de cada variable, con algunos intervalos “no canónicos” (véase Discusión):

- Edad: 40-49 años, 50-59 años, 60-69 años, 70-79 años
- Género: masculino, femenino
- Tamaño tumoral:  $\leq 1.9$  cm, 2-2.9cm, 3-3.9cm,  $\geq 4$ cm
- Estadio pTNM: pT1, pT2, pT3, pT4
- Supervivencia (SuV): 1-10 meses, 11-20 meses,  $>20$ meses
- Localización tumoral: cabeza, cola, otros
- Estadio clínico: IA, IIA, IIB, Otros

Como una variable adicional utilizamos el tipo de muestra, que refiere división a muestra tumoral obtenida de inclusión en parafina (T), muestra tumoral congelada (Tc) y muestra de metástasis (M).

Una vez codificada cada variable con sus intervalos, la tabla 8 anterior queda convertida en esta (Tabla 11):

Referencia	Tipo de Muestra	Edad	Sexo	Estadio clínico	pTNM®	Localiz.tumor	Tamaño tum	SV
1	A	C	A	T	C	G	C	T
2	T	C	A	G	G	G	G	G
3	T	T	A	A	C	G	A	C
4	T	G	A	A	C	C	A	G
5	T	T	A	A	C	T	A	T
6	A	C	T	C	T	G	A	C
7	T	T	A	A	C	G	A	G
8	T	G	A	T	C	G	T	G
9	A	G	T	A	C	G	C	C
10	A	T	A	A	T	G	T	G
11	T	G	T	G	G	G	G	C
12	T	T	A	A	C	G	T	C
13	T	C	T	C	C	C	A	T
14	T	T	T	A	C	G	T	C
15	A	T	T	A	C	G	T	C
16	T	C	T	A	C	G	T	T
18	T	G	A	A	C	G	T	T
19	T	G	T	T	C	G	C	G
20	A	T	T	A	C	G	C	T
21	T	A	A	A	C	G	A	G
22	T	T	T	T	C	C	A	G
23	T	G	A	G	G	G	G	G
24	T	G	T	T	C	G	T	G
25	T	T	T	A	C	T	T	G
26	T	G	T	T	C	G	T	G
27	T	G	T	A	T	T	T	G
28	T	T	A	C	C	T	T	G
29	A	G	A	G	G	G	G	C
31	A	G	T	T	C	G	A	C
33	A	C	A	A	T	G	A	C
35	C	C	A	A	T	G	A	C
36	A	G	T	A	C	G	T	G
39	A	G	A	T	C	G	A	C
41	A	T	A	T	C	G	A	T
43	A	T	A	A	C	G	T	T
45	A	C	T	A	C	G	T	G
47	A	T	A	A	C	G	C	G
49	C	T	A	A	C	G	C	G
50	A	A	A	A	C	G	T	G
53	A	G	A	A	C	G	T	G
55	C	G	A	A	C	G	A	G
56	A	G	A	A	C	G	A	G
60	A	G	A	T	G	G	G	G
61	A	C	A	A	C	G	G	T
63	A	T	A	A	C	G	C	C
66	A	G	A	A	C	G	C	C
74	A	G	T	C	C	G	C	G
77	A	T	T	T	C	G	G	G
79	A	C	A	A	G	G	T	T
81	A	C	T	A	C	G	T	T
84	A	G	A	T	C	G	C	T
86	A	T	T	T	T	G	T	C
88	A	G	A	A	C	G	T	T
114	C	G	A	C	A	C	A	G
115	A	C	A	A	T	G	A	T
117	C	C	A	A	T	G	A	T
118	A	C	A	A	C	G	C	T
120	C	C	A	A	C	G	C	T
121	A	G	A	T	C	G	G	G
125	A	G	A	A	C	G	T	G
127	A	C	A	A	C	G	G	G
129	C	C	A	T	C	G	G	G
130	A	G	T	A	C	G	T	G
132	C	G	T	A	C	G	T	G
133	A	A	A	G	G	G	G	G
135	A	T	T	T	C	G	C	G
137	A	G	A	T	C	G	C	G
139	A	T	T	T	C	T	C	G
163	A	C	T	A	C	G	T	G
167	C	T	A	A	C	G	T	C
172	C	A	A	A	C	G	T	G
173	C	T	T	A	C	T	T	G
174	C	G	T	T	C	G	T	G
182	C	T	A	A	T	G	C	G
187	G	T	A	A	C	G	G	C
188	G	T	A	A	C	G	G	C

**Tabla 11. Perfil de los tumores codificados con cuatro categorías para cada variable** (tipo de muestra A=tumor, C= metástasis, G=recidiva, T=tumor congelado; edad(años) A=40-49, C=50-59, G=70-79, T=60-69; sexo A=varón, T=mujer; estadio tumoral A=IIB, C=otros, G=IA, T=IIA; pT A=pT4, C=pT3, G=pT1, T=pT2; localización tumoral C=cola, G=cabeza, T=otras; tamaño tumoral A=  $\geq$  4 cm, C= 3-3,9 cm, T= 2-2,9 cm, G= $\leq$ 1,9 cm; supervivencia C= $\geq$ 20 mes, G=1-10 mes, T=11-20 mes)

Después de analizar los datos codificados en el programa PHYLIP para agruparlos en clusters según sus coincidencias de las variables, obtenemos como resultado el “phylograma” o árbol comparativos adjunto (Figura 20) con la evidencia de 6 grupos, que forman parte de “perfiles tumorales”.

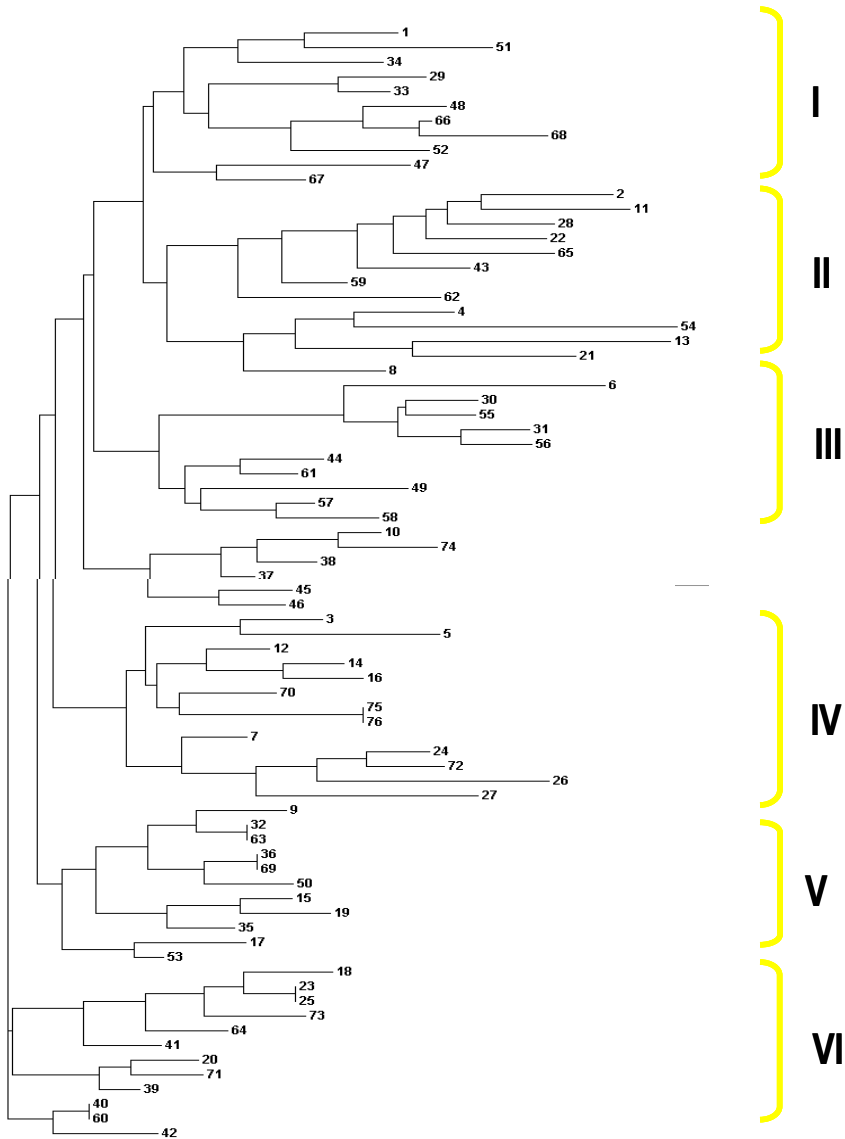


Figura 20. Perfiles tumorales resultante del estudio con el software PHYLIP.

El último paso de este algoritmo consistía en la “decodificación” de los resultados del “phylograma” (Figura 20), utilizando los valores originales. La similitud de los variables para cada uno de los 6 grupos obtenidos se muestra en la Tabla 12.

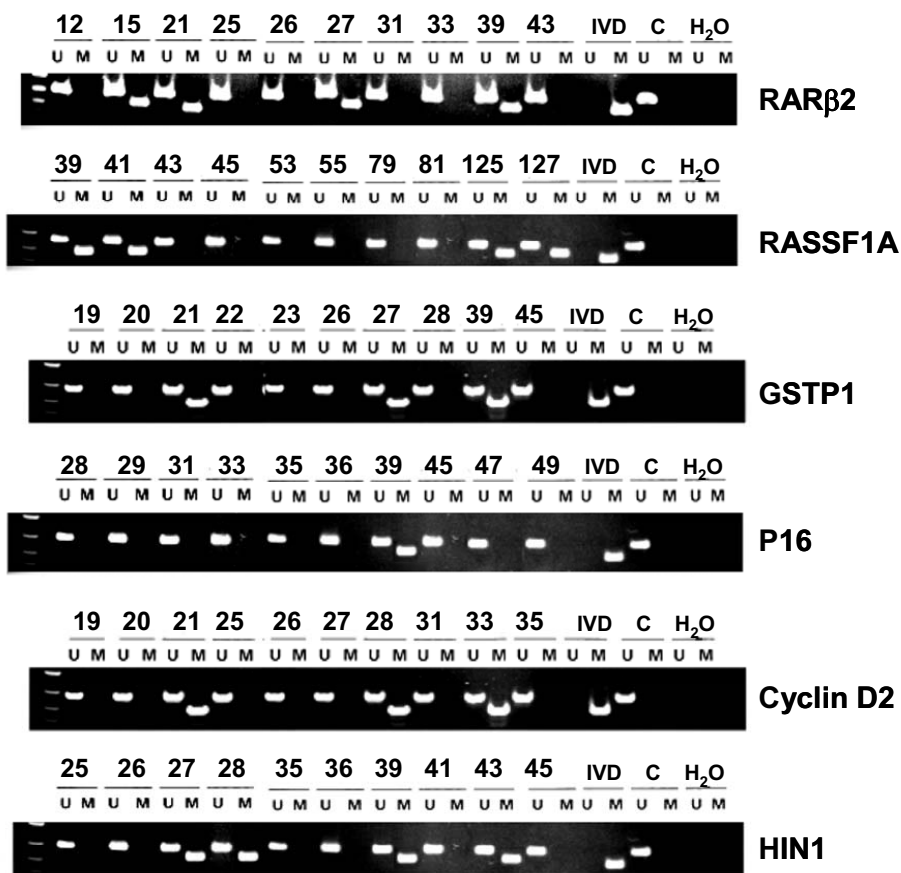
I	muestra	edad	género	estado clínico	pT	localización	tamaño (cm)	SuV (meses)
1	T	66	V	IIB	3	cabeza-cuerpo-cola	10	14
29	T	76	M	IIA	3	cabeza	4	57
33	T	70	V	IIA	3	cabeza	4	51
34	T	63	V	IIA	3	cabeza	8	17
47	T	78	M	IV	3	cabeza	3,6	2
48	T	61	M	IIA	3	cabeza	0,8	6
51	T	77	V	IIA	2	cabeza	3,2	15
52	T	69	M	IIA	3	cabeza	2	48+
66	T	63	M	IIA	3	cabeza	3,4	6+
67	T	75	V	IIA	3	cabeza	3	4+
68	T	64	M	IIA	3	cabeza-cuerpo	3	3+
II	muestra	edad	género	estado clínico	pT	localización	tamaño (cm)	SuV (meses)
2	T	79	V	IIB	3	cola	4	1
4	T	56	V	IA	1	cabeza	1,5	120+
8	T	70	V	IIA	3	cabeza	4,3	6
11	T	76	M	IA	1	cabeza	1,6	30
13	T	59	M	IV	3	cola	8	19
21	T	60	M	IIA	3	cola	4,1	5+
22	T	79	V	IA	1	cabeza	1,5	2
28	T	72	V	IA	1	cabeza	1	48
43	T	76	V	IA	1	cabeza	0,5	1
54	M	75	V	III	4	cola	8,5	10
59	T	75	V	IIA	3	cabeza	0,8	3
62	M	58	V	IIA	3	cabeza	1,4	5
65	T	77	V	IIA	2	cabeza	3,2	15
III	muestra	edad	género	estado clínico	pT	localización	tamaño (cm)	SuV (meses)
6	T	58	M	IB	2	cabeza	5,3	77
10	T	67	V	IIB	2	cabeza	3	9
30	T	51	V	IIB	2	cabeza	5	68
31	M	51	V	IIB	2	cabeza	5	68
37	T	68	V	IIB	3	cabeza	3	6
38	M	68	V	IIB	3	cabeza	3	6
44	T	51	V	IIB	3	cabeza	1,7	20
45	T	60	V	IIB	3	cabeza	3,5	49
46	T	78	V	IIB	3	cabeza	3,5	56
49	T	51	V	IIB	1	cabeza	2	11
55	T	57	V	IIB	2	cabeza	5	10+
56	M	57	V	IIB	2	cabeza	5	10+
57	T	59	V	IIB	3	cabeza	3	13
58	M	59	V	IIB	3	cabeza	3	13
61	T	58	V	IIA	3	cabeza	1,4	5
74	M	67	V	IIB	2	cabeza	3	9
IV	muestra	edad	género	estado clínico	pT	localización	tamaño (cm)	SuV (meses)
3	T	66	V	IIB	3	cabeza	4	21
5	T	56	V	IIA	3	cabeza	3	13
7	T	60	V	IIB	3	cabeza	2	4
12	T	64	V	IIB	3	cabeza	2	24+
14	T	69	M	IIB	3	cabeza	2,4	22+
16	T	58	M	IIB	3	cabeza	2	27
26	T	70	M	IIB	2	cabeza-cuerpo	2,8	2+
27	T	66	V	IV	3	cabeza-cuerpo	2,5	4+
29	T	76	M	IIA	3	cabeza	4	57
70	M	64	V	IIB	3	cabeza	2	24+
72	M	60	M	IIB	3	cabeza-cuerpo	2,5	3+
75	Recid	63	V	IIB	3	cabeza	1	46+
76	Recid	63	V	IIB	3	cabeza	1	46+
V	muestra	edad	género	estado clínico	pT	localización	tamaño (cm)	SuV (meses)
9	T	76	M	IIB	3	cabeza	2,3	30+
15	T	68	M	IIB	3	cabeza	2	20
17	T	71	V	IIB	3	cabeza	2,5	11+
19	T	65	M	IIB	3	cabeza	3,4	11+
32	T	77	M	IIB	3	cabeza	2,3	6
35	T	63	V	IIB	3	cabeza	2,5	18
36	T	59	M	IIB	3	cabeza	2,5	9
50	T	56	M	IIB	3	cabeza	2,5	17
53	T	73	V	IIB	3	cabeza	2,5	20
63	T	72	M	IIB	3	cabeza	2,6	6
69	T	58	M	IIB	3	cabeza	2	3
VI	muestra	edad	género	estado clínico	pT	localización	tamaño (cm)	SuV (meses)
18	T	74	M	IIA	3	cabeza	3,5	7+
20	T	44	V	IIB	3	cabeza	2,7	9+
23	T	73	M	IIA	3	cabeza	2,7	9+
25	T	73	M	IIA	3	cabeza	2	4+
39	T	44	V	IIB	3	cabeza	2	8
40	T	74	V	IIB	3	cabeza	2	6
41	M	74	V	IIB	3	cabeza	2	6
42	T	70	V	IIB	3	cabeza	4	6
60	T	74	V	IIA	3	cabeza	2,7	2+
64	M	72	M	IIB	3	cabeza	2,6	6
71	M	44	V	IIB	3	cabeza	2,7	9+
73	M	73	M	IIA	3	cabeza	2	4+

Tabla 12. Agrupación de los tumores al asociar 4 categorías en cada variable.

## 2. Resultados epigenéticos

### 2.1 MSP

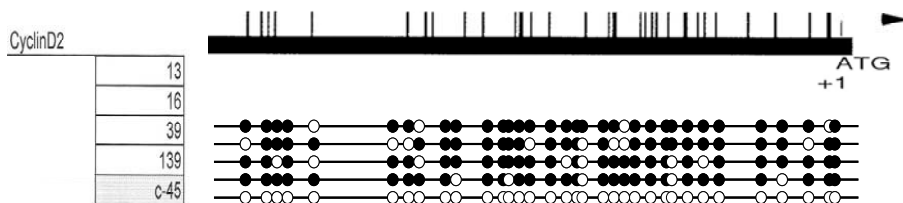
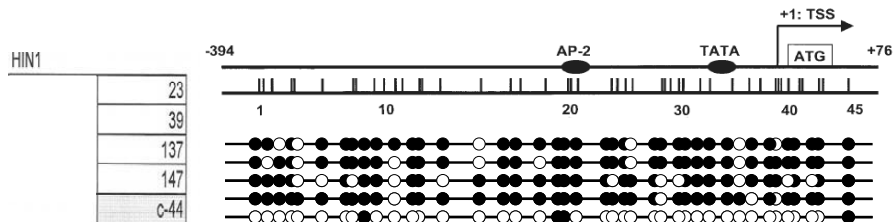
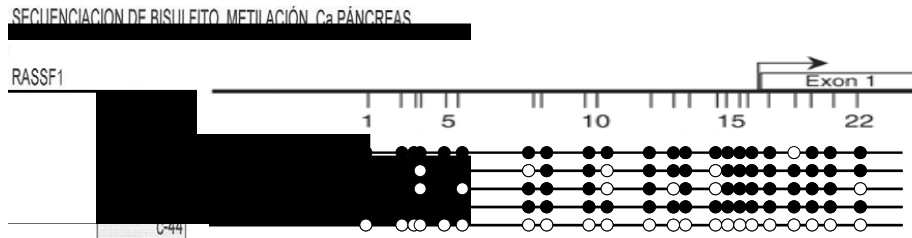
La PCR específica de metilación (MSP), es la técnica más utilizada para estudiar la metilación de islas CpG, que son muy comunes en los promotores de muchos genes. Se han realizado PCRs específicas de metilación para cada uno de los 6 genes en todas las muestras tumorales, metastáticos y control. Se presenta una muestra de resultados en la Figura 21.



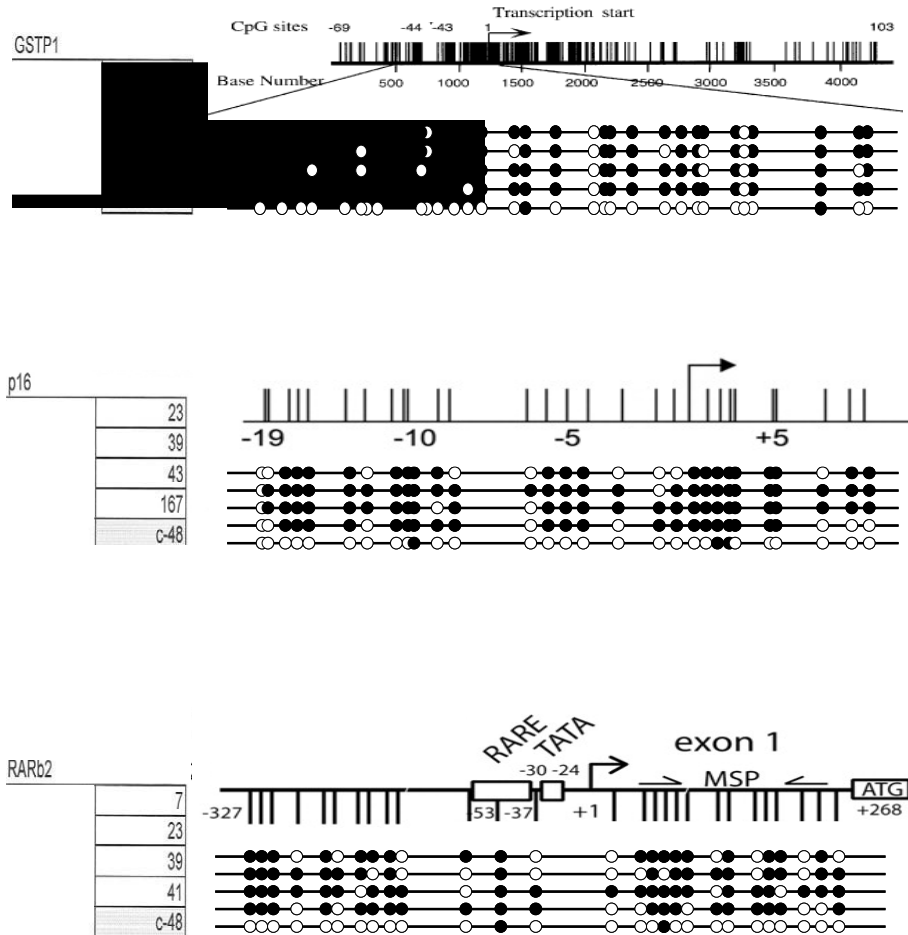
**Figura 21. Ejemplos de PCR específica de Metilación para los genes de estudio.** Se presentan los tumores (números), y las muestras control: IVD: *In vitro* Methylated DNA (positivo para metilación); C: amigadla normal (negativo para metilación) y Agua (control de contaminación).

## 2.2 Secuenciación de Bisulfito

La secuenciación del ADN tratado con Bisulfito nos permite comprobar la extensión de la metilación en los promotores que han dado positivos con la MSP. Esta técnica se usa para determinar la posición exacta de las metilaciones, y poder así ser relacionada con los factores de transcripción que se unen a dicho promotor.



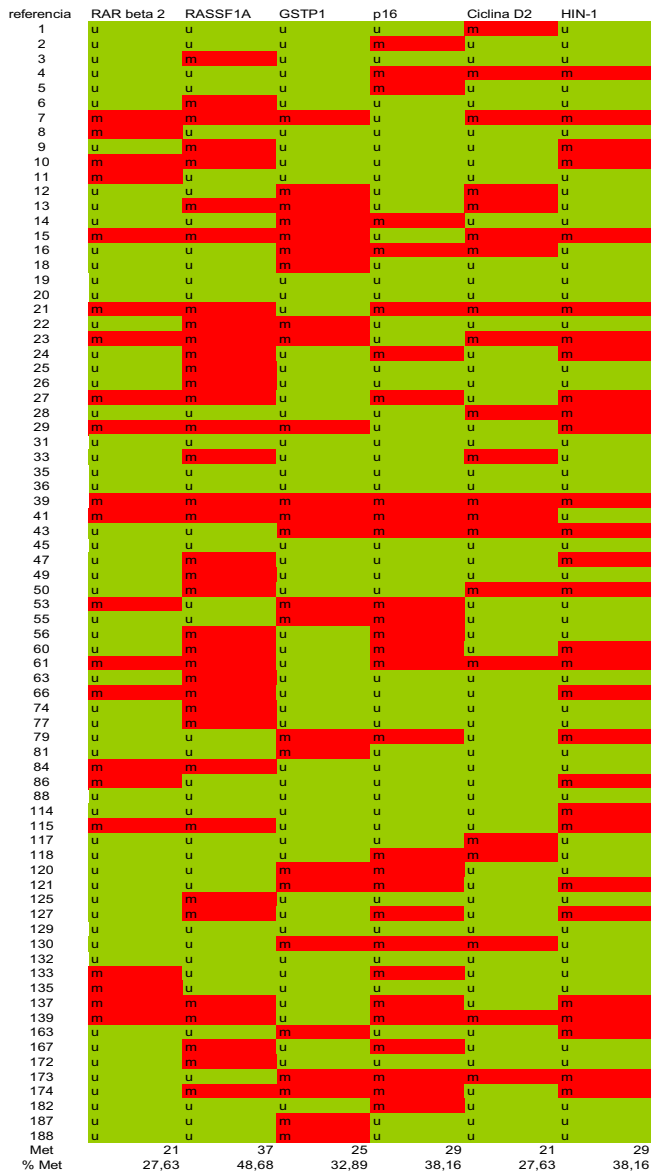
En este estudio, sólo hemos realizado una secuenciación prospectiva de un ejemplo de 5 casos para cada uno de los genes que se presentan a continuación (Figura 22):



**Figura 22. Secuenciación de bisulfito** para 5 casos representativos en cada uno de los genes. Se presenta la estructura del gen con la localización de las islas CpG, así como la posición de iniciación de transcripción (flecha). Los perfiles de metilación en las islas corresponden: blanco: NO Metilado, negro: Metilado.

## 2.3 Perfiles de metilación

El perfil de metilación de las islas CpG en la región del promotor de los genes *RAR beta 2*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *p16* y *HIN-1* está presentado en la Figura 23



**Figura 23.** Perfil de metilación de las diferentes muestras en cada uno de los genes estudiados (ROJO: metilado, VERDE: no metilado). Abajo: número de casos metilados y porcentaje del total.

Hemos encontrado una proporción considerable de metilación aberrante en la región de promotor de los genes supresores tumorales seleccionados: *RAR beta 2* (27,6%), *RASSF1A* (48,7%), *GSTP1* (32,9%), *p16* (38,2%), *CiclinaD2* (27,6%) y *HIN-1* (38,2%).

La agrupación de los perfiles epigenéticos, utilizando 2 variables (m=metilado=C y u=no-metilado=G) en el programa PHYLIP, demuestra la agrupación de los tumores en función de su patrón epigenético (Figura 24).

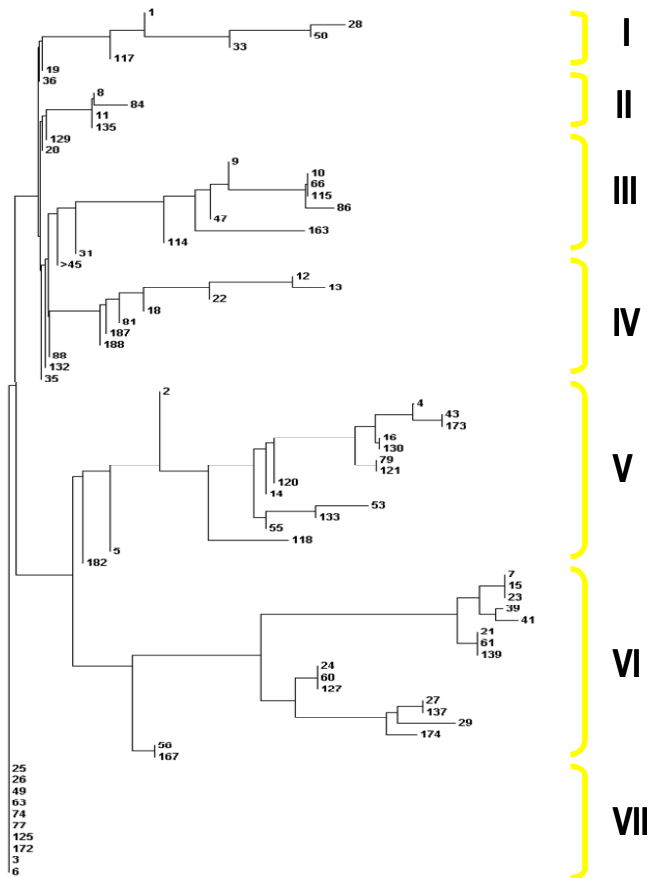


Figura 24. Árbol comparativos según perfiles de metilación.

Finalmente, reconstruimos los datos de perfiles de metilación para cada uno de los 7 “clusters” obtenidos con programa PHYLIP (Tabla 13).

	<i>RAR beta 2</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>GSTP1</i>	<i>p16</i>	<i>Ciclina D2</i>	<i>HIN-1</i>
<b>I</b>						
1	u	u	u	u	m	u
19	u	u	u	u	u	u
28	u	u	u	u	m	m
33	u	m	u	u	m	u
36	u	u	u	u	u	u
50	u	m	u	u	m	m
117	u	u	u	u	m	u
<b>II</b>						
8	m	u	u	u	u	u
11	m	u	u	u	u	u
20	u	u	u	u	u	u
84	m	m	u	u	u	u
129	u	u	u	u	u	u
135	m	u	u	u	u	u
<b>III</b>						
9	u	m	u	u	u	m
10	m	m	u	u	u	m
31	u	u	u	u	u	u
45	u	u	u	u	u	u
47	u	m	u	u	u	m
66	m	m	u	u	u	m
86	m	u	u	u	u	m
114	u	u	u	u	u	m
115	m	m	u	u	u	m
163	u	u	m	u	u	m
<b>IV</b>						
12	u	u	m	u	m	u
13	u	m	m	u	m	u
18	u	u	m	u	u	u
22	u	m	m	u	u	u
35	u	u	u	u	u	u
81	u	u	m	u	u	u
88	u	u	u	u	u	u
132	u	u	u	u	u	u
187	u	u	m	u	u	u
188	u	u	u	u	u	u
<b>V</b>						
2	u	u	u	m	u	u
4	u	u	u	m	m	m
5	u	u	u	m	u	u
14	u	u	m	u	u	u
16	u	u	m	m	m	u
43	u	u	m	m	u	m
53	m	u	m	m	u	u
55	u	u	m	u	u	u
79	u	u	m	m	u	m
118	u	u	u	m	u	u
120	u	u	m	m	u	u
121	u	u	m	m	u	m
130	u	u	m	m	m	u
133	m	u	u	m	u	u
173	u	u	m	m	m	m
182	u	u	u	m	u	u
<b>VI</b>						
7	m	m	u	u	m	m
15	m	m	m	u	m	m
21	m	u	m	m	m	m
23	m	m	m	u	m	m
24	u	u	u	m	u	m
27	m	m	u	m	u	m
29	m	m	m	u	u	m
39	m	m	m	m	m	m
41	m	m	m	m	m	u
56	u	m	u	m	u	u
60	u	m	u	m	u	m
61	m	m	u	m	m	m
127	u	m	u	m	u	m
137	m	m	u	m	u	m
139	m	m	u	m	m	m
167	u	m	u	m	u	u
174	u	m	m	m	u	m
<b>VII</b>						
3	u	m	u	u	u	u
6	u	m	u	u	u	u
25	u	m	u	u	u	u
26	u	m	u	u	u	u
49	u	m	u	u	u	u
63	u	m	u	u	u	u
74	u	m	u	u	u	u
77	u	m	u	u	u	u
125	u	m	u	u	u	u
172	u	m	u	u	u	u

Tabla 13. “Clusters” tumorales agrupados según el perfil de metilación

### 3. Correlación entre resultados epigenéticos y datos clínico- patológicos.

La finalidad principal del estudio es encontrar la correlación (si la hubiera) entre características clínico-patológicas de los tumores y sus patrones de metilación específicos de genes. Para ellos hemos decidido abordar el problema desde dos puntos de vista. En primer lugar, comparando todos los datos para tener una visión general e intentar asociar alguna “huella epigenética” a los ADP; y una segunda aproximación que pasa por comparar los tumores primarios con sus metástasis.

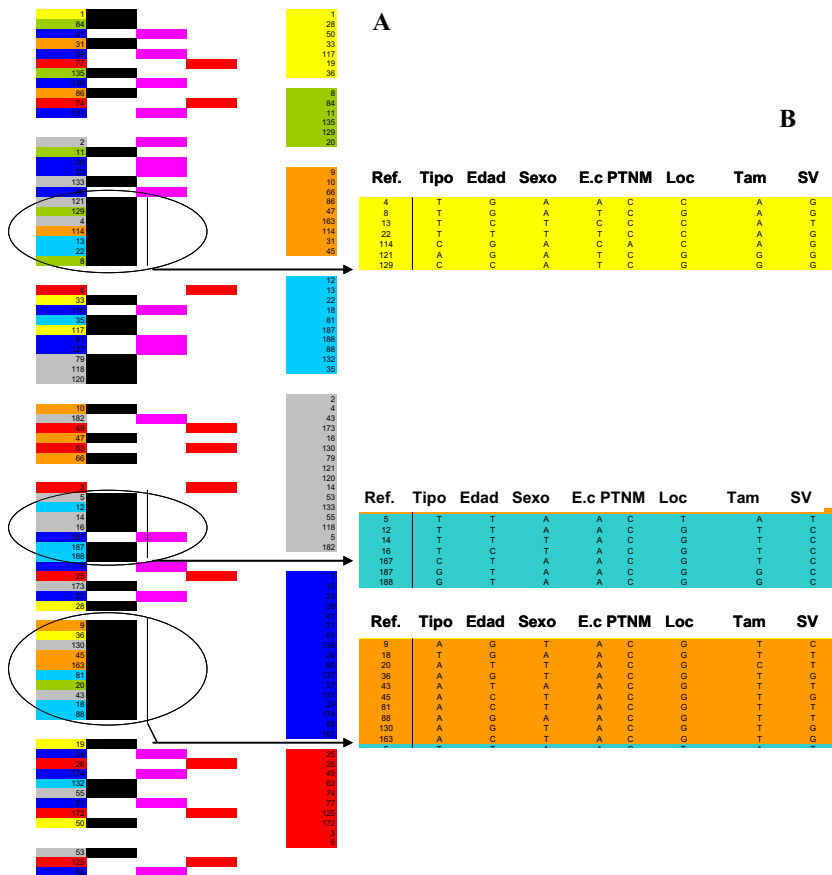


Figura 25. Correlación entre las agrupaciones de los tumores en base a sus características clínico-patológicas y los perfiles epigenéticos I. A. Comparativa. B. Características clínico-patológicas de cada grupo seleccionado mostrando los puntos comunes

### 3.1 Perfil epigenético versus perfil de tumores.

Comparando los clusters obtenidos para las características clínico-patológicas (Figura 20 y Tabla 12) y los perfiles de metilación (Figura 24 y tabla 13) hemos caracterizado los puntos comunes entre ambos grupos (Figura 25 y 26). Se han identificados qué subtipos tumorales, según las características clínico-patológicas, compartían un determinado patrón epigenético (Círculos y tablas en apartado B de Figura 25 y Figura 26).

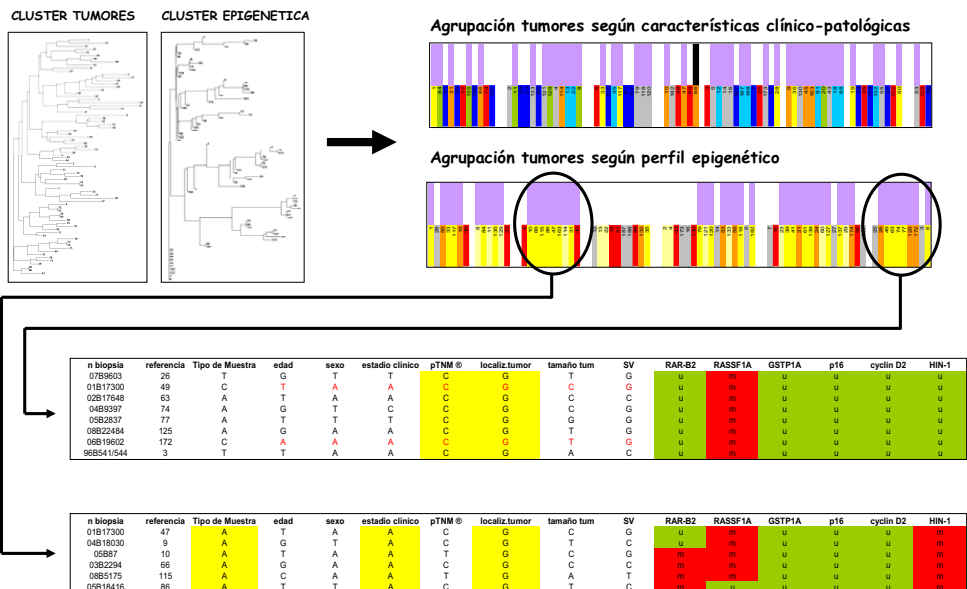


Figura 26. Correlación entre agrupaciones de tumores en base de sus características clínico-patológicas y los perfiles epigenéticos II. Características de solapamiento entre “clusters” tumorales y epigenéticos.

La Figura 26 refleja esquemáticamente la idea principal y original de nuestro estudio. El análisis comparativo de árboles filogenéticos que se lleva a cabo pretende encontrar solapamiento entre “perfiles tumorales” y “perfiles epigenéticos”, como se había indicado en las hipótesis del estudio.

En las tablas de la misma figura que corresponden a los dos grupos más numerosos, hemos demostrado cuáles son las características clínico-patológicas comunes (marcados en amarillo) que comparten semejantes perfiles de metilación del promotor en los genes seleccionados (marcados en verde=no metilados y en rojo=metilados)

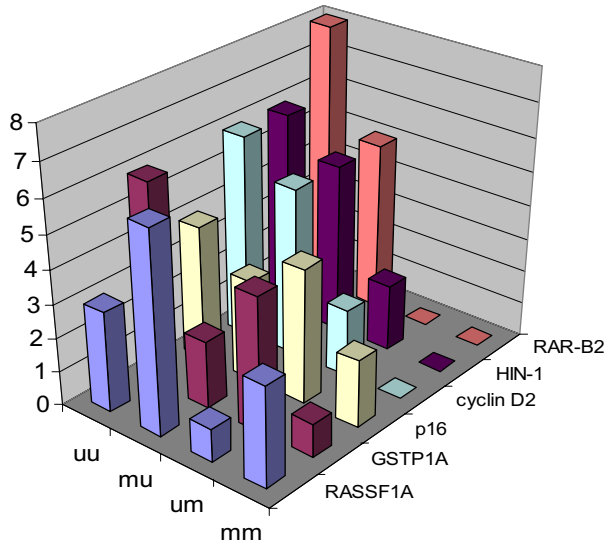
### 3.2 Perfil epigenético tumoral *versus* metastático.

En un grupo reducido de casos, aquellos que se disponía de toda de la información tanto clínico-patológica como epigenética en el tumor primario y en la metástasis, se compararon los clusters obtenidos para las características clínico-patológicas (Figura 20 y Tabla 12) y los perfiles de metilación (Figura 24 y Tabla 13) con el fin de caracterizar variaciones en los patrones de metilación asociados a la progresión metastásica. (Figura 27)

tumor	mts	RAR beta 2	RASSF1A	GSTP1	p16	Ciclina D2	HIN-1	edad	sexo	estadio clínico	pT
10		m	m	u	u	u	m	67	V	IIB	2
	182	u	u	u	m	u	u				
12		u	u	m	u	m	u	64	V	IIB	3
	167	u	m	u	m	u	u				
21		m	m	u	m	m	m	44	V	IIB	3
	172	u	u	u	u	u	u				
25		u	m	u	u	u	u	60	M	IIB	3
	173	u	u	m	m	m	m				
26		u	m	u	u	u	u	73	M	IIA	3
	174	u	m	m	m	u	m				
33		u	m	u	u	m	u	51	V	IIB	2
	35	u	u	u	u	u	u				
47		u	m	u	u	u	m	68	V	IIB	3
	49	u	m	u	u	u	u				
53		m	u	m	m	u	u	74	V	IIB	3
	55	u	u	u	m	u	u				
115		m	m	u	u	u	m	57	V	IIB	2
	117	u	u	u	u	m	u				
118		u	u	u	m	m	u	59	V	IIB	3
	120	u	u	m	u	u	u				
127		u	m	u	m	u	m	58	V	IIA	3
	129	u	u	u	u	u	u				
130		u	u	m	m	m	u	72	M	IIB	3
	132	u	u	u	u	u	u				
84		m	m	u	u	u	u	77	V	IIA	2
	187	u	u	m	u	u	u	63	V	IIB	3
	188	u	u	m	u	u	u	63	V	IIB	3

**Figura 27. Perfiles de metilación de los tumores primario y sus metástasis (agrupados en parejas) con los datos clínico-patológicos correspondientes.**

En la parte izquierda de la figura 26 recogemos los datos de perfil de metilación en parejas, correspondiendo a tumor primario (arriba) y metástasis (abajo) del mismo paciente. El resultado a simple vista, demuestra la discordancia entre perfiles de metilación de algunos genes en tumor primario y metastático, que se detalla en la Figura 28.

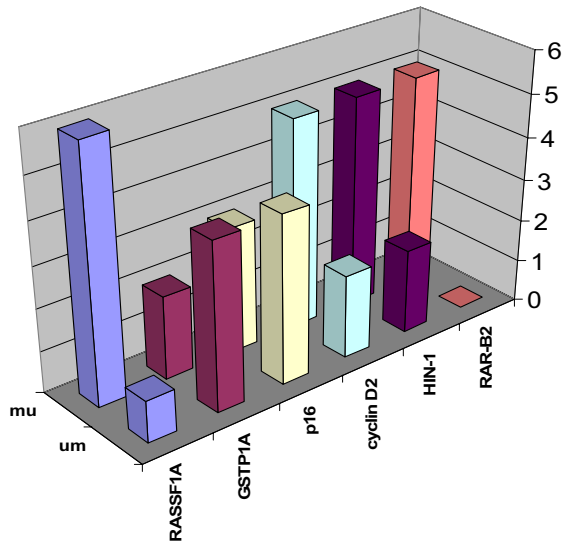


**Figura 28. Metilación en tumores primarios *versus* metástasis.**

(uu= tumor y metástasis no metilados, mu= tumor primario metilado y metástasis no metilado, um= tumor primario no metilado y metástasis metilado, mm= ambas muestras, tumor y metástasis, metiladas).

En la diagrama de la Figura 28, se muestran todas las variaciones de metilación entre tumor primario y metastático, se demuestra la diferencia entre patrones de metilación de los genes en estas muestras (tumor metilado-metástasis no metilado y tumor no metilado-metástasis metilado).

A raíz de esta observación hemos comparado las características mencionadas, obteniendo resultados en el siguiente diagrama (Figura 29).



**Figura 29. Metilación no concordante en tumores primarios versus metástasis.**

(mu= tumor primario metilado y metástasis no metilado, um= tumor primario no metilado y metástasis metilado).

Este último diagrama revela un fenómeno evidente de “demetilación” en las metástasis para *RASSF1A*, *RAR beta 2*, *Ciclina D2* y *HIN-1* comparado con el tumor primario. Sin embargo, se observa el efecto contrario con ligero aumento de metilación en las metástasis para *GSTP1* y *p16*.



# ***DISCUSIÓN***

---



## V. DISCUSIÓN

### 1. Aspectos clínico-patológicos del ADP. Desafíos y dimensión del problema.

Desde el punto de vista global, en la época de la medicina traslacional, se han cambiado las expectativas sobre el cáncer como una enfermedad incurable y definitivamente mortal. Los avances tecnológicos, como primer atajo de este problema médico, unidos a esfuerzos de numerosos estudios biomédicos y clínicos han protagonizado una revolución en el conocimiento de mecanismos moleculares del inicio y progresión en algunos tipos de cáncer, dando luz a programas de prevención, diagnóstico precoz y seguimiento en el tratamiento del cáncer, conocidos como dianas terapéuticas, con un fin claro, beneficio en la calidad de vida y supervivencia de los pacientes que padecen cáncer.

Como ejemplos claros de estos resultados beneficiosos, se han de mencionar, sobre todo, los programas internacionales e interdisciplinarios dedicados a cáncer de mama, cáncer colorrectal, pulmonar y cáncer del cuello uterino.

Sin embargo, los numerosos estudios en el ADP, todavía no han alcanzado un nivel de control médico de esta enfermedad, dejando “huecos” blancos en casi todos los niveles de conocimiento, manejo y seguimiento de este tipo de cáncer. La multitud de artículos revisados para preparar este trabajo, hacen constar solamente que el ADP es una enfermedad definitivamente mortal, de mala evolución, una progresión rápida y unos medios terapéuticos restringidos.

Los problemas nacen desde la falta de definición del origen celular, factores de riesgo y predisposición, modelos de progresión, marcadores biológicos específicos, pasando por la localización orgánica, difícil para acceso instrumental y quirúrgico, y acabando con escasos medios de quimioterapia y resistencia a la misma.

Todo esto convierte al ADP en un gran desafío científico en múltiples áreas de la ciencia médica, del que, de cierto modo, participamos con nuestro estudio.

### **1.1 Estudios epidemiológicos prospectivos y retrospectivos en el ADP.**

A pesar de la baja incidencia anual, que varía entre 0,65%-2% en países no desarrollados y desarrollados respectivamente, que ocupa la 13<sup>a</sup> posición en la incidencia mundial del cáncer, el ADP consiste la cuarta causa de la muerte por cáncer en EEUU y la octava causa a nivel mundial (Parkin, 2005). Se considera el ADP, como una neoplasia rara, sin embargo es el segundo tumor más frecuente en el tracto gastrointestinal y una forma predominante entre las neoplasias de páncreas (Edqe, 2009).

El estudio prospectivo de los tumores del tracto gastrointestinal de Globocan (2002), estima la incidencia del ADP entre 127,416 casos anuales en el 2000 y 168,453 casos en el 2020 en los países desarrollados, y 88,969 casos en el 2000 y 162,401 en el 2020 en los países poco desarrollados, siendo el incremento de un 32% y 83% respectivamente.

Actualmente se conoce la prevalencia de la incidencia del ADP en los países desarrollados, con unificación del pronóstico para próximas décadas, que puede explicarse por incremento de edad de la población debido a disminución del rango de mortalidad por factores competitivos, tales como enfermedades infecciosas, y aumento de población fumadora en estos países (Beger, 2008).

En cuanto a la predisposición por género, clásicamente se indica prevalencia del ADP en varones sobre mujeres en 40-50%, pero el aumento de población de mujeres fumadoras evidencia el incremento de incidencia del ADP en EEUU (Beger, 2008).

Entre otros factores epidemiológicos se constata el incremento de diagnósticos del ADP en las últimas décadas debido, como causa principal, a los avances tecnológicos en el diagnóstico (Imamura, 2005).

### **1.1.1 Factores y grupos del riesgo.**

El consumo del tabaco es, posiblemente, uno de los factores de riesgo más estudiados y más destacables en el ADP. Las publicaciones relacionadas indican que el tabaquismo duplica el riesgo de desarrollo del ADP. El cálculo total del riesgo muestra que,  $\frac{1}{4}$  del ADP se debe a ésta causa, que a su vez depende de la intensidad y la duración del consumo del tabaco (Lin, 2002). La relatividad y la gravedad de este factor en la población general muestra que sólo 1-2% de fumadores desarrollan el ADP, comparado con aproximadamente 10% de este grupo que manifiestan cáncer pulmonar (Li, 2006).

No se ha demostrado la implicación de ningún factor dietético en el aumento de riesgo del ADP (Hidalgo, 2010).

La identificación de los grupos de riesgo es uno de los problemas más importantes en el diagnóstico precoz y “screening” en el ADP.

Entre las enfermedades pre-existentes que aumentan el riesgo del ADP, la diabetes es la causa más común conocida de cáncer pancreático. El meta-análisis reciente de 36 estudios (9,220 pacientes con diagnóstico de ADP) sugiere un incremento del riesgo en el 60% en los pacientes con “background” diabético, con restricción a la diabetes tipo I, que habitualmente no se asocia con el ADP (Huxley, 2005).

Todos los tipos de pancreatitis crónica, incluso pancreatitis tropical endémica en la zona del sur de India y África, forman un grupo de riesgo del ADP, demostrando en un estudio retrospectivo el incremento de la incidencia del ADP

en 10-20 veces en los pacientes con pancreatitis crónica previa de más de 5 años de evolución (Lowenfels, 1993 y 1999).

### **1.1.2 Epidemiología genética**

Algunos síndromes hereditarios conocidos cursan con riesgo de desarrollo de ADP (Tabla 6). Entre ellos, una predisposición más alta está descrita con la mutación germinal del gen *BRCA2*, detectada en el 7-10% de los pacientes con ADP esporádico y en 10-20% de los pacientes con historia de cáncer pancreático familiar (Real, 2002). La mayoría de estos síndromes se hereda de forma autosómica dominante, excepto tres de patrón de herencia autosómico recesivo (ataxia-telangiectasia, fibrosis quística y anemia de Falconi).

Aproximadamente el 1% de los pacientes con pancreatitis crónica presentan pancreatitis hereditaria, que cursa con un riesgo acumulativo de padecer ADP del 40% en edad avanzada (Howes, 2004).

### **1.1.3 Aspectos preventivos y screening del ADP.**

La importancia del estado del sistema inmunitario en el cáncer, ha provocado varios estudios epidemiológicos sobre el desarrollo del ADP relacionado con drogas anti-inflamatorias, enfermedades alérgicas y vacunas, sin relevancia en el riesgo del cáncer pancreático.

Por otro lado, la inmunoterapia en cáncer de páncreas ha sido puesta en marcha, siendo los resultados prometedores, aunque discutibles, en algunos tipos de cáncer, p.ej. en el melanoma (Laheru, 2005).

Finalmente, en el abordaje del “screening” del ADP hoy en día, se aplica el protocolo sólo a un grupo minoritario de pacientes con diagnóstico de pancreatitis

hereditaria y/o a las personas con una historia familiar estricta del ADP (Durie, 2002).

## **1.2 Factores pronósticos en el ADP. Hipótesis de progresión tumoral.**

La progresión tumoral rápida, sin razones precisas clínicas, ni moleculares, forma parte de uno de los “misterios” del ADP. Real F (2003) indica el problema como una “hipótesis catastrófica”, que no respeta la regla general de los criterios pronósticos y predictivos en otros tipos de cáncer. Uno de los parámetros clásicos y sólidos demostrados que repercuten en la evolución de la enfermedad, es el tamaño tumoral.

La supervivencia a los dos años en pacientes con ADP cuyo tamaño tumoral es de 2 cm es tan sólo de un 20%, dato que contrasta marcadamente con la supervivencia a los 5 años en los enfermos con otro tipo de cáncer, en los cuales la medida tumoral de 2 cm se considera como mejor pronóstico. Por ejemplo, la supervivencia a los 5 años en cáncer renal o pulmonar de 2 cm es, actualmente, de un 70%, y en las pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar del 95% (Bast, 2000). Esta discordancia en relación tamaño tumoral-supervivencia en el ADP, comparado con otras neoplasias, revela la importancia de la estadificación clínico- patológica clásica.

Teniendo en cuenta todos estos datos, en nuestro estudio no seguimos estrictamente los “cortes” del tamaño tumoral inferior *versus* igual o mayor de 2 cm, manejando los intervalos con la idea de comparar (si la hubiera) la correlación con los datos moleculares.

La evolución fatal del ADP, que no depende del tamaño tumoral, se explica por el fenómeno de enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico, y también de alta tasa de recidiva tumoral. Respecto a esto último, se ha demostrado otro hallazgo destacable que influye en la progresión de la multifocalidad del ADP. Tras pancreatectomía total en un grupo de 323 pacientes, se encontraron que un tercio

(32%) de los ADP, era multifocal de inicio, y un 25 % presentaban displasia de epitelio ductal (Launois, 1993).

En la revisión de la literatura no hemos encontrado ningún criterio clínico-patológico con alta relevancia de asociación con mejor o peor pronóstico.

### **1.3 Avances diagnósticos y tratamiento del ADP.**

Una localización orgánica retroperitoneal con dificultades de acceso para biopsia, unido al silenciamiento clínico hasta el momento de manifestarse por invasión de la vía biliar, hace que en muchos casos el diagnóstico de una masa pancreática se consideran como “incidentaloma”, que supone la causa de fallecimientos por tumor primario de origen desconocido entre 50,000 y 80,000 casos anuales (Michaud, 2004; Matthias-Löhr, 2005).

El continuo desarrollo de las técnicas de imagen, y en particular ECO-endoscopia, han ampliado y mejorado considerablemente el diagnóstico del ADP (Iglesias-García, en prensa). Esta técnica permite el acceso transesofágico o transgástrico al nódulo tumoral sospechoso, combinando la endoscopia convencional con imagen ecográfica simultánea, unido a la posibilidad de toma de muestra citológica con aguja fina.

Respecto a otros medios diagnósticos, sólo la elevación en suero de los marcadores tumorales, CA19.9 y CEA, son indicativos de una neoplasia pancreática.

## **2. Epigenética**

Como se ha demostrado en el apartado previo, el ADP representa un problema importante y, relativamente poco estudiado en comparación con otras neoplasias humanas, lo que requiere abordar nuevas y diferentes aproximaciones de investigación. Sobre todo, necesitamos comprender mejor la causa genética y ambiental de la enfermedad y los mecanismos de su desarrollo y progresión, así como avanzar en nuevas estrategias para el diagnóstico precoz y tratamiento. Una de las herramientas moleculares que podría aportar luz sobre esta enfermedad son los estudios epigenéticos.

### **2.1 Importancia de la epigenética en la traslación en cáncer.**

Durante esta última década, la epigenética se ha convertido en un campo importante en la investigación básica. A su vez, en el proceso traslacional, desde la investigación básica al manejo diario del paciente, la epigenética se está convirtiendo en un nuevo paradigma a tener en cuenta. Tenemos varios ejemplos en este sentido, aprovechando las características que un análisis epigenético tiene: su poca necesidad de muestra, la especificidad de la metilación de promotores a la patología, su fácil acceso, rapidez y bajo coste.

En este sentido podemos encontrar numerosos ensayos epigenéticos en clínica para la identificación de células tumorales en fluidos biológicos, ya sea líquido ascítico, esputos, orina, heces o sangre, de vital importancia en un futuro en el diagnóstico de patologías como el cáncer de vejiga, próstata, estómago o intestino. A su vez se han desarrollado proyectos para definir la importancia de la metilación en cáncer de mama, estudiando ganglios linfáticos, o en próstata.

En otro campo, no menos importante, la metilación se está convirtiendo en un factor a tener cuenta a la hora de la elección terapéutica. Así, en los glioblastomas multiformes tratados con TEMODAL la respuesta pasa de un 64% (respuesta

total/parcial) a sólo un 4% si el gen *MGMT* está o no metilado. Este y otros ejemplos convierten a la metilación en un parámetro a tener en cuenta a la hora de la decisión del tratamiento.

Por último, los fenómenos epigenéticos, por reversibles, se han convertido en una diana muy interesante para el tratamiento. Numerosos ejemplos en este sentido se encuentran en la bibliografía y en ensayos clínicos. Cabe destacar los derivados de 5-AZA.citidina como quimioterápicos en patologías intestinales, o en crisis blástica de leucemias linfoblásticas. Tanto los agentes inhibidores de la metilación como los inhibidores de la deacetilación de histonas se están convirtiendo en referentes en el desarrollo farmacéutico y los veremos en pocos años como elecciones terapéuticas habituales.

## **2.2 Resultados del trabajo actual en la caracterización de alteraciones epigenéticas del ADP y su impacto clínico- patológico.**

La idea principal y original de nuestro trabajo, se basa en un intento de demostrar la existencia de subtipos epigenéticos del ADP, y definir una relación entre metilación aberrante de región de promotor de genes elegidos con parámetros clínico-patológicos. Podíamos aventurarnos a sugerir que, un determinado perfil epigenético nos catalogaría los ADP según ciertas variables clínicas, sirviendo esto para asociar una terapéutica determinada.

### **2.2.1 Selección de los genes.**

El trabajo actual, es una primera aproximación al tema original y que lleva los resultados de trabajo en el equipo durante varios años. La propuesta final se basa en completar el estudio con un total de 25 genes seleccionados tras la revisión de literatura relacionada con epigenómica en cáncer, con los cuales queríamos abarcar el estudio de distintas vías metabólicas implicadas en la carcinogénesis.

Los genes que hemos elegido para esta parte del estudio, no son al azar, pertenecen a diferentes procesos celulares, implicados en la regulación del ciclo celular y con función principal antiapoptóticas, relacionados con supervivencia e inmortalidad de las células tumorales. El papel de algunos genes (*p16* y *Ciclina D2*), es bien conocido en el desarrollo del ADP, mientras que las alteraciones en la función mediante mecanismos epigenéticos, puede tener gran importancia, como se destaca en otros tipos de tumores (como *GSTP1* en cáncer de próstata).

La primera aproximación del estudio epigenético que hace mención al simple montaje de la técnica, nos obligó a tener un cierto control interno, que explica la inclusión de los genes (*p16* y *Ciclina D2*) cuya desregulación, a través de los mecanismos de hipermetilación sea comparable con los resultados descritos.

Sobre la lógica de los modelos conocidos de progresión en el ADP, añadimos también *RASSF1A*. Sin embargo, el interés especial del estado de metilación de los *GSTP1*, *RAR beta 2* y *HIN-1*, se debe a la novedad de información que presumimos obtener al respecto del cáncer de páncreas, dado que la función de estos genes en el ADP no figura en los meta-análisis globales de perfiles de metilación en esta enfermedad, pero sus efectos como genes supresores tumorales en cáncer, les convierte en objeto científico atractivo para someter al estudio inicial.

### **2.2.2 Agrupaciones tumorales.**

Los 61 pacientes diagnosticados con ADP elegidos para este estudio representan un grupo clínicamente uniforme, siendo los enfermos con cáncer de páncreas resecable al momento del diagnóstico y con seguimiento y tratamiento con protocolo estandarizado en el mismo centro hospitalario. Seleccionamos los criterios clínicos y patológicos que forman parte un perfil oncológico clásico (edad, género, estadio clínico e histopatológico, el tamaño tumoral, afectación del margen de resección quirúrgica y supervivencia). Como un criterio adicional incluimos al estudio el tipo de muestra (tumoral incluida en parafina, tumoral congelada y metástasis).

Dado que hemos instaurado la técnica de metilación desde el inicio en el laboratorio, esta división nos ayudó, por un lado, en el tratamiento de los resultados estadísticos al comparar tumor primario *versus* metástasis (que aparecen correctamente en la misma agrupación tumoral) y, por otro lado, debíamos comprobar con la propia experiencia si la técnica es apta tanto para el material congelado, que siempre es preferible, como para el incluido en parafina. Teniendo en cuenta la escasa colección de material congelado en el Biobanco de Tumores por motivos obvios (intervención quirúrgica infrecuente, errores de la entrega de material, tumor no visible macroscópicamente etc.), hemos demostrado la validez del material no congelado para aplicación de la técnica de metilación, que a su vez permite ampliar la serie del estudio.

Los intervalos de referencia elegidos para la división, en su mayor parte corresponden a la clasificación actual, salvo el tamaño tumoral y la supervivencia. Por un lado, los cortes en 4 o menos variables, nos permitieron “codificar” los datos como si de una secuencia de ADN se tratase para un estudio estadístico.

Las características respecto al tamaño tumoral están discutidas en el apartado “Factores pronósticos” de este capítulo. En cuanto a la supervivencia, el corte de estudio retrospectivo de los últimos 12 años, impide la valoración precisa de la supervivencia clásica, por lo que afrontamos este problema con cortes aproximados (véase material y métodos).

No obstante, la diferencia entre las agrupaciones tumorales, que suman las características clínicas y patológicas comunes, es mínima siendo la homogeneidad del grupo inicial. A pesar de las diferencias de criterios hemos logrado dividir los tumores en varios subtipos según intervalos de variables (véase material y métodos, y tabla 12).

### 2.2.3 Agrupaciones epigenéticas.

Los resultados más evidentes de este estudio son las agrupaciones tumorales que obtenemos tras el estudio de patrones de metilación con sólo dos variables (u- no metilado y m- metilado) para cada gen seleccionado (Tabla 13).

Se evidenció una clara prevalencia de desregulación de una o más vías en cada uno de las siete agrupaciones (clusteres) obtenidos. Así, en el grupo I se destaca la metilación prevalente de *Ciclina D2*, en el grupo II- del gen *RAR beta 2*, en grupo III- los genes frecuentemente metilados son *RAR beta 2*, *RASSF1A* y *HIN- 1*, en el grupo IV el gen más metilado es *GSTP1*, el mismo en conjunto con *p16* se encuentran hipermetilados en el grupo V. Llama atención el grupo VI, el más numeroso (n=16), con una alta tasa de metilación aberrante en casi todos genes estudiados, salvo *GSTP1* y *Ciclina D2*. El grupo VII presenta metilación aberrante en 100% de los casos únicamente para el gen *RASSF1A*.

Estos resultados por si sólo, reflejan la existencia de subtipos tumorales epigenéticos con algunas vías metabólicas “dominantes” desreguladas a través de hipermetilación de sus promotores. La coexistencia de más de dos vías clásicamente separadas por sus dianas y factores de activación, tales como *RAR beta 2*, *RASSF1A* y *HIN-1* (grupoIII) y *GSP1* y *p16* (grupo V), concuerda con las hipótesis modernas de las vías –candidatas y/o –colaboradoras que desencadenan un efecto funcional similar (progresión tumoral) utilizando características celulares distintas. El alto porcentaje de metilación aberrante en múltiples genes (grupo VI), sugiere un efecto acumulativo, bien conocido por los modelos animales, en las alteraciones de diferentes vías clásicas debido a la metilación.

### **3. Nuestros resultados comparados con otros estudios.**

En este apartado comparamos los resultados que hemos obtenido en el presente estudio con la información publicada sobre alteraciones epigenéticas en cáncer y en el ADP en particular, haciendo mención tanto a los datos comunes como a las diferencias más significativas.

#### **3.1 Perfiles epigenéticos y rutas metabólicas en el estudio.**

##### **3.1.1 *GSTP1***

Las enzimas de la familia glutatión S-transferasa (GSTs) juegan un papel biológico crucial en la respuesta al estrés oxidativo provocado por los agentes xenobióticos y los quimioterápicos, que desencadena su efecto proapoptótico mediante la fosforilización del JNK-Jun e interacción de la vía p53 hacia proliferación y diferenciación (Figura 16) (McIlwain, 2006). Por la función relacionada con la detoxificación en el carcinogénesis, los genes de esta familia se consideran también como genes- reparadores del ADN (Esteller, 1998).

Los estudios de hipermetilación de islas CpG del gen *GSTP1*, quizá más explorados en los últimos años, se relacionan, principalmente, con el cáncer de próstata. La metilación aberrante de este gen se encuentra en los estadios precoces con una alta especificidad y sensibilidad, en más del 90% de los carcinomas prostáticos primarios, pero no en el tejido normal, y hasta un 75% de alteraciones se detectan en la orina y el suero (Lee, 1994; Gonzalzo, 2003).

No obstante, existen limitaciones de utilización de un solo gen como marcador biológico, dado que la desregulación epigenética del *GSTP1* ocurre frecuentemente en otras neoplasias. Esteller et al (2001) en un trabajo sobre perfiles epigenéticos en cáncer humano destaca que la hipermetilación de este gen ocurre en el 65% del carcinoma hepático, en el 31% del cáncer de mama y en el 20% del cáncer renal.

Para evitar el problema de infradiagnóstico del cáncer, se utilizan análisis masivo, buscando el conjunto de marcadores específicos y sensibles para el diagnóstico y predicción de un determinado tumor. Respecto al cáncer de próstata, los últimos estudios dedicados al diagnóstico epigenético y estratificación del riesgo, confirman la importancia de la hipermetilación de los genes *GSTP1* y *RAR beta 2* como marcadores diagnósticos, aunque un grupo de genes diferentes se asocia con predicción bioquímica de recurrencia local y sistémica (Vanaja, 2009).

La función de *GSTP1* en el ADP está escasamente estudiada y permanece incierta. En la revisión de la literatura se descarta la importancia de este gen en el ADP, y se publica un porcentaje bajo de hipermetilación aberrante del *GSTP1*, desde 0/18 (0%) (Esteller, 1998 y 2001), hasta 13% (Peng, 2006). En nuestro estudio hemos encontrado una proporción más alta de hipermetilación de promotor de *GSTP1* (32,9%), lo que hace pensar una posible implicación en el desarrollo del ADP.

Es frecuente encontrar diferentes combinaciones epigenéticas en este gen con *p16*, cuyo silenciamiento es un evento conocido en la vía clásica y ocurre en los estadios precoces del ADP; por la analogía con los hallazgos en cáncer de próstata, podría indicar una posible desregulación de este gen en el proceso inicial del ADP (Tabla 13). Por otro lado, el interés del estudio del gen *GSTP1* en el ADP en pacientes tratados podría tener una relación con el efecto de resistencia a los agentes de quimioterapia.

### **3.1.2 *p16* y *Ciclina D2*.**

El papel de ambos genes coincide en su importante implicación como puntos clave de regulación del ciclo celular, formando parte de las alteraciones bien conocidas en la vía “canónica” del desarrollo de cáncer, y en particular del ADP (Véase Material y métodos y Figura 17).

Los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio concuerdan con los datos de la literatura. Tal como habíamos mencionado previamente, la inclusión de estos genes en el primer panel del estudio, nos sirvió, en cierto modo, como control interno de la técnica y del estado del material, siendo los resultados finales los esperables.

La inactivación del gen *p16* por el mecanismo de metilación aberrante del promotor está descrita en múltiples neoplasias. Entre ellas la proporción de esta alteración es frecuentemente alta, hasta 1/3 de los casos se encuentran en melanoma y en el ADP (Hamilton, 2000). Nuestro resultado coincide con lo descrito en la literatura (38,2%), evidenciando dos subtipos epigenéticos con prevalencia de metilación aberrante de este gen (Tabla 13).

En cuanto a la *Ciclina D2*, otro gen crucial en la cascada reguladora del ciclo celular, se han descrito datos de hipermetilación aberrante en el ADP, que llega a ser hasta un 2/3 (65,1% vs. 27,6% en nuestros resultados) en tumores primarios, destacando que existe una discreta porción de hipermetilación (hasta 20%) en el tejido normal, relacionada con la edad (Matsubayashi, 2003). Este hallazgo no descarta a la *Ciclina D2* como un candidato a formar parte del “panel epigenético” de posibles marcadores biológicos en el ADP, gracias a la alta tasa de desregulación que presenta este tipo tumoral.

### **3.1.3 *RAR beta 2***

Los retinoides, un grupo de análogos estructurales y funcionales de la vitamina A, son reconocidos efectores en la diferenciación celular, apoptosis y supresión tumoral en cancerogénesis, comprobados *in vitro*, en modelos animales y en ensayos clínicos (Soprano, 2004).

Desde los años 1990 se sabe de la pérdida de expresión de receptores retinoides nucleares, incluso *RAR beta 2*, en líneas celulares de varios tipos de cáncer mediante

técnicas de Northern blotting y RT-PCR. Frecuentemente este hallazgo se ha encontrado en células neoplásicas y/o displásicas de cáncer de localización en cabeza-cuello, orofaríngeal, esofágico, pulmonar, mamario, prostático y también en el ADP (Xu, 1996).

La metilación aberrante de la región del promotor del gen *RAR beta 2* está probada, sobre todo, como biomarcador en cáncer de mama, y como un factor predictivo relacionado con el riesgo de recidiva en cáncer pulmonar no microcítico, utilizando material citológico de aspirado con aguja fina en mama y de aspirado bronquial (Bean, 2005; Grote 2005).

Además, está demostrada una estricta relación entre inducción de la hipermetilación del promotor de este gen con neoplasias dependientes de los agentes carcinogénicos del tabaco (4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanon y benzopireno diol epóxido (BPDE)), tales como el cáncer pulmonar en modelos animales y en células de cáncer esofágico (Vuellemont, 2004; Song 2001).

En nuestro estudio hemos encontrado una proporción alta de hipermetilación del gen *RAR beta 2* (27,6%). Dado que el único factor epidemiológico de riesgo consolidado en varios estudios del ADP está relacionado con el tabaquismo (Lin, 2002), esto podría explicar la alteración del metabolismo de los retinoides, aunque clásicamente el ADP no se consideran como una neoplasia estrictamente dependiente con el consumo del tabaco. Sin embargo, hemos encontrado al menos 2 subtipos con alteración prevalente en este gen en las agrupaciones epigenéticas de nuestro estudio (Tabla 13).

Por consiguiente, la detección de hipermetilación del gen *RAR beta 2* se podría proponer como un posible biomarcador diagnóstico. Por otro lado, la demostración de inducción de expresión del *RAR beta 2* tras el tratamiento con agentes demetilantes (5-aza-2 deoxycitidine) en varias líneas celulares de cáncer, hace valorar este evento

como promotor en posibles aplicaciones terapéuticas para el ADP (Di Croce, 2002).

### **3.1.4 *RASSF1A***

El ADP es uno de ejemplos típicos de los tumores dependientes de *RAS*. Presentan la mutación puntual en prácticamente todos los casos, inclusive en lesiones precursoras y un alto porcentaje de esta alteración genética en pancreatitis crónica (Mattias-Löhr, 2005).

Desde el punto de vista terapéutico, la mutación de *K-RAS* provoca una gran limitación del tratamiento con agentes anti-EGFR, descartando esta línea de quimioterapia, aplicada con éxito en tratamiento de cáncer primario y metastático colorrectal y pulmonar (Baker, 2011).

Recientemente, se ha descubierto que el gen *RASSF1A* podría actuar como efector del oncogén *RAS*, carente de una actividad enzimática, como un gen supresor tumoral y con una mayor contribución en distintos tipos tumorales mediante mecanismos epigenéticos (Pfeifer, 2005). La función de este gen está asociada a varios puntos de control en la vía apoptótica de *K-RAS* (Figura 18) (Donninger, 2007). Sin embargo varios estudios demostraron que no existe una relación estricta entre alteraciones genéticas entre *K-RAS* y *RASSF1A* (Damann, 2003)

En nuestro estudio hemos encontrado el porcentaje más alto de metilación aberrante del promotor en el gen *RASSF1A*, aproximadamente en la mitad de los casos (48,7%), comparado con otros genes, con una distribución en agrupaciones mas bien heterogénea, revelando 2 subtipos epigenéticos con hipermetilación de este gen en el 100% de los casos (Tabla 13).

Cabe destacar que, en uno de ellos la hipermetilación del gen *RASSF1A* es la única alteración epigenética presente, demostrando la importante implicación de este gen en

esta patología. Si se asume la teoría de que, virtualmente, todos los ADP presentan el *K-RAS* mutado, un hallazgo bien conocido y precoz, nuestros resultados confirman que es la principal vía metabólica alterada en el ADP asociada con efectores de *RAS* mediante alteración de los mecanismos genéticos y/o epigenéticos. Además, que se vean afectados epigenéticamente sustratos de *RAS*, ofrece posibles puntos de aplicación terapéutica en control de esta vía metabólica.

### **3.1.5 *HIN-1***

*HIN-1* (high in normal-1) es un claro candidato a gen supresor de tumores, cuyo silenciamiento mediante hipermetilación del promotor está descrito en varias neoplasias humanas, destacando una alta frecuencia en cáncer de mama, carcinoma no microcítico pulmonar y carcinoma nasofaríngeo (Krop, 2004; Wong, 2003). La función fisiológica de este gen, como una citoquina putativa, está asociada con diferenciación terminal de las células epiteliales mucinosas traqueobronquiales durante la embriogénesis en ratones (Porter, 2002).

El interés especial que este gen demostró en el cáncer de mama, identificado mediante análisis seriados de expresión génica, consistió en su alta expresión en el epitelio mamario normal y una desregulación epigenética significativa en cáncer primario (94%) y en el carcinoma in situ (95%), lo que propuso que la detección de metilación aberrante del gen *HIN-1* podría ser un marcador de cáncer precoz, así como una posible diana terapéutica tras “reactivación” del gen silenciado (Krop, 2001).

Otra “ventaja” del gen *HIN-1* radica en su naturaleza secretora, que facilita la detección de la proteína, relacionada con el funcionamiento del gen, en lavado bronquial, en saliva y en suero. En cuanto a la expresión tisular, a diferencia del carcinoma mamario que demuestra una posible hipermetilación en el tejido adyacente al tumor, en el cáncer de páncreas el tejido no tumoral carece de alteraciones epigenéticas (Krop, 2004), que correlaciona con nuestra observación.

En el análisis de las agrupaciones tumorales, hemos detectado dos subtipos de ADP con muy alta tasa de metilación aberrante del gen *HIN-1* (Tabla 13), que, tomando como contexto los hallazgos en cáncer mamario, podría tener valor diagnóstico y terapéutico en el ADP.

### **3.2 Perfil epigenético: tumores primarios *versus* metástasis.**

El aspecto devastador del cáncer y la causa principal de mortalidad por cáncer están relacionados, en la mayor parte de casos, con la enfermedad metastásica (Kinzler, 1996). Una de las peculiaridades del ADP consiste en su rápida progresión y diseminación metastásica por vía linfática que “desprecia” los parámetros oncológicos clásicos, tales como el tamaño tumoral y el grado de diferenciación (Real, 2003).

Existen varias teorías que tratan de explicar los mecanismos y especificidad metastásica. Entre ellos la “*homing theory*” que sugiere una vía por quimiotaxis desde los sitios “receptores” de células malignas (Muller, 2001). La otra teoría sería la denominada “*fertil soil theory*” que propone la implicación de los factores propios microambientales tumorales en el desarrollo e incremento de la invasión y motilidad de las células tumorales (Fidler, 2003). Las últimas publicaciones hacen referencia el origen celular de las metástasis desde células troncales y sus subpoblaciones (Nguyen D, 2011).

La enfermedad metastásica es un proceso dinámico que incluye la aparición de un linaje celular específico, relacionado con microambiente celular, restricciones anatómicas y múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas (Chiang, 2008).

Los mecanismos de progresión metastásica en el ADP siguen siendo poco conocidos. Se ha definido el importante papel de los genes que controlan la adhesión celular, metaloproteasas y el gen supresor tumoral *KAI1* (Keleg, 2003).

Como se ha descrito en material y métodos y en resultados, unido a la correlación clínico-patológica y epigenética *per se* de los tumores tomados como un todo, hemos comparado los perfiles de metilación entre tumor primario y metástasis del mismo paciente (Figuras 27-29).

Se ha demostrado, en primer lugar, la diferencia significativa de metilación aberrante agrupando las muestras en parejas tumor-metástasis. En total, se ha encontrado descenso en los niveles de metilación aberrante del promotor “” de los genes *RASSF1A*, *Ciclina D2*, *HIN- 1* y *RAR beta 2* en metástasis comparado con el tumor primario, existiendo un discreto aumento de los niveles de metilación en *p16* y *GSTP*.

Estos hallazgos epigenéticos son discordantes con la regla general, que defiende la acumulación y/o conservación (al menos) de los perfiles de expresión génica y epigenética en la metástasis, como un evento de aumento de agresividad y capacidad de invasión (Nguyen, 2011; Yegnasubramanian S, 2004). Sin embargo, las características propias de la epigenética como cambios potencialmente reversibles, encajan con las teorías de invasión y motilidad de las células tumorales primarias tras transformación epitelio-mesenquimal. Es decir, que para obtener la capacidad de invadir los tejidos, el microambiente, y en particular la pared de los vasos linfáticos, una célula tumoral sufre varias transformaciones a nivel molecular, relacionadas tanto con el aumento, como con la disminución de expresión de algunas proteínas, que le permiten realizar una acción diferente de las células del tumor primario.

Por los resultados de nuestro estudio, se podría suponer una implicación de algunas vías “promotoras” de motilidad, destacando el papel de incremento de la metilación de los genes *p16* y *GSTP1* en la progresión del ADP metastática.

#### 4. “Huella epigenética”. Análisis comparativo de las agrupaciones tumorales y epigenéticas.

Una vez determinadas las agrupaciones tumorales y epigenéticas, intentamos buscar coincidencias y solapamiento entre los dos árboles filogenéticos. Los resultados recogidos en las Figuras 25 y 26 demostraron que existen grupos que comparten criterios clínico-patológicos con alteraciones epigenéticas definidas.

Esta coincidencia es lo que definimos en la hipótesis original del trabajo como “huella epigenética”. Para explicar este evento, hemos elegido los dos grupos más grandes de coincidencia en patrones clínico-patológicos y epigenéticos de 8 y 6 casos respectivamente, marcados en círculos y sus tablas correspondientes en la Figura 26.

Una vez “descifrados” los datos que habían sido codificados para el estudio de agrupación PHYLIP, en el primer grupo de 8 casos, observamos que el 100% (8/8) de los casos el ADP se localiza en la cabeza del páncreas, estadificados como pT3, muestran como única alteración epigenética el gen *RASSF1A*.

La lectura de este hallazgo podría significar que, los tumores localmente avanzados, que miden más de 2 cm y se extienden a tejido adiposo parapancreático (sin afectación del eje celíaco ni arteria mesentérica superior) tienen como patrón diferenciador las alteraciones epigenéticas en la vía de *RAS*, destacando, una vez más, la implicación de esta vía como evento crucial en la progresión tumoral del ADP (apartado 3.1.4 de este capítulo).

El segundo grupo lo forman 6 casos de tumores primarios con localización tumoral en la cabeza del páncreas y estadio clínico IIB, que mostraron una combinación de metilación aberrante de *RAR beta 2* (4/6 casos), *RASSF1A* (5/6 casos) y *HIN-1* (6/6 casos). El estadio clínico IIB refiere los casos del apartado pT1, pT2 y pT3, con metástasis ganglionares linfáticas (pN1), pero no a distancia (M0).

El criterio básico de este estadio consiste en la afectación ganglionar en tumores primarios tanto localizados (pT1, pT2), así como localmente avanzados (pT3), sin dependencia del tamaño tumoral. Dicho de otra forma, se confirma que el conjunto de alteraciones epigenéticas mencionadas sirve como marcador de progresión tumoral metastásica. El hecho de que coexistan distintas vías metabólicas involucradas en la progresión tumoral, no contradice la hipótesis de acumulación genética y epigenética en transición de una neoplasia hacia una enfermedad metastásica (Véase el apartado 3.2 de este capítulo).

Una observación interesante respecto a este grupo de genes, aparece cuando comparamos el estado de metilación en tumores primarios *versus* metástasis (Figuras 27-29). El grupo reducido de casos con tumor primario y metástasis ganglionar, recuperados para el estudio, han demostrado un efecto de pérdida/disminución de metilación de *RAR beta 2*, *RASSF1A* y *HIN-1* en metástasis comparado con el tumor primario. Es decir, que mientras que el tumor primario “acumula” las alteraciones epigenéticas llegando al “punto crítico” en la progresión y disemina a metástasis, los clones tumorales nuevos pierden esta propiedad adquirida, según se deduce de nuestros resultados.

Sin embargo, para extrapolar esta hipótesis, es indispensable realizar un estudio más amplio, que podría tener un reflejo en la terapéutica: ¿si se demostrase la eficiencia de las drogas demetilantes, hasta qué punto su utilización pudiera beneficiar el enfermo? Y ¿en qué se consiste la progresión tumoral metastásica a nivel epigenético: hipermetilación *versus* hipometilación de los promotores?

Estos resultados hacen que surjan numerosas preguntas que animan a continuar con el estudio, para lo que se precisa aumentar la serie y incrementar la batería de genes a estudio.

## **5. Aportación de las nuevas vías de control celular en el manejo de los pacientes con el diagnóstico de ADP.**

Desde el “renacimiento” de los conocimientos y aplicaciones de la epigenética en las últimas dos décadas, se han abierto nuevos horizontes para los estudios moleculares en el cáncer. Cualquier evento molecular destacable forma parte de la base de conocimiento de la enfermedad, que a su vez traslaciona a una posible búsqueda de aplicaciones en el diagnóstico, pronóstico, predicción y tratamiento.

Todas estas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas forman parte de una necesidad en el ADP, siendo las alternativas clásicas muy pobres e inespecíficas en cada uno de esos puntos.

Los avances en el tratamiento epigenético (Tabla 7), tradicionalmente se iniciaron en enfermedades hematológicas, siendo históricamente revolucionarios en la ciencia médica. Las investigaciones actuales en este campo abren el camino para estudios en otros tipos de cáncer, incluido el ADP, que supone una urgencia médica con el fin de controlar la enfermedad.

La finalidad de éste estudio consiste en definir y caracterizar las posibles evidencias y aplicaciones epigenéticas de los genes seleccionados en la progresión tumoral, y aportar conocimiento en el diagnóstico, pronóstico, predicción y tratamiento del ADP.

# ***CONCLUSIONES***



## VI CONCLUSIONES

1. El estudio ha demostrado la importancia de las alteraciones epigenéticas de los genes *GSTP1*, *p16*, *Ciclina D2*, *RASSF1A*, *RAR beta 2* y *HIN-1* en el Adenocarcinoma Ductal de Páncreas (ADP), comparado con el tejido pancreático normal. Esta diferencia específica podría ser utilizada en la detección de la metilación aberrante de estos genes, en un panel y/o por separado, como posibles biomarcadores tumorales.
2. Se ha obtenido porcentajes significativos de metilación aberrante en la región del promotor de los genes supresores tumorales seleccionados: *RAR beta 2* (27,6%), *RASSF1A* (48,7%), *GSTP1* (32,9%), *p16* (38,2%), *CiclinaD2* (27,6%) y *HIN-1* (38,2%). Destaca la vía de *RAS* como la principal y más frecuentemente alterada en el ADP.
3. En el grupo seleccionado, clínicamente uniforme, hemos obtenido siete subtipos epigenéticos con alteración en uno y/o más genes estudiados mediante las técnicas de MSP y secuenciación.
4. Existe cierto solapamiento entre parámetros clínico-patológicos y perfiles de metilación que definen una “huella epigenética” que muestra correlación entre tumor primario localmente avanzado y metilación aberrante de la región promotorora del gen *RASSF1A*,
5. Existe asociación entre progresión tumoral hacia enfermedad metastásica y frecuente hipermetilación de los genes *RAR beta 2*, *RASSF1A* y *HIN-1*.
6. Se ha demostrado diferencia entre perfiles de metilación en tumor primario *versus* metástasis, con respecto a la discriminación de metilación del promotor en los genes *RAR beta 2*, *RASSF1A*, *Ciclina D2* y *HIN-1*
7. Se propone un papel importante de la metilación de los genes *p16* y *GSTP1*, como posible promotor de progresión tumoral metastásica en los ADP.



# ***BIBLIOGRAFÍA***

---



## VII BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkader I, Sanchez L, Cameselle-Teijeiro J. et al. Cell-cycle-associated markers and clinical outcome in human epithelial cancers: a tissue microarrays study. *Oncol Reports* 2005; 14: 1527-1531.
- Adsay N, Basturk O, Cheng J et al. Ductal neoplasia of the pancreas: nosologic, clinicopathologic, and biologic aspect. *Semin Radiat Oncol* 2005; 15:254-264
- Al-Aynati M, Radulovich N, Ho J et al. Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6589-6605.
- Amir R, Van der Veyver I, Tran C et al. Rett syndrome is caused by mutations in – linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 1999; 23:185-188
- Attir J, Srinivasan R., Majumdar S. et al. Alterations of tumor supressor gene p16/INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 22
- Baker J, Dutta D, Watson D et al. Tumour gene expression predict response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104:488-495
- Bast R, Kufe D, Pollock R et al. *Cancer medicine*, 5th ed. Ontario, Canada, 2000
- Batge B, Bosslet K, Sedlacek H et al. Monoclonal antibodies against CEA-related components discriminate between pancreatic duct type carcinomas and nonneoplastic duct lesions as well as nonduct type neoplasias. *Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986;408:361-374

- Bean G, Scott V Yee L et al. Retinoic acid receptor-beta2 promoter methylation in random periareolar fine needle aspiration. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 790-798
- Beger H, Matsuno S, Cameron J. Diseases of the pancreas. Current surgical therapy. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 2008. Cap 44: 489-496
- Bilimoria K, Bentrem D, Ko C et al. Validation of the 6th Edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from National Cancer. *Cancer* 2007; 110:738-744
- Bird A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321:209-213
- Blagosklonny M. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:621-627
- Brat D, Hahn S, Griffin C et al. The structural basis of molecular genetic deletion an integration of classical cytogenetic and molecular analyses in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150:383-391
- Cabner B, Lynch J, Longo D.: Harrison's manual of oncology. McGraw Hill Medical, New York, 2008.
- Chen J, Baithun SI. Morphological study of 391 cases of exocrine pancreatic tumours with special reference to the classification of exocrine pancreatic carcinoma. *J Pathol*, 1985; 146:17-29
- Chiang A, Massague J. Molecular bases of metastasis. *N Engl J Med* 2008; 359:2814-2823
- Clark S, Harrison J, Paul C et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2990-2997.
- Couch F, Johnson M, Rabe K et al. The prevalence of BRCA2 mutation in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:342-346

- Dahl C, Guldberg P. A ligation assay for multiplex analysis of CpG methylation using bisulfite- treated DNA. *Nucleic Acid Res*, 2007; 35:144
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M et al. Epigenetic inactivation of the RAS-association domain family 1 (RASSF1A) and its function en human carcinogenesis. *Histol.Histhpathol* 2003; 18:665-677
- Di Croce L, Raker V, Corsaro M et al. Methyltransferase recruitment and DNA methylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002; 295:1079-1082
- Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutation in the plasma of patients with colorectal tumores. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; 102:16368-16373
- DiGiuseppe J, Hruban R, Goodman S et al. Overexpression of p53 protein in Adenocarcinoma de pancreas. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:684-688
- Donniger H, Vos M, Clark G. The RASSF1A tumor supressor. *J Cell Sci* 2007; 120:3163-3172
- Durie P, Lerch M, Lowenfels A et al. Genetic disorders of the exocrine pancreas. *An Overview and Update*. Kargen, Basel, 2002
- Edge S, Paqe D, Balch C et al.: American Joint Committee on Cancer (AJCC) *Cancer Staging Manual*, 6th edition. Springer-Verlag New York LLC, 2009. Chap 24: 241-249
- Esteller M, Corn P Urena J et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*, 1998; 58:451-458

- Esteller M, Corn P, Baylin S et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 161:3225-3229.
- Esteller M. Epigenetics in evolution and disease. *Lancet* 2008; 372: 90-96
- Fazlul H.S, Sanjeev B., Yiwei L. Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:326-336
- Feero W, Guttmacher A. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011; 364:1144-1153
- Feldmann G, Maitra A. Molecular genetics of pancreatic ductal adenocarcinomas and recent implications for translational efforts. *J Mol Diagn* 2008; 10:111-122)
- Fidler I. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:453-458
- Freeman J, Wang Y, Giles J. Epigenetic modulation and attacking the hedgehog pathway. *Cancer Biol Ther* 2009; 8:1340-1342
- Gao J, Song J, Huang H et al. Methylation of the SPARK gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:28-37
- Ghadirian P, Boyle P, Simard A et al. Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int J Pancreatol* 1991;10:183-196
- Globocan (2002) <http://www-ep.iarc.fr/globocan/database.htm>.9-13-2005
- Goggins M, Offerhaus G, Hickers W et al. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type k-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol* 1998;152:1501-1507

- Goggins M, Schutte M, Lu J et al. Germline BRCA2 mutation in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56:5360-5364
- Gonzalzo M, Pavlovich C, Lee S et al. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2673-2677
- Griffin C, Hruban R, Morsberger L et al. Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Res* 1995;55:2394-2399
- Griffith J, Mahler H. DNA ticketing theory of memory. *Nature* 1969;223:580-582
- Grote H, Schmiemann V, Geddert H et al. Aberrant promoter methylation of p16(INK4A), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 116:720-725
- Haig D. The dual origin of epigenetics. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 2004; LXIX:1-4
- Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon, France. IARC Press, 2000. Cap 10: 219-231
- Hansen R, Wijmenga C, Luo P et al. The DNMT3b DNA methyltransferase gene is mutated in the IFC immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14412-14417
- Harlsberg A, Gressler S. Epigenetics and human health. Linking hereditary, environmental and nutritional aspects. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 2010; Cap 1:3-6
- Hassan M, Bondy M, Wolff R et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:2696-2707

- Hermann P, Huber S, Herrler T et al. Distinct population of t cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1:313-323
- Hernandez-Muñoz I, Skoudy A, Real F et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: cellular origin, signalling pathway and stroma contribution. *Pancreatology* 2008; 656: 1-8.
- Hezel A, Kimmelman A, Stanger B, et al.: Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006; 20:1218-1249
- Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-1617
- Hingorani S, Wang L, Multani A et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; 7:469-483
- Holliday R Pugh J. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1997; 187:226-232
- Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987;238:163-170
- Howes N, Lerch M, Greenhalf W et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:252-261
- Hruban R, Goggins M, Parsons J et al. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2969-2972
- Hruban R, Maitra A, Schulick R et al. Emerging molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2008; 2:10-15

- Hruban R, van Mansfeld A, Offerhaus G et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the pancreas. A study of 82 carcinomas using combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143: 545-554
- Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington D et al. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 2005; 92: 2076-2083
- Imamura Y, Mizuno S. Comparison of pancreatic cancer mortality in five countries: France, Italy, Japan, UK and USA from WHO mortality database (1960-2000). *Jpn J Clin Oncol*, 2005; 35:283-286
- Issa J, Taby R. Cancer epigenetic. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:376-392
- Issa J, Kantarjian H. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3839-3946
- Jaffee E, Hruban R, Canto M, et al. Focus of pancreas cancer. *Cancer Cell* 2002; 2:25-28
- Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96
- 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.
- Kawahira H, Ma N, Tzanakakis E et al. Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. *Development* 2003; 130:4871-4879
- Keleg S, Büchler P, Ludwig R et al. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2:14-20
- Kinzler K and Vogelstein B. Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* 1996; 379:19-20

- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13:472-482
- Krop I, Player A., Tablante A. et al. Frequent HIN-1 methylation and lack of expresión in multiple human tumor types. *Mol Cancer Res* 2004; 2:489-494
- Krop I, Sgroi D, Porter D et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9796-9801
- Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins y Cotran pathologic basis of disease. 7ª edición. ELSEVIER España, Madrid 2005. Edición en español. Cap 19:943-958
- Laheru D, Jaffe E. Immunotherapy for pancreatic cancer- science driving clinical progress. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:459-467
- Launois B, Franci J, Bardaxoglou E et al. Total pancreatectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas with special reference to resection of the portal vein and multicentric cancer. *World J Surg* 1993; 17:122-127
- Lee W, Isaacs W, Bova G. et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new cancer biomarker. *Cancer Biomark Prev* 1997; 6:443-450
- Li D, Jiao L, Li Y et al. Polymorphisms of cytochrome P450A2 and N-acetyltransferase genes, smoking and risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27:103-111
- Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T et al. A prospective cohorte study of cigarett smoking and pancreatic cancer en Japan. *Cancer Causes Control* 2002; 13:249-254

- Lowenfels A, Maisonneuve P, Cavallini et al. Pancreatitis and the risk of the pancreatic cancer. International Pancreatitis study group. N Engl J Med 1993; 328:1433-1437
- Lowenfels A, Maisonneuve P, Lankisch P. Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. Gastroenterol Clin North Am 1999; 28: 637-685
- Lowenfels A, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006; 20: 197-209
- Lowenfels A, Maisonneuve P, Dimagno E et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. J Nat Cancer Inst 1997; 89:442-446
- Luttges J, Galehdari H, Brocker V et al. Allelic loss is often the first hit in the biallelic loss of the p53 y DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. Am J Pathol 2001; 158:1677-1683
- Luttges J, Schemm S, Vogel I, et al. The grade of pancreatic ductal carcinomas is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation. J Pathol 2000; 191:154-161
- Luttges J, Vogel I, Menke M et al. The retroperitoneal resection margin and vessel involvement are important factors determining survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. Virchows Arch 1998;433:237-242
- Lynch H, Fitzsimmons M, Smyrk T et al. Familial pancreatic cancer: clinicopathologic study of 18 nuclear families. Am J Gastroenterol 1990;85:54-60
- Macaluso M, Paggi M, Giordano A. Genetic and epigenetic as a hallmarks of the intricate road of cancer. Oncogene 2003; 22:6472-6478

- MacIlwain C, Townsend D, Tew K. Glutation S-transferase polymorphism: cancer incidence and therapy. *Oncogen* 2006; 25:1639-1648
- Martin S, Sato N, Dhara S et al. Aberrant methylation of the human Hedgehog Interacting Protein (HHIP) gene en pancreatic neoplasm. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 728-733
- Matsubayashi H, Canto M, Sato N et al. DNA methylation alterations in the pancreatic juce of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res* 2006; 66: 1208-1217
- Matsubayashi H, Sato N, Brune K et al. Age- and disease-related methylation of multiple genes in nonneoplastic duodenum and in duodenal juce. *Clin Cancer Res* 2005; 11:573-583
- Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N et al. Methylation of Cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. *Clin Cancer Res* 2003;9:1446-1452
- Matthias-Löhr J, Heinemann V, Friess H. Pancreatic cancer. UNI-MED Verlag AG, Hardcover, 2005. Cap 1:18-27
- Michaud D. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir.*2004; 59:99-111
- Mills K, Ramsahoye B. DNA methylation protocols. Human Press Totowa, New Jersey, 2002
- Moore M, Goldstein D, Hamm J et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a fase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trial Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-1966
- Muller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Natur* 2001; 410:50-56

- Murphy K, Brune K, Griffin C et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutation in 17%. *Cancer Res* 2002; 62:3789-3793
- Nguyen D. Tracing the origins of metastasis. *J Pathol* 2011; 223:195-204
- Okano M, Bell D, Haber D et al. DNA methyltransferases DNMT3a and DNMT3b are essentials for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99:247-257
- Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19:219-220
- Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 310-326
- Omura N, Li C, Li A. et al. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1146-1156
- Ozcelik H, Schmoker B, Di-Nicola N et al. Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet*, 1997; 16:17-18
- Parkin D, Bray, Ferlay et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005; 55:74-108
- Parsi M, Li A, Li C et al. DNA methylation alterations in ERCP brush samples of patients with suspected pancreatobiliary disease. *Clin Gastro Hepatol* 2008; 6:1270-1278
- Paulsen M, Ferguson-Smith A. DNA methylation in genomic imprinting, development and disease. *Am J Pathol* 2001; 159:97-110
- Pazdur R, Coia L, Hoskins W et al. Cancer management: a multidisciplinary approach. 7th edition. The Oncology Group, New York, 2005. Cap 14:273-301

- Peng D, Kanai Y, Sawada M et al. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 2006; 27:1160-1168
- Pfeifer G, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry Mosc* 2005; 70:576-583
- Porter D, Lahti-Domenici J, Torres-Arzayus M et al. Expression of high in normal-1 (HIN-1) and uteroglobin related protein-1 (UGRP-1) in adult and developing tissues. *Mech Dev* 2002, 114:201-204
- Prathibha R., Harsha H.C., Pandey A. Molecular alterations in exocrine neoplasm of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 113:405-412
- Ranganathan P, Harsha H, Pandey A. Molecular alterations in exocrine neoplasm of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:405-412
- Real F, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology* 2008;135:724-728
- Real F, Malats N, Lesca J et al. Family history of cancer and germline BRCA2 mutations in sporadic exocrine pancreatic cancer. *Gut* 2002; 50:653-657
- Real F. A “Catastrophic hypothesis” for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* 2003; 124:1958-1964
- Riggs A. X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975;14:9-25

- Rivera F, Lopez-Tarruella S, Vega- Villegas M et al. Treatment of advanced pancreatic cancer: from gemcitabine single agent to combinations and target therapy. *Cancer Treat Res* 2009; 35:335-339
- Saif M, Karapanagiotou L, Syrigos K. Genetic alterations in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2007;13:4423-4430
- Sakorafas G, Tsiotos G. Molecular biology of pancreatic cancer: potential clinical implication. *BioDrugs*.2001; 15:439-452
- Sanger F, Coulson A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975; 94:441–448
- Sato N, Fukushima N, Maehara N et al. SPARK/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2003;22:5021-5030
- Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003;63:3735-3742
- Sato N, Goggins M. The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2006; 13:286-295
- Sato N, Matsubayashi H, Abe T et al. Epigenetic down-regulation of CDKN1C/p57KIP2 in pancreatic ductal neoplasms identified by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005;11:4681-4688
- Sato N, Parker A, Fukushima N et al. Epigenetic inactivation of TPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2005;24:850-858

- Schneider G, Siveke J, Eckel F, et al. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 2005; 128:1606-1625.
- Schussler M, Skoudy A, Ramaekers F et al. Intermediate filaments as differentiation markers of normal pancreas and pancreas cancer. *Am J Pathol* 1992; 140:559-568
- Schutte M, Hruban RH, Gerardts J et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:3126-3130
- Sessa F, Bonato F, Frigerio B et al. Ductal cancer of the pancreas frequently express markers of gastrointestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 1990; 98:1655-1665
- Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009;101:424-431
- Shutte M, Hruban R, Geradts J et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57:3126-3130
- Singh M, Maitra A. Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implication. *Pancreatology* 2007;7:9-19
- Smith L, Sanders J, Kaiser R et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321:674-679
- Sohn T, Yeo C. The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: a review. *Surg Oncol* 2000; 9:95-101.
- Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumours of the pancreas. AFIP: Washington, D.C. 1997

- Song S, Xu X. Effects of benzo(a)pyrene diol expose on expression of retinoic acid receptor-beta in immortalized esophageal epithelial cells and esophageal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:872-877
- Soprano D, Qin P, Soprano K. Retinoid acid receptors and cancer. *Annu Rev Nutr* 2004; 24:201-221
- Spencer S, Gerety R, Pienta K et al. Modeling somatic evolution in tumorigenesis. *PLoS Comput Biol* 2006; 2:939-947
- Strange R, Fryer A. The glutathione S- transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 1999; 148:231-249
- Su G, Hruban R, Bansal R et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancer. *Am J Pathol* 1999; 154:1835-1840
- Tan A, Jimeno A, Lin S et al. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 2009; 3:425-438
- Tanimura M, Yamamoto H, Shibata H et al. Carcinoma en heterotopic gastric pancreas. *Acta Pathol Jpn.* 1979; 29:251-257
- Tennant D, Durán R, Boulahbel H et al. Metabolic transformation en cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30:1269-1280
- Tersmette A, Petersen G, Offerhaus G. et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:738-744
- Vanaja D, Ehrich M, Van der Boom D et al. Hypermethylation of genes for diagnosis and risk stratification of prostate cancer. *Cancer Invest* 2009; 27:549-560

- Volgelstein B, Kinzler K. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9:138-141
- Vuellemont B, Pulling L, Palmisano W et al. Carcinogen exposure differentially modulates RAR-beta promoter methylation, an early and frequent event in mouse lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25:623-629
- Wagner M, Gretchen F, Weber et al. A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes Dev* 2001; 15:286-293
- Weber M, Hellmann I, Stadler M et al. Distribution, silencing, potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39:457-466
- Whelan A, Bartsch D, Goodfellow P. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1995; 333:975-977
- Wilentz R, Geradts J, Maynard R et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic ductal lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res* 1998; 58:4740-4744
- Winter J, Ting A, Gallmeyer E et al. Absence of E-cadherin expression distinguishes noncohesive from cohesive pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:412-418
- Wong T, Kwong D, Sham J et al. Promoter hypermethylation of high-in-normal 1 gene in primary nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3042-3046
- Xu X, Stier U, Rosewicz S et al. Selective suppression of nuclear retinoic acid receptor beta gene expression in human pancreatic cancer. *Int J Oncol* 1996;8:445-451

- Xu X. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett* 2007;253:14-24
- Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H et al. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinoma with widespread microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61:3139-3144
- Yamano M, Fujii H, Takagaki T et al. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157:83-92
- Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo M et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64:1975-1986
- Yeo C, Cameron J, Lillemoe K et al. Pancreatoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg* 1995; 221: 721-733