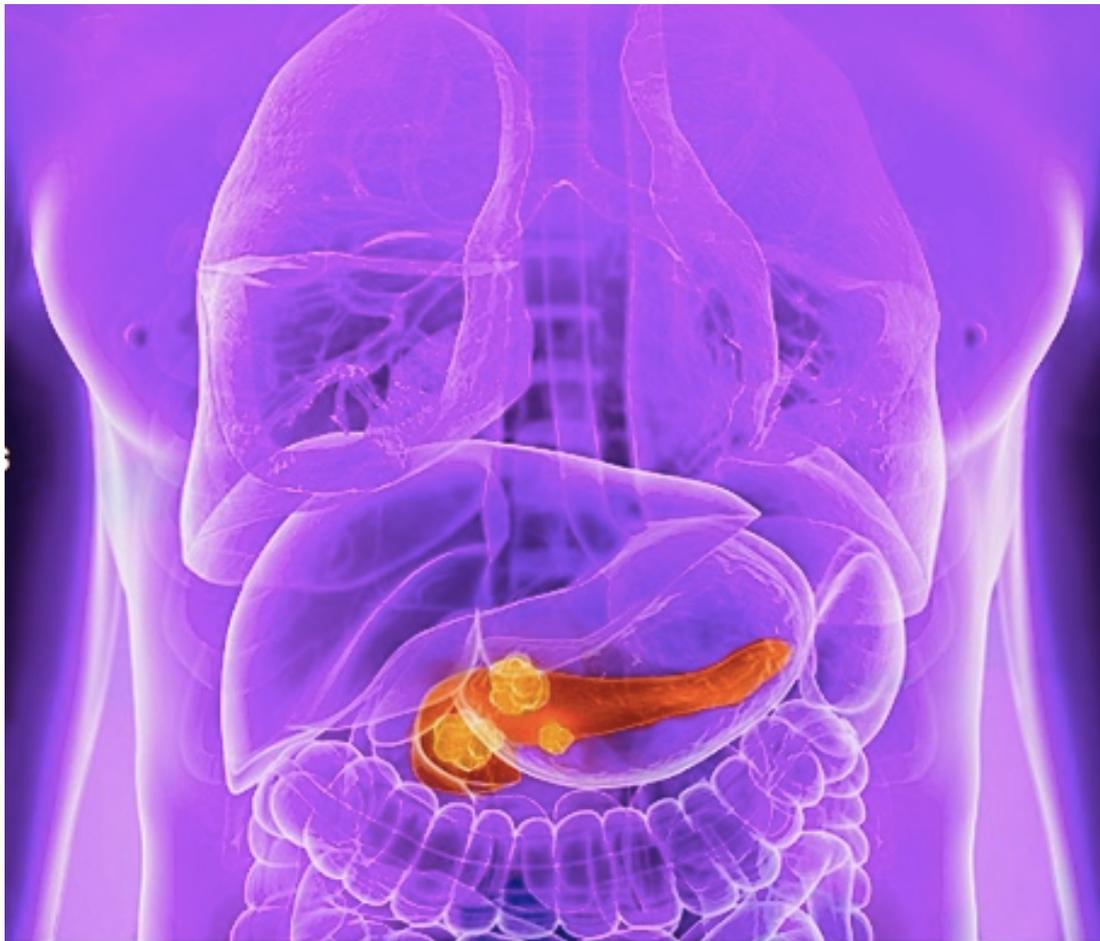


**Caracterización del cáncer de páncreas familiar por
secuenciación masiva y biopsias líquidas**

**Characterization of familial pancreatic cancer by massive
sequencing and liquid biopsy**



Trabajo de Fin de Grado

EMMA BARRETO MELIÁN

Tutorizado por Teresa Acosta Almeida y Julie Earl.

Grado en Biología. Julio 2018

Agradecimientos.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Hospital Universitario Ramón y Cajal por permitirme realizar una estancia de 6 meses en sus instalaciones, donde he podido formarme y vivir la experiencia de trabajar en un laboratorio de investigación, así como el trato directo con los pacientes, lo que me ha hecho comprender no sólo la importancia y necesidad de este trabajo sino también las historias personales que hay tras cada muestra que llega al laboratorio, que esperan de nuestro esfuerzo lo mejor.

Agradecer también al Jefe del Servicio de Oncología Médica Dr. Alfredo Carrato por dirigir el grupo de trabajo y poner a nuestra disposición todos los medios posibles. Por supuesto, agradezco muy encarecidamente a los miembros del Laboratorio de Investigación de Oncología Médica la excelente acogida que me han dado durante este tiempo, y les felicito por su esfuerzo y dedicación a la lucha contra el cáncer.

Le estoy profundamente agradecida a la Dra. Julie Earl, mi directora en el laboratorio, por toda la ayuda que me ha prestado, su paciencia y su optimismo, y la felicito por su gran profesionalidad, deseándole un futuro aún más prometedor del que ya tiene.

Así mismo, también le agradezco al Dr. José Carlos Díez Ballesteros y Dra. Teresa Acosta Almeida por ser mis tutores de este Trabajo de Fin de Grado, y guiarme para ayudarme a mejorar lo máximo posible.

Y el mayor agradecimiento de todos, va dirigido a mis padres, Juan Carlos y María, y mi hermano Óscar, así como a toda mi familia, por ser mi mayor apoyo durante estos cuatro años de carrera que por fin, después de tanto esfuerzo, vemos que terminan exitosamente.

A todos ellos, gracias.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
El cáncer de páncreas. Generalidades.	2
Opciones de tratamiento.	3
Biología molecular de PDAC.	3
Los casos jóvenes.	4
Cáncer de páncreas familiar (FPC).	5
Registro de cáncer de páncreas familiar.	5
Factores de riesgo.	5
Los criterios de inclusión, el “screening” y los biomarcadores.	7
Protocolo de PanGen-Fam.	8
Objetivos.....	9
Material y Métodos	10
Recogida de pacientes y procesamiento de muestras clínicas.	10
Estudios genéticos.	10
Validación del cfDNA en plasma como un biomarcador predictivo en PDAC.	12
Aislamiento de células tumorales de tejido para establecer cultivos celulares primarios.	12
Análisis estadístico.	13
Resultados.....	14
Validación de mutaciones Sanger.	14
cfDNA y el pronóstico de los pacientes.	16
Secuenciación masiva de cfDNA.	21
Cultivos celulares primarios a partir de tejido tumoral en fresco.	23
Discusión	24
Heterogeneidad de mutaciones en genes supresores de tumor.	24

cfDNA como biomarcador no invasivo.	25
Conclusiones:	28
Conclusions:	28
Bibliografía	28
Anexo 1. Primers empleados en validación de mutaciones germinales.	30

Resumen

El cáncer de páncreas es uno de los tumores con peor pronóstico, solo por detrás del cáncer de pulmón. En la mayoría de los casos esporádicos (90-95%) aparece *KRAS* mutado, que resulta una diana terapéutica difícil, por ello el tratamiento muchas veces ineficaz junto a un diagnóstico tardío generan una tasa de supervivencia muy baja. Existen pacientes con numerosos casos de cáncer de páncreas en su familia, lo que sugiere una causa genética subyacente. En este estudio se identifican mutaciones en la línea germinal de aquellos pacientes afectados y sus familiares, que tienen un riesgo más elevado de desarrollar este tipo de tumor. El estudio del riesgo genético parece estar justificado pues se detectan diferencias en la supervivencia de los pacientes de cáncer esporádico y los casos familiares. También se estudia el valor del DNA libre circulante en plasma (cfDNA) como biomarcador tumoral no invasivo, que resulta estar correlacionado con el estadio tumoral y el pronóstico de los pacientes. No parece ser necesario identificar la fracción que proviene del tejido afectado (cftDNA), ya que la concentración de cfDNA permite distinguir entre pacientes con mayor y menor esperanza de vida, y un estadio más o menos avanzado. El cfDNA parece ser una fuente de información para la caracterización del tumor por identificación de mutaciones somáticas.

Palabras clave: cáncer de páncreas, biomarcador, biopsia líquida, secuenciación.

Abstract

Pancreatic cancer is a tumor with one of the worst prognostic, just behind lung cancer. In most cases (90-95%) *KRAS* appears mutated, and since this gene is a difficult therapeutic target, an ineffective treatment in combination with the late diagnosis results in a very low survival rate. There are patients with family members affected by pancreatic cancer, suggesting a genetic cause of familiar pancreatic cancer. In this study, we identified germline mutations in patients and their healthy relatives, so they have high risk to develop this type of tumor. Genetic risk studies seems to be justified because differences in survival of sporadic and familial patients were detected. The use of circulating free DNA in plasma (cfDNA) as a non-invasive tumoral biomarker was also studied, which seems to be correlated with tumor stage and patient prognosis. Since concentration values of cfDNA allow us to distinguish between patients with higher or lower life expectancy, it is not necessary to distinguish between tumor (cftDNA) and normal circulating free DNA, and between more or less advanced stages. Also, cfDNA appears to be a valuable tool for tumor characterization by somatic mutations identification.

Key words: pancreatic cancer, biomarker, liquid biopsy, sequencing.



Introducción

Introducción

El cáncer de páncreas. Generalidades.

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es una neoplasia letal con diferenciación glandular originada en el epitelio ductal, y es la forma más común de cáncer de páncreas (Adeva *et al.*, 2017; Capurso *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2017). Se sitúa como la tercera causa de muerte por cáncer con 70000 casos en Europa durante 2008, y 43000 diagnósticos nuevos y 36800 muertes anuales estimadas en Estados Unidos; sin embargo en la última década la tasa de este tipo de neoplasia se ha visto incrementada en un 0,8% cada año (Carrato *et al.*, 2017; Grover & Syngal, 2010). En su mayoría los nuevos diagnósticos son esporádicos y la edad media se sitúa en torno a los 70 años (Grover & Syngal, 2010; Mocci *et al.*, 2015), de los cuales la mayoría de pacientes tienen una esperanza de vida reducida a meses, de hecho los supervivientes a los 5 y 10 años se sitúan en torno al 7,2% y menos del 4% respectivamente (Carrato *et al.*, 2017; Hidalgo *et al.*, 2017). El tiempo de duplicación promedio de un tumor pancreático es de 40-60 días (Nishida *et al.*, 1999), es un cáncer que se disemina precozmente en su historia de desarrollo a sitios muy distantes, lo que hace del PDAC una prioridad en investigación y prevención (Hidalgo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2004; Mocci *et al.*, 2015).

El PDAC, por lo general, carece de síntomas específicos; la sintomatología más común incluye un cuadro de fatiga, pérdida de peso, dolor abdominal y orina oscura (Hidalgo *et al.*, 2017) lo que supone que alrededor del 80% de los casos tengan un diagnóstico tardío; a excepción de la ictericia, signo más evidente y característico. Esta situación se ve agravada aún más por la especial agresividad biológica de la patología (Adeva *et al.*, 2017).

El pronóstico es variable según la localización orgánica. La mayoría (60-70%) de los tumores se originan en la cabeza del páncreas, entre un 20-25% en el cuerpo y cola, y un 10-20% tiene una afectación difusa. Los tumores localizados en la cabeza pancreática suelen diagnosticarse en etapas más tempranas, debido a la aparición de ictericia y esteatorrea; mientras que los tumores en cuerpo y cola son detectados más tardíamente (Hidalgo *et al.*, 2017). Aquellos tumores localizados en la cabeza del páncreas tienen fácil acceso al torrente sanguíneo y pueden diseminarse sin dificultad; sin embargo los localizados en el cuerpo/cola pancreática aunque no están tan bien irrigados, están en contacto con otros órganos como el hígado, el estómago o el bazo, hacia donde pueden extenderse.

INTRODUCCIÓN

Opciones de tratamiento.

Los tratamientos tradicionales para el cáncer tienen un impacto reducido en el PDAC, la mayoría de los pacientes desarrollan metástasis y fallecen debido a los efectos metabólicos debilitantes del crecimiento ilimitado (Li *et al.*, 2004; Carrato *et al.*, 2017).

Entre el 15-20% de los pacientes tienen una enfermedad resecable, para los cuales la intervención quirúrgica puede suponer la recuperación total de la salud; mientras que para los de una enfermedad localmente avanzada, irresecable y metastática, el tratamiento es paliativo (Li *et al.*, 2004), y habitualmente consiste en la combinación de gemcitabina y abraxane, que confiere una supervivencia global de 5,5 meses (Hidalgo *et al.*, 2017). Por ello la detección precoz, la prevención y el “screening” en individuos de alto riesgo con cáncer de páncreas familiar y otros síndromes son necesarios (Capurso *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2004) para el manejo de los pacientes, el pronóstico y la comprensión de la biología molecular de esta enfermedad.

Biología molecular de PDAC.

El cáncer de páncreas es de naturaleza multigénica, y habitualmente aparecen alterados oncogenes, genes supresores de tumor y genes encargados del mantenimiento de la estabilidad genómica (Li *et al.*, 2004; Sohn & Yeo, 2000; Sakorafas & Tsiotos, 2001).

En los casos esporádicos, entre el 90-95% de los pacientes tienen mutaciones somáticas activadoras en *KRAS* en las primeras etapas del desarrollo carcinogénico, lo que sugiere que esta alteración es necesaria para el desarrollo del PDAC y por ello resulta una interesante diana terapéutica; sin embargo, sus propiedades bioquímicas específicas hacen que sea complicada una acción dirigida sobre *KRAS*; por ello estos tumores manifiestan mayor resistencia al tratamiento y un peor pronóstico (Li *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2012; Earl *et al.*, 2015; Witkiewicz *et al.*, 2015). El cáncer de páncreas tiene la frecuencia más alta de mutaciones *KRAS* de todas las neoplasias humanas, y suelen estar asociadas al consumo de tabaco o alcohol (Li *et al.*, 2004). Las proteínas RAS están implicadas en procesos de proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular. Las mutaciones oncogénicas hacen que el ratio de GTP hidrolizado disminuya y *KRAS* se vuelva insensible a las GAPs (proteínas activadoras de GTPasas) [Figura 1].

En PDAC hay otras alteraciones genéticas implicadas, además de *KRAS*, el 50% de los casos esporádicos muestran la proteína P53 no funcional. El gen *TP53* codifica para P53, responsable de la regulación de la respuesta al estrés citotóxico, mediante el mantenimiento de la estabilidad genómica, ya que regula el “checkpoint” G1/S del ciclo celular, induce la

INTRODUCCIÓN

apoptosis y protege de la acumulación de carga mutacional. P53 evita la transformación celular por activaciones de oncogenes y pérdidas de función de genes supresores de tumor, pero la pérdida de función de P53 supone un aumento en la proliferación, división y muerte celular (Reznik *et al.*, 2014).

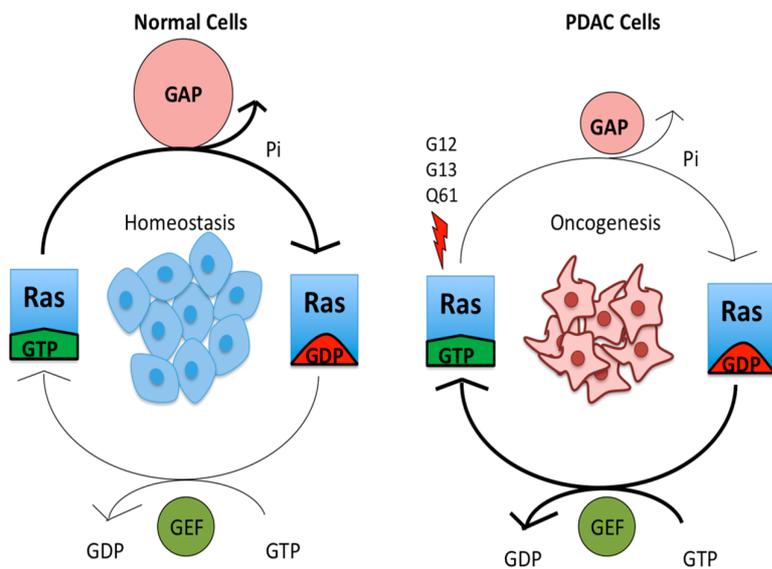


Figura 1. Representación de la actividad GTPasa de KRAS en condiciones homeostáticas y oncogénicas. En condiciones normales, KRAS se activa cuando se une a GTP, e hidroliza la molécula en GDP y Pi gracias a la actividad de las proteínas GAP. Sin embargo, en condiciones oncogénicas KRAS está mutado, por tanto permanece insensible a GAP, y las moléculas de GDP se desvían hacia un intercambiador de GDP, que libera GTP y hace que KRAS permanezca activa, promoviendo la proliferación celular (Zeitouni *et al.*, 2016).

SMAD4 también aparece inactivado en un 40% de los casos de PDAC. Su producto tiene localización nuclear, pues su función consiste en la regulación de la transcripción de determinados genes de control del crecimiento, mediante su activación por TGF- β . La pérdida de función de *SMAD4* supone la pérdida de inhibición del crecimiento celular (Reznik *et al.*, 2014).

Otra alteración que afecta al 40% de los casos de PDAC esporádicos afecta a *CDKN2A*, gen codificante para P16, proteína reguladora del ciclo celular y del “checkpoint” G1/S a través de la vía P16/RB. Mutaciones en *CDKN2A* junto a *KRAS* mutado favorecen el desarrollo de PDAC, y aceleran la progresión del tumor (Reznik *et al.*, 2014, Zhen *et al.*, 2015).

Los casos jóvenes.

Existen casos de PDAC que aparecen mucho antes de la edad media de diagnóstico, en torno a los 50 años o menos, lo que sugiere que estos individuos tienen un mayor riesgo respecto al resto de la población, debido a la interacción de los factores genéticos (mutaciones activadoras en oncogenes o inactivadoras en genes supresores de tumor o de reparación de errores de replicación del DNA) y malos hábitos de vida como el consumo habitual de tabaco (Huang *et al.*, 2018). Estos casos jóvenes constituyen un 5-10% de los PDAC, y se observa

INTRODUCCIÓN

que muchos fumadores quedan incluidos en esta categoría, en comparación con los casos esporádicos y los casos con historia de cáncer familiar (Mocci *et al.*, 2015).

Cáncer de páncreas familiar (FPC).

Solo un 10-15% de los casos diagnosticados de PDAC resultan ser de cáncer familiar, y aunque aún tienen que ser identificadas algunas de las mutaciones responsables, ya se conoce la relación entre el cáncer de páncreas familiar (FPC) y las mutaciones en la línea germinal de algunos genes implicados en otras patologías, como *BRCA2*, *PALB2*, *CDKN2A*, *PRSS1*, *BRCA1*, *MLH1*, *MLH2*, *ATM* y *PTEN* entre otros (Biankin *et al.*, 2012; Zhen *et al.*, 2015; Witkiewicz *et al.*, 2015; Shindo *et al.*, 2017). El FPC sigue un patrón de herencia autosómico dominante y su heterogeneidad fenotípica puede radicar en la penetrancia variable de las múltiples mutaciones deletéreas asociadas además a su interacción con factores no genéticos (Reznik *et al.*, 2014), como la exposición a determinados riesgos ambientales, tales como el consumo habitual de tabaco o alcohol ya citado anteriormente. Esto supone que individuos de una misma familia hereden mutaciones en su línea germinal, por ello tienen una frecuencia de PDAC más elevada que el resto de la población, y por lo tanto son considerados individuos de alto riesgo (HRI).

Registro de cáncer de páncreas familiar.

En 2009 se inició el registro de cáncer de páncreas familiar (PanGen-Fam) en España. Esta iniciativa partió de la colaboración entre el Hospital Universitario Ramón y Cajal y el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Dicho registro fue creado con la intención de recoger a todas aquellas familias a nivel nacional con un riesgo de padecer cáncer de páncreas mayor que la población general. El objetivo principal es llevar a cabo un “screening” sobre todos los familiares de alto riesgo y la detección de tumores en sus primeros estadios, así como la identificación de determinantes genéticos hasta el momento desconocidos y la evaluación de marcadores tumorales mínimamente invasivos en biopsia líquida (Mocci *et al.*, 2015). Actualmente PanGen-Fam cuenta con 84 familias incluidas en su registro.

Factores de riesgo.

Existe una vinculación de ciertos factores de riesgo al desarrollo de PDAC, como la edad avanzada -recordemos que la edad de diagnóstico se sitúa en torno a los 70 años-, el sexo (PDAC es más frecuente en hombres que en mujeres), la aparición de diabetes mellitus tipo II después de los 50 años, el consumo de tabaco y alcohol, la obesidad, la pancreatitis crónica y algunos desórdenes genéticos asociados a la historia familiar, como el cáncer

INTRODUCCIÓN

colorrectal hereditario (síndrome de Lynch (LS)), melanoma lunar múltiple atípico familiar (FAMMM), síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), el cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC), la pancreatitis hereditaria (HP) y la fibrosis quística (CF). Todos estos factores incrementan el riesgo de desarrollar un PDAC (Carrato *et al.*, 2017; Hidalgo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2004; Lowenfels *et al.*, 1997; Mocci *et al.*, 2015; Rustgi, 2014).

El HBOC se asocia con mutaciones en la línea germinal de *BRCA2*, *BRCA1* y *PALB2*. El análisis de familias con mutaciones conocidas en *BRCA2* reveló que los portadores de estas mutaciones con cáncer de mama y/u ovario tenían 3,5-10 veces más riesgo de desarrollar PDAC en comparación con aquellos familiares “wild-type”, además de que permite predecir la supervivencia a largo plazo de los enfermos de PDAC. El LS está relacionado con mutaciones habituales en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, FAMMM con mutaciones en *CDKN2A* y PJS con mutaciones en el gen *STK11* (Grover & Syngal, 2010; Mocci *et al.*, 2015; Reznik *et al.*, 2014; Shindo *et al.*, 2017).

HP sigue un patrón de herencia autosómico dominante, con penetrancia del 80%, y es debida a mutaciones en la línea germinal del gen *PRSSI* y *CFTR*. Los pacientes con HP tiene un alto riesgo de cáncer pancreático incluso décadas después de la aparición de la pancreatitis (Lowenfels *et al.*, 1997).

Se estima que el consumo habitual de tabaco causa un 25-29% de los casos de cáncer de páncreas, y que los fumadores desarrollan cáncer de páncreas entre 9 y 20 años antes que los no fumadores (Grover & Syngal, 2010; Mocci *et al.*, 2015; Lowenfels *et al.*, 2001). En este sentido, se han identificado aductos aromáticos de DNA asociados al tabaco, lo que sugiere que el páncreas humano es susceptible a la exposición a los carcinógenos y, por tanto, al desarrollo del cáncer, sobre todo cuando la reparación de errores o roturas en el DNA debido a estos compuestos se encuentra comprometida. De hecho, se ha demostrado una interacción significativa entre el gran consumo de tabaco, los polimorfismos en los genes *XRCCI* y el gen de *O6-alquil guanina DNA transferasa* y el riesgo de cáncer de páncreas; lo que sugiere que aquellos individuos con una capacidad de reparación del DNA y detoxificación insuficiente tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de páncreas (Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1998). Consumidores habituales de tabaco tienen tres veces mayor riesgo de mutación que individuos no fumadores, lo que sugiere que las mutaciones *KRAS* en cáncer de páncreas pueden estar asociadas a factores ambientales y al estilo de vida. Las altas tasas de consumo de tabaco en Europa central y del este podrían estar, por tanto, relacionadas con los abundantes casos de PDAC jóvenes en estas áreas.

INTRODUCCIÓN

Los criterios de inclusión, el “screening” y los biomarcadores.

El *International Cancer of the Pancreas Screening Consortium* recomienda el cribado de PDAC para HRI de familias con FPC. Se recomienda que este cribado comience a los cincuenta años, o diez años antes de la edad de aparición del caso más joven en la familia, lo que primero ocurra; y los criterios de inclusión para este programa [Tabla 1] consiste en que se consideran a aquellas personas con dos o más familiares de primer grado con PDAC, o tres o más familiares con PDAC independientemente del grado de relación en su parentesco (Adeva *et al.*, 2017). También quedan incluidas aquellas familias con un caso de PDAC y LS, un caso de PDAC y FAMMM; con PJS y HP; un caso de PDAC y al menos dos de HBOC; y aquellas con un caso de PDAC precoz (menos de 50 años) (Mocci *et al.*, 2015).

Las técnicas de cribado para estos individuos consisten en realizar análisis de sangre, resonancias magnéticas (MRI) y ecoendoscopias digestivas altas (EUS) anualmente para realizar un seguimiento que permita detectar anomalías precozmente. La EUS está considerada como la técnica más sensible para la detección y diagnóstico de PDAC, mientras que las MRI, no invasivas y más sencillas de comparar a lo largo del tiempo, permiten identificar neoplasias extra-pancreáticas y pequeños tumores potencialmente curables y lesiones premalignas (Capurso *et al.*, 2015; Mocci *et al.*, 2015).

Fenotipo familiar	
FPC	Al menos 2 casos de PDAC en familiares de 1 ^{er} grado
FPC \geq 3	Más de 2 familiares con PDAC no necesariamente de primer grado
PC \leq 50	Al menos un caso de PDAC con una edad de diagnóstico menor a 50 años
FPC+ \leq 50	Al menos 2 casos de PDAC en familiares de primer grado además de un caso de diagnóstico menor a 50 años
HBOC+PC	Al menos 1 caso de PDAC y 2 de HBOC
HBOC+PC \leq 50	Al menos 2 casos de HBOC y uno con PDAC joven
PC+otros síndromes	Al menos un caso de PDAC y otro de otras alteraciones: FAMMM, Lynch, cáncer gástrico...

Tabla 1. Conjunto de fenotipos familiares recogidos en el proyecto PanGen-Fam y descripción de las condiciones para la inclusión de las familias en los mismos. FPC \geq 3 significa que el paciente posee al menos 3 familiares afectados por cáncer de páncreas. PC \leq 50 significa que se trata de un paciente con al menos un familiar con cáncer de páncreas joven, cuya edad en el momento del diagnóstico es de 50 años o menos.

La búsqueda de biomarcadores específicos continúa siendo un objetivo primordial, puesto que en la actualidad se evalúan los niveles del antígeno CA 19-9 en sangre que, aunque útil, resulta inespecífico pues aparecen falsos positivos debido a patologías benignas como pancreatitis aguda u otras afecciones gastrointestinales (Hidalgo *et al.*, 2017).

Los ácidos nucleicos son liberados al torrente sanguíneo y circulan libremente por la sangre periférica debido a la apoptosis y necrosis de las células (DNA libre circulante

INTRODUCCIÓN

(cfDNA)). Durante la tumorigénesis hay un aumento en la tasa de renovación de las células, lo que provoca una acumulación de cfDNA debido a que las células tumorales liberan a la circulación estos fragmentos de DNA libre circulante tumoral (cftDNA), que pueden encontrarse en la fracción acelular de la sangre junto a fragmentos de DNA provenientes de la muerte programada de las células normales (Heitzer *et al.*, 2015). Por esto, los pacientes con cáncer desarrollan mayores niveles de cfDNA que pacientes sin cáncer. Así se ha explotado el cfDNA como un potente biomarcador de cáncer, ya que un alto contenido de cfDNA en plasma se asocia a una peor supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de pulmón y cáncer colorrectal (Heitzer *et al.*, 2015). El contenido en cfDNA también puede incrementar en estados no cancerosos, como tumores benignos y enfermedades inflamatorias, sin embargo, si se estudia en combinación con la detección de mutaciones en el DNA específicas del tumor puede resultar una herramienta muy eficaz, ya que unas concentraciones significativamente altas de cftDNA en pacientes con cáncer no solo demuestran la presencia de la enfermedad sino también su progresión (Earl *et al.*, 2015).

Protocolo de PanGen-Fam.

Los participantes entran al estudio de forma voluntaria, y firman un consentimiento informado aprobado previamente por el Comité ético del centro. Luego, se realizan entrevistas para la recolección de datos demográficos, hábitos de consumo de tabaco y alcohol, así como de su historia médica. Las familias reciben un código único, y su información es almacenada bajo un sistema de seguridad de acuerdo con las leyes de protección de datos y privacidad, tal y como se indica en los protocolos (Reglamento UE 2016/679, LOPD 15/1999 y RD 1720/2007).

Se extraen muestras de 30 mililitros de sangre periférica para el aislamiento de suero, plasma, linfocitos, neutrófilos y eritrocitos; manipulados y almacenados según los protocolos establecidos; y cuando existe la posibilidad, se extrae tejido en fresco en las ocasiones en las que es posible resecar a los pacientes o en parafina si proviene de otros centros hospitalarios, que es etiquetado y almacenado de forma adecuada (Grover & Syngal, 2010; Mocci *et al.*, 2015).

Cuando se detecta en un paciente una mutación de interés, entonces se estudia si los demás miembros de la familia incluidos en el estudio también son portadores para esta mutación. En caso de que un paciente resulte ser negativo para la mutación, se procede a la secuenciación genómica/exómica para encontrar nuevos genes candidatos o variantes asociadas al cáncer de páncreas.



Objetivos

Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, la principal hipótesis que pretende comprobar este estudio es si aquellos pacientes con cáncer de páncreas familiar tienen mutaciones germinales, que hacen que el sujeto y sus familiares tengan un mayor riesgo al desarrollo de PDAC; frente a los casos de PDAC esporádicos, en su mayoría caracterizados por mutaciones somáticas en *KRAS*.

Para la consecución del mismo, se abordarán como objetivos específicos los siguientes:

1. la evaluación del cfDNA como biomarcador tumoral no invasivo.
2. la valoración del pronóstico de los pacientes según los niveles de cfDNA en plasma.
3. la identificación de mutaciones somáticas por secuenciación masiva que puedan ser posibles dianas terapéuticas.



Material y métodos

Material y Métodos

Recogida de pacientes y procesamiento de muestras clínicas.

Siguiendo los protocolos establecidos de PanGen-Fam, se obtuvieron muestras de sangre a partir de los participantes que previamente habían firmado el consentimiento informado para el estudio aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Ramón y Cajal. De estas muestras se aislaron las diferentes fracciones ya citadas anteriormente (suero, plasma, linfocitos, neutrófilos y eritrocitos). Los tubos de sangre total se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el plasma y se centrifugó a 3000 g x 5 minutos, el sobrenadante obtenido se repartió en alícuotas de 1 ml en criotubos. El resto del contenido del tubo de EDTA se resuspendió con 8 ml de medio RPMI (Corning 10-040-CM). Se formó un gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Life Science 17144002) con dicha disolución y se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos sin freno, para que no se alterara el gradiente y se separasen adecuadamente todos los componentes sanguíneos. La nube de linfocitos superior se recogió con una pipeta Pasteur, se le añadió PBS (Corning, 21-040-CMX12) hasta los 12 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 2 ml de medio de congelación, que se repartieron entre 2 criotubos. La nube de leucocitos polimorfonucleares se recogió de igual forma y se le añadieron 10 ml de cloruro amónico, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, el pellet se resuspendió en 2 ml de cloruro amónico y se repartió en 2 Eppendorfs que se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se guardó en forma de pellet leucocitario. De los hematíes que quedaban bajo el gradiente de Ficoll, se dispensaron 0,8 ml en 2 criotubos.

Del tubo de suero se extrajo y alícuotó el mismo en criotubos de 1 ml. Todas las alícuotas se guardaron convenientemente etiquetadas a -80°C. A excepción de los criotubos de linfocitos, que al día siguiente del procesamiento de la muestra se pasaron a un tanque de nitrógeno líquido, para asegurar su conservación y viabilidad durante un mayor periodo de tiempo.

Estudios genéticos.

Se hallaron mutaciones en los pacientes por secuenciación masiva en un panel de genes ya elaborado, que incluye los principales genes implicados en tumorigénesis (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *PMS2*, *PRSS1*, *CFTR*, *PTEN*, *SMAD4*, *TP53*, *VHL*, *MUTYH*, *CDH1*, *CDKN2A*, *APC*, *TERT*, *TET2*, *DNMT2A*, *POLN*, *POLQ*, *ASXL1*, *FANCG*, *BUB1B*, *ESCO2*, *FANCC*, *FANCM*, *MSH4*, *RAD54L*, *BMPRI1A*), luego por análisis por Ingenuity Variant Analysis (Qiagen) se seleccionaron las

MATERIAL Y MÉTODOS

variantes de interés para el estudio, candidatas a la validación por Sanger (Witkiewicz *et al.*, 2015) [Tabla 2]. Los requisitos para la selección de estas variantes fueron que la alteración supusiera la pérdida de la función del gen, que tuviese una frecuencia menor al 0,05 en la población, y que hubiese evidencias de que la variante fuese al menos potencialmente patogénica (según datos del NCBI).

Gen	Variante genotípica	Alteración proteica	Gen	Variante genotípica	Alteración proteica
MSH2	c.1021C>G c.184C>G c.382C>G	p.Leu341Val p.Leu62Val p.Leu128Val	ATM	c.4388T>G c.8560C>T c.146C>G	p.Phe1463Cys p.Arg2854Cys p.Ser49Cys
MSH6	c.1857A>C c.951A>C c.1467A>C	p.Glu317Asp p.Glu619Asp p.Glu489Asp	PMS2	c.2186_2187delTC c.433A>C	p.Leu729Gln p.Ile18Val
MLH1	c.1852A>G c.1558A>G c.1129A>G c.1214A>G c.1937A>G c.1643A>G	p.Lys520Glu p.Lys377Glu p.Lys618Glu p.Tyr405Cys p.Tyr548Cys p.Tyr646Cys	FANCM	c.5791C>T c.5713C>T	Arg1931STOP Arg1905STOP
			BRCA2	c.8851G>A c.8850G>T c.6959T>A c.8032_8033dupAG c.398_400delCAC c.1786G>C	p.Ala2951Thr p.Lys2950Asn p.Leu2320STOP p.Asp2679Gly p.Pro133del p.Asp596His
CFTR	c.1682C>A	p.Ala561Glu	CDKN2A	c.176T>G	p.Val59Gly
MUTYH	c.1187G>A c.1106G>A c.1178G>A c.1103G>A c.827G>A	p.Gly396Asp p.Gly368Asp p.Gly379Asp p.Gly396Asp p.Gly276Asp	FANCC	c.584A>G	p.Asp195Gly
			CHEK2	c.409C>T c.1562G>A	p.Arg137Ter p.Arg521Gln
			DNMT3A	c.2194T>C	p.Phe732Leu

Tabla 2. Conjunto de mutaciones detectadas en genes implicados en procesos de tumorigénesis por secuenciación masiva y análisis por Ingenuity, de carácter patogénico o potencialmente patogénico para su posterior validación en los pacientes y familiares HRI.

Neutrófilos y linfocitos se emplearon para realizar extracciones de DNA (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen 69504), y se cuantificó la concentración obtenida mediante Nanodrop. Se diseñaron los “primers” necesarios para dichas variantes mediante herramientas bioinformáticas como ClinVar, Ensembl y Primer Blast (NCBI) [Anexo 1] y se validaron para diseñar el programa óptimo para cada uno de ellos en función de la temperatura de anillamiento y la concentración de Mg²⁺. Se buscó en los pacientes enfermos mutaciones germinales en los genes de interés, mediante amplificación por PCR, geles de agarosa y secuenciación por el método de Sanger (BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit, Thermo Fisher Scientific 4337455).

También se emplearon las alícuotas de los familiares sanos para verificar si eran portadores de las mutaciones, y por tanto tienen mayor riesgo genético al desarrollo de un PDAC o no.

Validación del cfDNA en plasma como un biomarcador predictivo en PDAC.

El plasma ha demostrado ser una mejor fuente de cfDNA que el suero, ya que en él hay menores concentraciones de DNA nativo que pueda camuflar al DNA tumoral en los análisis (Heitzer *et al.*, 2015). Por tanto, alícuotas de 1 ml de plasma se emplearon para extraer el cfDNA, mediante 2 métodos diferentes: Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega, AS1480) y QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, 1017647). Las muestras procesadas mediante el kit Maxwell dieron lugar a un producto más puro pero de menor concentración, que fue examinada mediante cuantificación por fluorometría (Quantus). Respecto a la colección de cfDNA obtenida por el kit QIAamp, menos pura pero con mayor concentración, valorada también por fluorometría, se realizó un paso posterior de purificación mediante 4200 TapeStation System (Agilent), seleccionando la banda de 170 pb para generar genotecas con las que realizar secuenciación masiva por TruSight Tumor 15 (Illumina, OP-101-1001) (Witkiewicz *et al.*, 2015). Este kit está enfocado en 15 genes implicados en tumorigénesis, que además incluye SNP e “indels” importantes. Tras la secuenciación de los “pools” que contienen las genotecas de 8 pacientes diferentes cada uno, todas las lecturas fueron filtradas según los parámetros de calidad de Illumina, y se llevó a cabo un análisis preliminar con la aplicación BaseSpace (Illumina) realizando un alineamiento de las lecturas obtenidas con una secuencia de referencia para determinar las mutaciones y su frecuencia en el cfDNA de los pacientes.

Aislamiento de células tumorales de tejido para establecer cultivos celulares primarios.

En las pocas ocasiones en las que fue posible obtener tejido tumoral en fresco, dada la baja proporción de pacientes en estadio resecable en el momento del diagnóstico del PDAC, el servicio de Anatomía Patológica del centro hospitalario suministró pequeños bloques de tejido tumoral, a partir de los cuales se procedió a aislar células tumorales mediante Tumor Dissociation kit (Miltenyi Biotec, 130-095-929), y el uso de inmunomagnetismo, empleando un anticuerpo específico para fibroblastos unido a esferas magnéticas (Anti-fibroblast microbeads, Miltenyi Biotec, 130-050-601), que permite retener a estas células en la columna imantada y separar así a las células tumorales con el fin de establecer líneas celulares y valorar con ellas en un futuro la actividad de diferentes compuestos, como fármacos antitumorales.

Análisis estadístico.

Para comprobar la heterogeneidad de los datos y la significatividad de las diferencias entre ellos se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, que se aplica a datos que no se ajustan a una distribución conocida. La aceptación de la hipótesis alternativa ($p < 0,05$) significó que existían diferencias significativas. Se utilizó el estimador de supervivencia global Kaplan-Meier para los pacientes según sus datos de cfDNA. Se empleó el software informático R Project para la computación de los datos y el análisis estadístico.



Resultados

Resultados

Validación de mutaciones Sanger.

Tras la amplificación por PCR del DNA de los pacientes para determinados genes en los que se encontraron mutaciones por análisis bioinformático de Ingenuity y su secuenciación por Sanger se pudieron confirmar 13 mutaciones germinales en 16 pacientes diferentes [Tabla 3] [Figura 2].

Código del paciente	Fenotipo	Gen	Mutación
CPE 6-1	PC \leq 50 + pancreatitis	ATM	c.146C>G (p.Ser49Cys)
57F093056001	HBOC+PC	ATM	c.8560C>T (p.Arg2854Cys)
57F093048001	PC \leq 50	ATM	c.4388T>G (p.Phe1463Cys)
57F093048002			
259725	FPC	BRCA2	c.1786G>C (p.Asp596His)
57F093010001	HBOC + PC \leq 50	BRCA2	c.8850G>T (p.Lys2950Asn)
57F093043001	HBOC+PC	CHEK2	c.409C>T (p.Arg137Ter)
57F093033001	FPC \geq 3PC	MLH1	c.1852A>G (p.Lys520Glu)
57F093044001	HBOC+PC		
57F093018001	FPC	MSH2	c.1021C>G (p.Leu341Val)
CPE 19-1	HBOC+PC	MSH2	c.382C>G (p.Leu128Val)
		FANCC	c.584A>T (p.Asp195Gly)
57F093073001	FPC \geq 3PC	MSH6	c.1857A>C (p.Glu317Asp)
57F093073002			
57F093073003			
57F0930047001	FAMMM-PC	PMS2	c.2186_2187delTC (p.Leu729Gln)
57F093059001	LYNCH	CFTR	c.1682C>A (p.Ala561Glu)

Tabla 3. Conjunto de mutaciones validadas por secuenciación Sanger en 16 pacientes. Se señala no sólo la mutación y el gen afectado sino también el fenotipo familiar o del paciente. El paciente con código CPE6-1 es un caso de cáncer de páncreas esporádico precoz, mientras que los demás son casos FPC y HRI. El paciente CPE19-1 fue registrado inicialmente como caso esporádico, sin embargo se hallaron datos en su historia clínica que hacen que sea considerado como un caso FPC.

Los genes afectados por las mutaciones son supresores de tumor (*ATM*, *BRCA2*, *CHEK2*, *FANCC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) y *CFTR*. En la Figura 2 se muestran los electroferogramas obtenidos de algunos de los casos validados que aparecen en la Tabla 3. CPE 6-1 es un paciente con PDAC diagnosticado a los 49 años en un estadio localmente avanzado en la cabeza pancreática, sin hábitos tóxicos ni pancreatitis. La aparición de un adenocarcinoma en una edad tan temprana puede explicarse debido a la mutación en línea

RESULTADOS

germinal de *ATM* que origina un cambio de sentido. En el electroferograma se observa la transversión c.146C>G en estado heterocigótico.

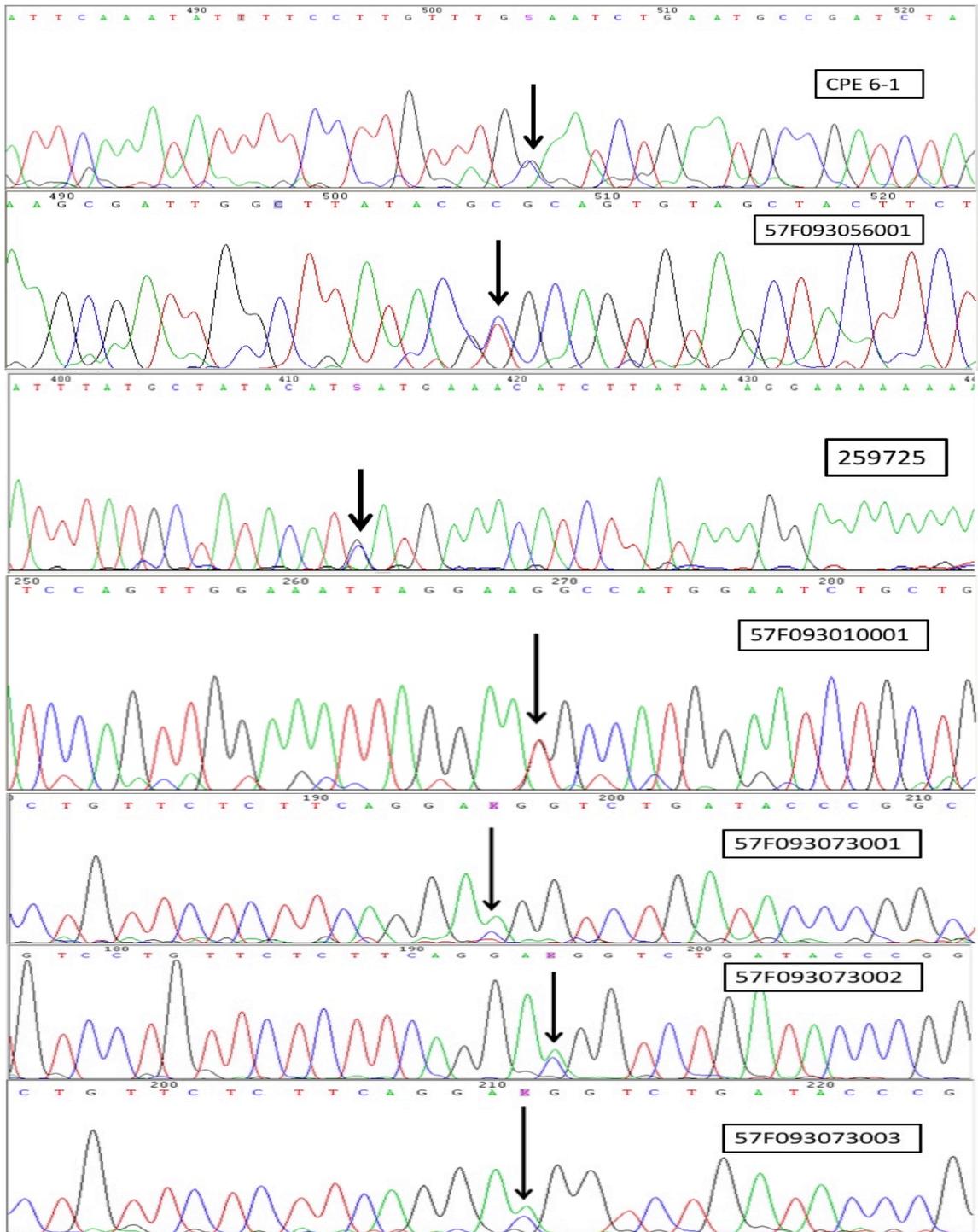


Figura 2. Electroferogramas resultado de la secuenciación Sanger de los productos de PCR. Se señala con una flecha negra el locus de la mutación validada en la secuencia (ver Tabla 3). Aparecen los resultados de CPE6-1, 57F093056001, 259725, 57F093010001, 57F093073001, 57F093073002 y 57F093073003 (por orden de arriba a abajo).

El paciente 57F093056001 es un HRI, con mutación validada para *ATM* que presenta en su pedigrí 2 casos de PDAC, y otros casos de cáncer de mama, endometrio, esófago, mieloma y pólipos en el colon. En el electroferograma de la Figura 2 aparece reflejada la

RESULTADOS

transición c.8560C>T en estado heterocigótico. El caso 259725 posee una transversión c.1786G>C en *BRCA2* [Figura 2] y su familia sigue un patrón de FPC.

El paciente 57F093010001 pertenece a una familia con fenotipo de HBOC+PC \leq 50. Se trata de un caso de PDAC diagnosticado con 47 años, en cuyo pedigrí se registran 2 casos de cáncer de mama, 1 de vejiga y otro gástrico. Para este caso ha quedado validada la transversión c.8850G>T para *BRCA2*.

Los pacientes 57F093073001, 57F093073002 y 57F093073003 pertenecen todos a la misma familia con fenotipo FPC \geq 3PC. La paciente 57F093073001 es hija de 57F093073002, y 57F093073002 y 57F093073003 son hermanas. En su pedigrí cuentan con 8 casos de PDAC, además de 2 casos de lesiones pancreáticas premalignas y otros 2 de cáncer colorrectal. En estos 3 HRI se ha validado la mutación c.1857A>C para *MSH6* [Figura 2].

cfDNA y el pronóstico de los pacientes.

Se realizó un análisis de los datos de cfDNA en plasma de los pacientes obtenidos por Maxwell RSC cfDNA Plasma Kit [Tabla 4], clasificados según el estadio de la enfermedad (Quistes (Q), Resecable (R), Localmente Avanzado (LA) y Metástasis (M)) [Figura 3]. Se incluyó la categoría de “Quistes” porque a pesar de no ser maligno, es un factor de riesgo que puede transformarse en adenocarcinoma. Se obtuvo p-valor significativo (0.0475) entre los estadios Q y M. Se agruparon Q y R en “Precoz” y LA y M en “Avanzado” (Adv) para evaluar también las diferencias entre los datos recopilados en estas categorías [Figura 4]. Se obtuvo p-valor significativo (0.01311) entre ambos conjuntos de datos.

RESULTADOS

CODIGO PACIENTE	Esporadico/FPC	EDAD DX	GRUPO	SEXO	CONC MAXWELL (ng/μL)	STATUS
FPC116	FPC	49	LA	Hombre	0.0011	ADV
FPC117	FPC	45	LA	Mujer	0.0021	ADV
FPC88	FPC	47	LA	Mujer	0.0012	ADV
FPC141	FPC	62	LA	Mujer	0.0018	ADV
CPE-1	SP	74	LA	Hombre	0.0039	ADV
CPE-2	SP	83	LA	Hombre	0.0073	ADV
CPE-6	SP	49	LA	Hombre	0.0014	ADV
CPE-11	SP	83	LA	Hombre	0.0021	ADV
CPE-14	SP	67	LA	Hombre	0.0001	ADV
CPE-15	SP	74	LA	Hombre	0.002	ADV
CPE-16	SP	90	LA	Hombre	0.008	ADV
CPE-17	SP	75	LA	Hombre	0.0013	ADV
CPE-20	SP	62	LA	Hombre	0.0023	ADV
CPE-21	SP	83	LA	Hombre	0.0005	ADV
CPE-22	SP	56	LA	Hombre	0.0057	ADV
CPE-26	SP	79	LA	Hombre	0.005	ADV
CPE-32	SP	79	LA	Hombre	0.0018	ADV
144557	SP	60	M	Mujer	0.0043	ADV
259725	SP	66	M	Hombre	0.0411	ADV
FPC100	FPC	72	M	Hombre	0.0009	ADV
FPC104	FPC	74	M	Hombre	0.0071	ADV
FPC109	FPC	68	M	Mujer	0.0009	ADV
FPC111	FPC	42	M	Hombre	0.0044	ADV
FPC25	FPC	47	M	Mujer	0.0017	ADV
FPC82	FPC	53	M	Mujer	0.0008	ADV
FPC92	FPC	73	M	Hombre	0.0016	ADV
MI-27	SP	69	M	Mujer	0.0009	ADV
mi-37	SP	66	M	Hombre	0.0047	ADV
mi-40	SP	82	M	Mujer	0.0016	ADV
FPC144	FPC	44	M	Mujer	0.0024	ADV
FPC153	FPC	49	M	Hombre	0.0015	ADV
CPE-3	SP	88	M	Hombre	0.001	ADV
CPE-5	SP	79	M	Hombre	0.0026	ADV
CPE-9	SP	79	M	Hombre	0.0088	ADV
CPE-12	SP	71	M	Hombre	0.004	ADV
CPE-13	SP	69	M	Hombre	0.006	ADV
CPE-18	SP	79	M	Hombre	0.004	ADV
CPE-19	SP	73	M	Hombre	0.0002	ADV
CPE-23	SP	65	M	Hombre	0.0102	ADV
CPE-24	SP	81	M	Hombre	0.0244	ADV
CPE-25	SP	77	M	Hombre	0.0017	ADV
CPE-28	SP	44	M	Hombre	0.0065	ADV
FPC12	QUISTE	34	Q	Mujer	0.0009	precoz
FPC22	FPC	46	Q	Mujer	0.0012	precoz
FPC157	QUISTE	38	Q	Mujer	0.0045	precoz
FPC132	QUISTE	39	Q	Mujer	0.0013	precoz
FPC44	QUISTE	50	Q	Mujer	0.0013	precoz
FPC51	QUISTE	50	Q	Mujer	0.0016	precoz
FPC89	QUISTE	45	Q	Hombre	0.0015	precoz
FPC120	QUISTE	41	Q	Mujer	0.0015	precoz
CPE-10	SP	72	Q	Hombre	0.0012	precoz
266096	SP	70	R	Hombre	0.0014	precoz
FPC118	FPC	47	R	Hombre	0.0015	precoz
FPC3	FPC	73	R	Hombre	0.0011	precoz
FPC95	FPC	67	R	Hombre	0.0008	precoz
FPC96	FPC	78	R	Mujer	0.001	precoz
MI-28	SP	63	R	Hombre	0.0003	precoz
MI-29	SP	65	R	Mujer	0.0012	precoz
FPC110	FPC	55	R	Mujer	0.0016	precoz
FPC15	FPC	73	R	Mujer	0.0015	precoz
FPC57	FPC	46	R	Hombre	0.0016	precoz
CPE-27	SP	72	R	Hombre	0.0043	precoz
CPE-33	SP	66	R	Hombre	0.0053	precoz

Tabla 4. La tabla recoge los datos de los 63 pacientes escogidos para estudiar la concentración de cfDNA en 1 ml de plasma mediante Maxwell. Todas las muestras seleccionadas fueron recogidas previamente a cualquier tratamiento antitumoral. Se indica tanto si es un caso de PDAC esporádico, FPC o si solo presenta quistes. El estadio de la enfermedad aparece en la columna "Grupo" y la columna "Status" recoge si los pacientes pertenecen a la categoría de "Precoz" o "Avanzado".

RESULTADOS

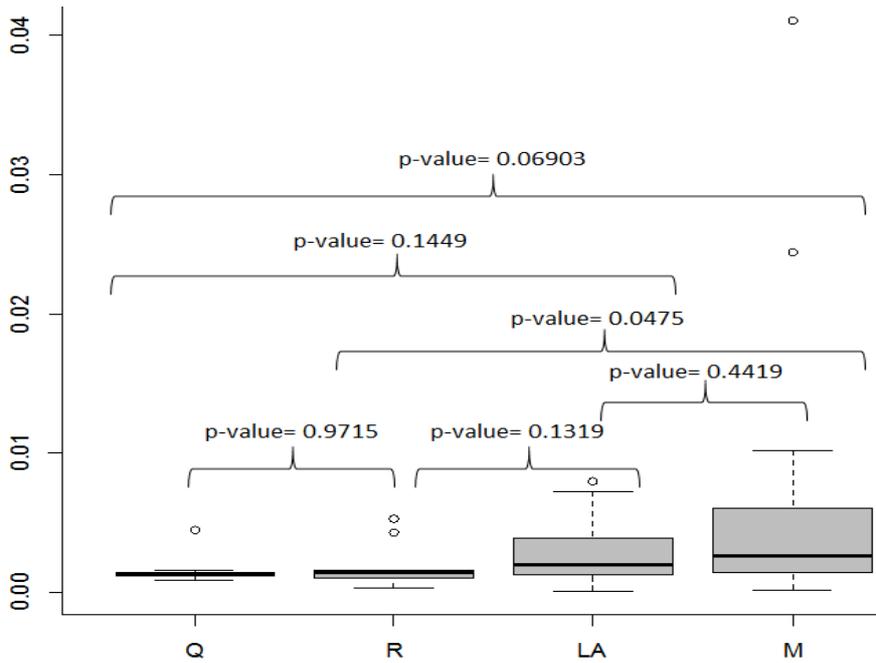


Figura 3. Boxplot de los grupos Quistes (Q, n=9), Resecable (R, n=12), Localmente avanzado (LA, n=17) y Metástasis (M, n=25) frente a la concentración de cfDNA valorada por fluorometría. Se señalan los p-valores calculados entre las diferentes categorías de pacientes.

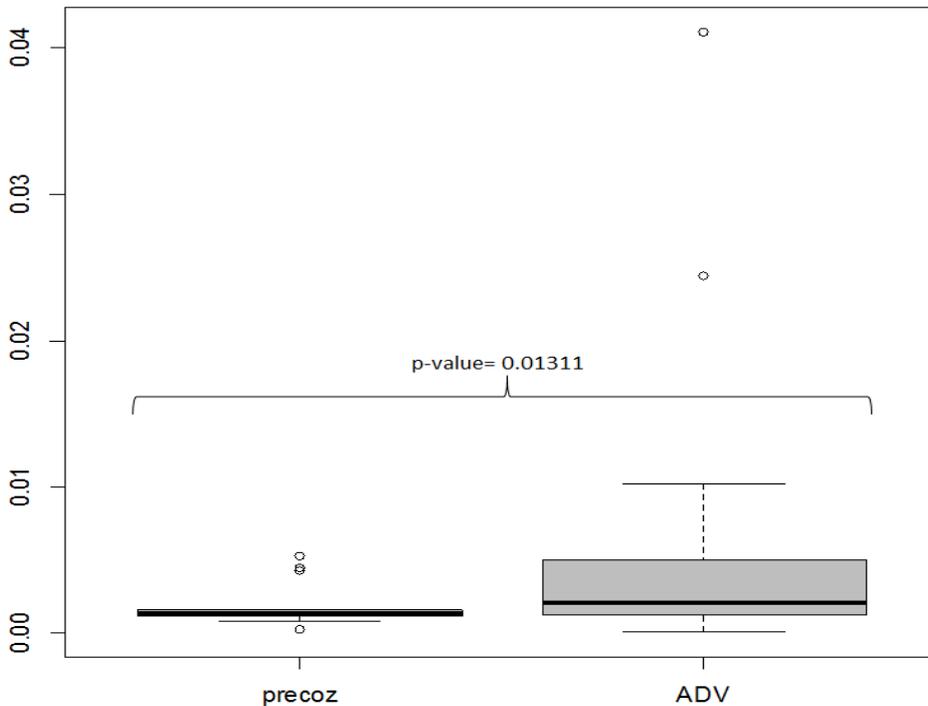


Figura 4. Boxplot de las agrupaciones de datos Precoz (Q y R, n=21), y Avanzado (LA y M, n=42) frente a la concentración de cfDNA medida por fluorometría. El valor de $p < 0.05$ indica diferencias significativas entre ambos grupos.

Se obtuvieron las curvas de supervivencia global mediante Kaplan-Meier de los pacientes según sus datos de cfDNA [Tabla 4] [Figura 5]. Se clasificó a los pacientes en 2 grupos en función de la concentración de cfDNA que presentaban en plasma: “nivel 1” para los pacientes con concentraciones inferiores a 0.0019 ng/ μ l de cfDNA (n=37) y “nivel 2” para los pacientes con una concentración de cfDNA superior a 0.0019 ng/ μ l (n=26). Se escogió este valor (0.0019 ng/ μ l) por ser la mediana de los datos de concentración de cfDNA obtenidos. Se obtuvo un p-valor significativo (0.005314) entre ambas curvas de supervivencia según niveles de cfDNA.

RESULTADOS

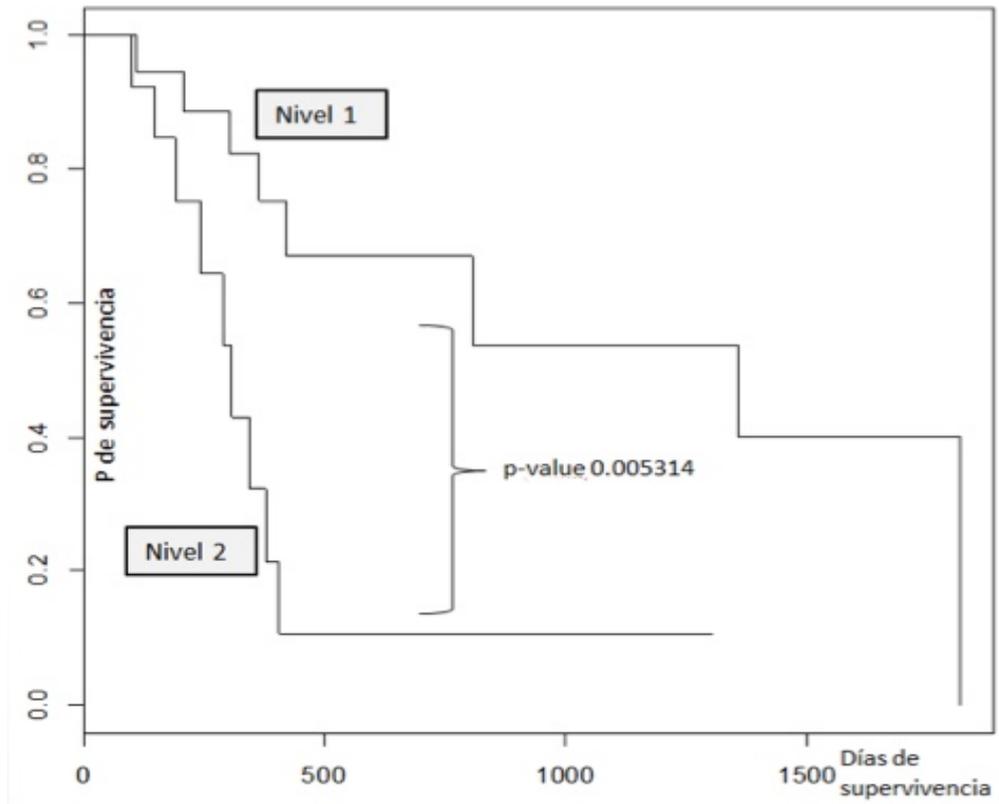


Figura 5. Curvas de supervivencia para los pacientes de nivel 1 (niveles bajos de cfDNA) y nivel 2 (niveles elevados de cfDNA). Aparecen representadas sobre el eje de abscisa los días de supervivencia del paciente y en el eje de ordenadas la probabilidad de supervivencia.

Con los datos de supervivencia global de los 53 pacientes de los que se poseía la información necesaria [Tabla 5], se estudió la función de supervivencia por Kaplan-Meier [Figura 6] teniendo en cuenta si eran casos esporádicos (n=33) o FPC (n=20). Se obtuvo un p-valor muy significativo entre ambas curvas de supervivencia (0.0002575).

RESULTADOS

CÓDIGO PACIENTE	ESPORÁDICO/FPC	EDAD DX	GRUPO	SEXO	SURVIVAL DAYS	STATUS SG
144557	SP	60	M	Mujer	1306	event
259725	SP	66	M	Hombre	26	event
266096	SP	70	R	Hombre	1358	censored
CPE-1	SP	74	LA	Hombre	94	event
CPE-11	SP	83	LA	Mujer	93	event
CPE-12	SP	71	M	Mujer	405	censored
CPE-13	SP	69	M	Hombre	172	event
CPE-14	SP	67	LA	Hombre	78	event
CPE-15	SP	74	LA	Mujer	379	censored
CPE-16	SP	90	LA	Hombre	49	event
CPE-17	FPC	75	LA	Mujer	65	event
CPE-18	SP	79	M	Hombre	344	censored
CPE-19	FPC	73	M	Mujer	231	event
CPE-2	SP	83	LA	Mujer	87	event
CPE-20	SP	62	LA	Hombre	308	censored
CPE-21	SP	83	LA	Hombre	34	censored
CPE-22	SP	56	LA	Hombre	242	censored
CPE-23	SP	65	M	Mujer	65	censored
CPE-24	SP	81	M	Hombre	36	censored
CPE-25	SP	77	M	Hombre	206	censored
CPE-26	SP	79	LA	Hombre	190	censored
CPE-28	SP	44	M	Hombre	146	censored
CPE-3	SP	88	M	Hombre	38	event
CPE-31	SP	66	R	Hombre	110	censored
CPE-32	SP	79	LA	Hombre	98	censored
CPE-33	SP	66	R	Hombre	49	censored
CPE-5	SP	79	M	Hombre	219	event
CPE-6	SP	49	LA	Hombre	385	event
CPE-9	SP	79	M	Mujer	172	event
FPC100	FPC	72	M	Hombre	487	event
FPC104	FPC	74	M	Hombre	73	event
FPC109	FPC	68	M	Mujer	659	event
FPC111	FPC	42	M	Hombre	11	event
FPC116	FPC	49	LA	Hombre	313	event
FPC117	FPC	45	LA	Mujer	289	censored
FPC118	FPC	47	R	Hombre	303	censored
FPC141	FPC	62	LA	Mujer	366	event
FPC144	FPC	44	M	Mujer	842	censored
FPC153	FPC	49	M	Hombre	648	event
FPC25	FPC	47	M	Mujer	1643	event
FPC3	FPC	73	R	Hombre	1691	event
FPC88	FPC	47	LA	Mujer	792	event
FPC95	FPC	67	R	Hombre	808	censored
FPC96	FPC	78	R	Mujer	1818	censored
mi-27	SP	69	M	Mujer	119	event
mi-28	SP	63	R	Hombre	418	censored
mi-29	SP	65	R	Mujer	365	censored
mi-33	SP	65	M	Mujer	194	censored
mi-37	SP	66	M	Hombre	63	event
mi-40	SP	82	M	Mujer	66	censored
57F093074001	FPC	56	M	Hombre	232	event
57F093075001	FPC	69	R	Mujer	990	censored
57F093072001	FPC	63	LA	Mujer	431	censored

Tabla 5. Datos de supervivencia global de los 53 pacientes seleccionados. Se recogen datos como los días de supervivencia y el tipo de dato del que se dispone respecto al fallecimiento (“event” cuando se conoce la fecha de la muerte y “censored” cuando se ha perdido el contacto o se asume el fallecimiento).

RESULTADOS

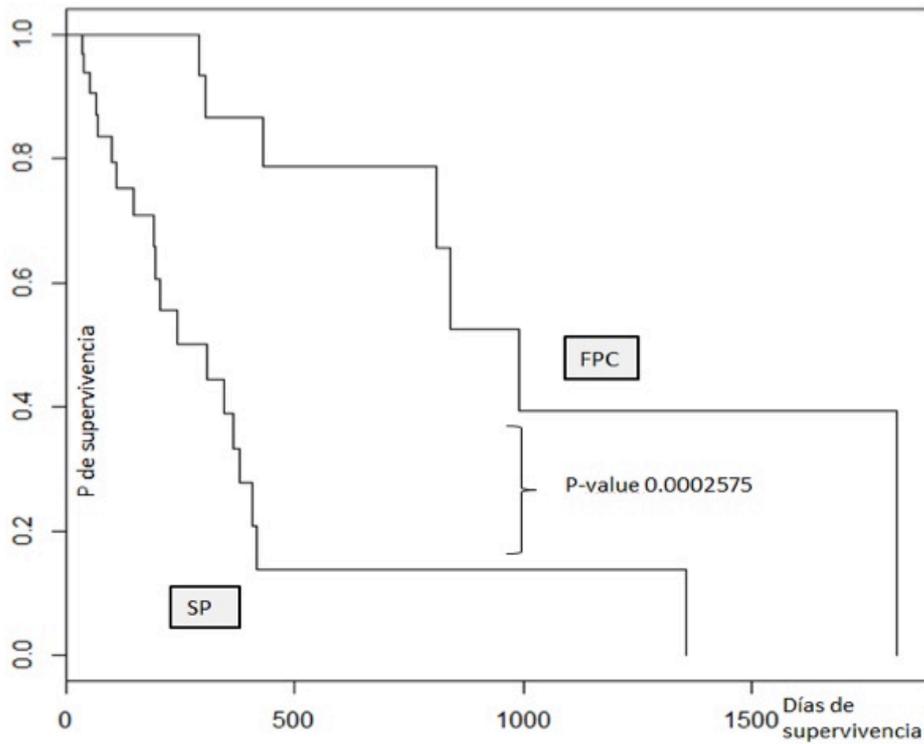


Figura 6. Curvas de supervivencia para casos de cáncer de páncreas esporádicos (SP) y familiares (FPC).

Secuenciación masiva de cfDNA.

De 38 pacientes se extrajo el cfDNA mediante QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, y los datos de secuenciación masiva se recogen en la Tabla 6.

Código paciente	Fenotipo	Genes mutados			Código paciente	Fenotipo	Genes mutados	
57F093031001	FPC	TP53			FPC7	FPC	TP53	EGFR
57F093025026	FPC	TP53			259725	FPC	KRAS	TP53
57F093052001	FPC	TP53			57F093048001	FPC	TP53	EGFR
57F093057001	FPC	TP53			57F093052001	FPC	TP53	
57F023002001	FPC	TP53			57F023003001	FPC	TP53	
57F093064001	FPC	TP53			CPE 31-1	SPC	TP53	EGFR
57F023001001	FPC	TP53			CPE 37-1	SPC	TP53	EGFR
57F083001001	FPC	TP53			CPE 38-1	SPC	EGFR	
57F023002001	FPC	TP53			CPE 30-1	SPC	TP53	EGFR
57F093081001	FPC	TP53	EGFR		259729	SPC	TP53	KRAS
57F093082001	FPC	TP53	EGFR	KRAS	CPE 6-1	SPC	TP53	EGFR
57F093082001	FPC	TP53	EGFR	KRAS	SP2	SPC	TP53	KRAS
CPE 19-1	FPC	TP53	EGFR		SP4	SPC	TP53	KRAS
FPC1	FPC	TP53	KIT	PIK3CA	SP6	SPC	TP53	
FPC2	FPC	TP53	KRAS		SP7	SPC	TP53	
FPC3	FPC	KRAS			SP8	SPC	TP53	
FPC4	FPC	TP53			SP11	SPC	TP53	KRAS
FPC5	FPC	TP53			CPE 17-1	SPC	TP53	
FPC6	FPC	TP53	KRAS	PIK3CA	SP12	SPC	TP53	KIT

Tabla 6. Se recogen los resultados de las muestras analizadas por secuenciación masiva mediante TruSight Tumor 15 para los 38 pacientes, de los cuales 24 son casos familiares y 14 son esporádicos. Aparecen citados los genes para los cuales presentan mutaciones en su cfDNA extraído a partir de 1 ml de plasma.

RESULTADOS

Se determinaron las frecuencias de mutación en los diferentes genes en los pacientes con cáncer de páncreas familiar [Figura 7] y esporádico [Figura 8].

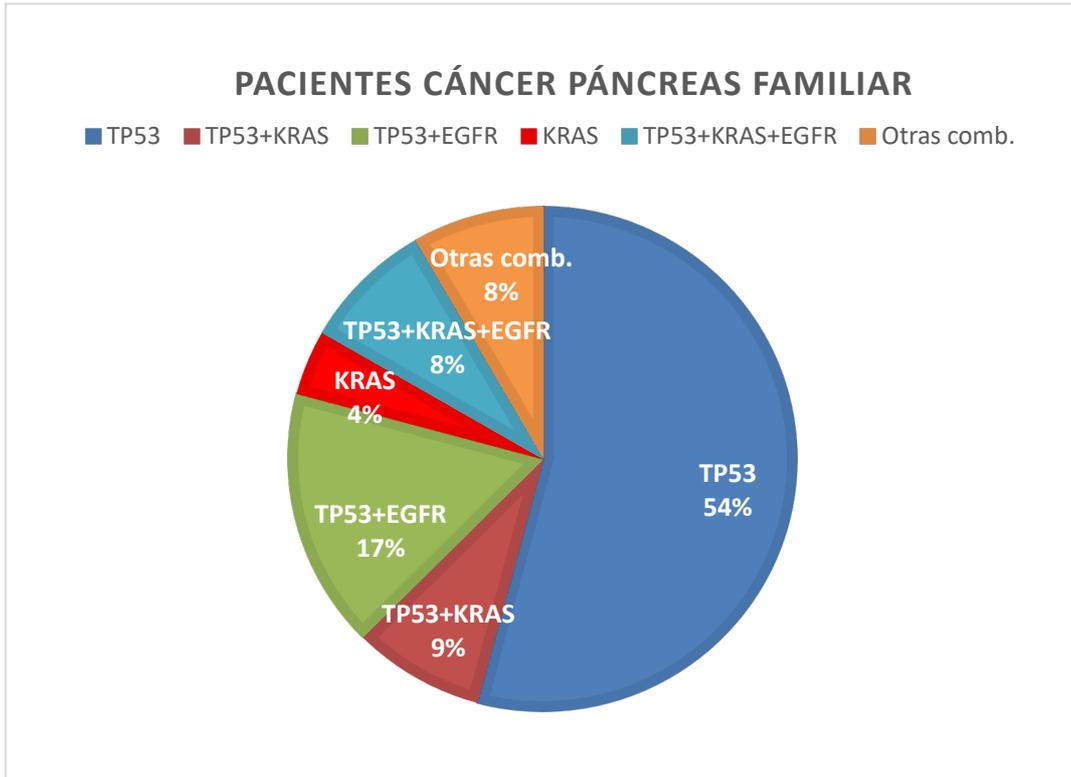


Figura 7. Gráfico de sectores de los genes portadores de mutaciones en el cfDNA de los pacientes con cáncer de páncreas familiar.

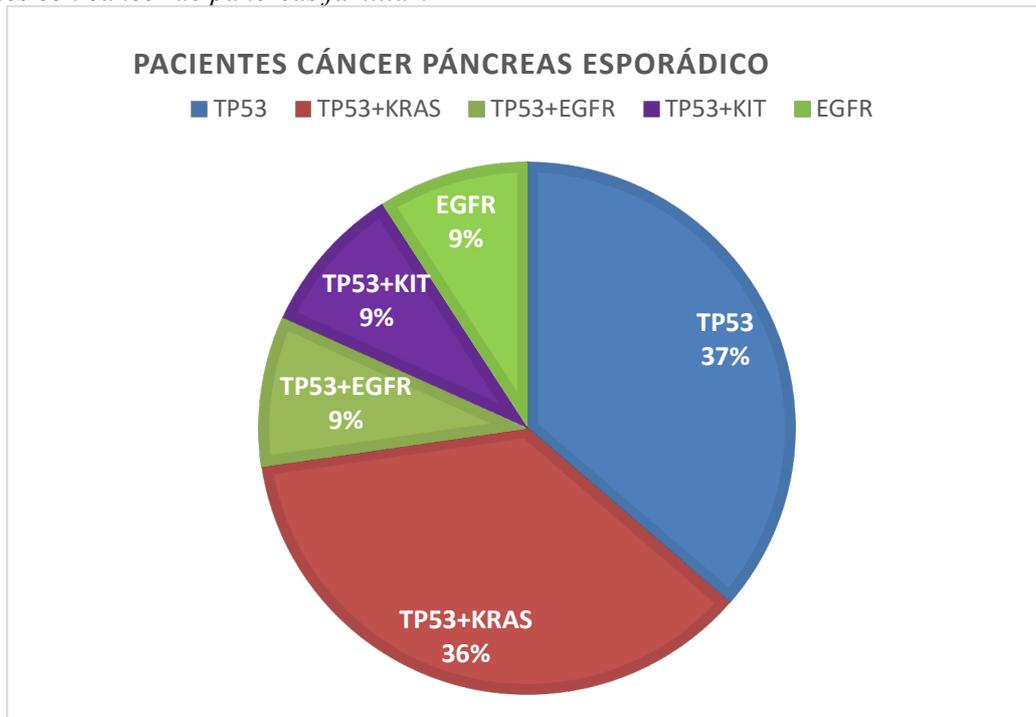


Figura 8. Gráfico de sectores de los genes portadores de mutaciones en cfDNA de pacientes con cáncer de páncreas esporádico. Destaca el aumento del porcentaje de KRAS mutado frente a Figura 7.

RESULTADOS

En estos gráficos destaca el predominio de mutaciones somáticas en *TP53*, en el 88% de los casos de cáncer de páncreas familiar y el 91% de los casos esporádicos. Mientras que en los casos familiares aparece mayoritariamente mutado exclusivamente (54%), en esporádicos aparece en combinación con otros oncogenes (45%). *KRAS* mutado aparece en mayor proporción en los casos esporádicos (36%) que en los casos familiares (21%).

Cultivos celulares primarios a partir de tejido tumoral en fresco.

A pesar de los múltiples intentos en ninguna de las ocasiones fue posible establecer un cultivo primario de células tumorales. Solo aparecieron fibroblastos que fueron desechados. Probablemente el fracaso de la técnica se deba a que el bloque de tejido era blanco, duro y necrótico, donde las células tumorales ya estén en su mayoría muertas, y solo queden fibroblastos.



Discusión

Discusión

Heterogeneidad de mutaciones en genes supresores de tumor.

En los 15 casos familiares validados se comprueba que existe un factor genético que incrementa sobre estos individuos el riesgo de desarrollo de un PDAC. De todos los genes supresores de tumores validados, la prevalencia de mutaciones en *BRCA2* en pacientes con cáncer de páncreas familiar en nuestro estudio fue de 15%, mientras que en otros estudios el porcentaje varía entre 17-19% de los pacientes, e incluso, en casos que aparentemente parecían esporádicos se demostró la existencia de mutaciones en la línea germinal para este gen (Grover & Syngal, 2010). A pesar de que en la bibliografía las mutaciones patogénicas más comunes en *BRCA2* sean 6174delT (Reznik *et al.*, 2014), 6158insT, 16-2A>G y 15-1G>A (Martinez-Useros & Garcia-Foncillas, 2016; Murphy *et al.*, 2002; Goggins *et al.*, 1996), las mutaciones encontradas en este estudio para dicho gen fueron diferentes, y por tanto contribuyen a la colección de mutaciones patogénicas relacionadas con carcinogénesis. Aunque la patogenicidad asociada a ambas mutaciones -1786G>C y 8850G>T- aparece en conflicto, se ha visto que están implicadas en cáncer de mama-ovario, HBOC y síndrome hereditario de predisposición al cáncer (ClinVar).

Del resto de mutaciones validadas, solo 2 aparecen descritas oficialmente como patogénicas (409C>T en *CHEK2* y 1682C>A en *CFTR*). Las mutaciones de *ATM* son de significado incierto o factor de riesgo, pues se relacionan con síndrome hereditario de predisposición al cáncer y cáncer de mama familiar; hecho que concuerda con los fenotipos de los pacientes o sus familias portadores. Las mutaciones de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* son todas de significado incierto, pero se relacionan con el síndrome de Lynch y síndrome hereditario de predisposición al cáncer.

Estos datos explican la alta frecuencia de casos de cáncer dentro de cada familia, y por tanto se confirma la necesidad de llevar sobre los pacientes HRI un programa de control y cribado para vigilar el desarrollo de un posible proceso tumorogénico en sus primeras etapas o detectar lesiones pancreáticas cuando aún es posible tratarlas (Grover & Syngal, 2010). En especial para las HRI 57F093073001, 57F093073002 y 57F093073003, todas portadoras de una mutación en *MSH6*, implicado en los 8 casos de PDAC (además de otros tipos de cáncer) en su familia.

Dada la gran heterogeneidad de locus que presenta el cáncer de páncreas, es necesario identificar otros genes implicados en esta patología que expliquen la alta frecuencia de agregación familiar que presenta, ya que según otros estudios esto permitiría explicar la causa molecular del 80% de los fenotipos de las familias afectadas (actualmente solo queda

DISCUSIÓN

explicado el fenotipo del 20% de las familias que llegan a la clínica), pues solo unos pocos casos son puramente FPC, y habitualmente el cáncer de páncreas aparece asociado a casos de cáncer de mama, colon y pulmón (Reznik *et al.*, 2014; Zhen *et al.*, 2015; Mocci *et al.*, 2015).

cfDNA como biomarcador no invasivo.

Se comprobó que cuanto más avanzado es el estadio del tumor mayor es la concentración de cfDNA en plasma. Se obtuvo un p-valor menor a 0,05 entre los estadios “resecable” y “metastásico”, lo que confirma que existen diferencias significativas en la concentración de cfDNA entre ambos estadios. Sin embargo, el p-valor fue ligeramente superior a 0,05 entre “quistes” y “metastásicos”, probablemente debido al bajo número de pacientes con quistes. Si se recopilase un mayor conjunto de pacientes para analizar sus niveles de cfDNA es posible que apareciesen diferencias significativas entre ambos grupos. Esta hipótesis se apoya en el p-valor menor a 0,05 obtenido de la valoración de los datos entre “precoz” y “avanzado”, que confirma que existen diferencias significativas entre los estadios más tempranos y localizados (quistes y resecable) y los más tardíos (localmente avanzado y metastásico).

En las curvas de supervivencia se demuestra mediante un p-valor menor a 0,05 que existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia de pacientes con un bajo nivel de cfDNA en plasma y en pacientes con un nivel más elevado, de tal manera que cuanto mayor es la concentración de cfDNA en plasma de un paciente menor es su esperanza de vida, pues se correlaciona con el estadio del tumor; datos que concuerdan con otros estudios realizados en adenocarcinoma de pulmón (Lee *et al.*, 2011). Además, aparece una diferencia muy significativa entre los datos de supervivencia de casos de cáncer de páncreas esporádicos y casos familiares, donde estos últimos tienen una mayor esperanza de vida respecto a los primeros. Estos datos demuestran que existe una base genética diferencial entre ambos grupos que confieren a los casos esporádicos una mayor agresividad tumoral, y a los familiares una mayor tasa de supervivencia, pero un mayor riesgo al desarrollo de otros tipos de tumores. Estos datos no se encuentran descritos en la bibliografía y por tanto son innovadores.

Los datos obtenidos por la secuenciación masiva de cfDNA revelan que las mutaciones difieren entre casos esporádicos y familiares. Mientras que en los primeros aparece *KRAS* mutado muy frecuentemente (36%, en combinación con *TP53* mutado), tal y como se describe en la bibliografía (Reznik *et al.*, 2014); los pacientes con cáncer de páncreas familiar presentan en su mayoría los genes *TP53* (54% en exclusiva y hasta el 88% en combinación con otros genes mutados), mientras que mutaciones en *KRAS* son mucho menos

DISCUSIÓN

frecuentes (21%) lo que apoya la hipótesis de la heterogeneidad genética de locus en el cáncer de páncreas que a su vez está relacionada con el pronóstico de la enfermedad.

Para validar aún más el cfDNA como un biomarcador efectivo no solo con valor pronóstico sino también diagnóstico, restaría estudiar mediante técnicas de alta sensibilidad como PCR digital en gotas (ddPCR) qué fracción del cfDNA total está mutado para una mutación muy común en *KRAS*, responsable del 90% de los PDAC, y por tanto conocer qué fracción de cftDNA existe del total de cfDNA. ddPCR es una técnica muy sensible, lo cual la hace perfecta para este ensayo pues tal y como se refleja en los datos obtenidos a partir del plasma de los pacientes, las concentraciones de cfDNA son extremadamente bajas. De hecho, en otros estudios ya ha permitido identificar la fracción de origen tumoral del cfDNA del plasma de pacientes con PDAC, incluso cuando aún están en un estadio resecable (Earl *et al.*, 2015). Otros estudios han combinado el análisis de cfDNA con los patrones de metilación tejido-específicos, pues las células ductales y acinares muestran un patrón de desmetilación total en un cluster de islas CpG en el locus del gen *CUX2*. Este patrón de desmetilación es altamente específico y analizándolo en el cfDNA permitiría conocer la fracción del mismo proveniente de la muerte de estas células exocrinas del páncreas (Lehmann-Werman *et al.*, 2016).

Por estas razones el estudio de los niveles de cfDNA por biopsia líquida y su caracterización molecular resultan una interesante fuente de conocimiento sobre el paciente y su enfermedad, que además es mínimamente invasiva.



Conclusiones

Conclusiones:

1. Nuestros datos confirman que los casos de cáncer familiar presentan mutaciones en línea germinal que suponen un mayor riesgo al desarrollo de PDAC respecto al resto de la población.
2. Hemos encontrado mutaciones en línea germinal en 12 pacientes con cáncer de páncreas familiar y 3 familiares sanos en 9 genes diferentes, confirmando la gran heterogeneidad genética de locus que presenta este cáncer.
3. Estadios precoces del cáncer se corresponden con bajos niveles de cfDNA y mayor supervivencia mientras que estadios avanzados se corresponden con niveles mayores de cfDNA y menor supervivencia. Proponemos por primera vez utilizar cfDNA como biomarcador con valor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.
4. Las diferencias genéticas encontradas en el cáncer de páncreas familiar frente al cáncer de páncreas esporádico explicaría la diferencia en la tasa de supervivencia observada en ambos grupos.
5. Mediante secuenciación masiva de cfDNA obtenido de biopsia líquida hemos detectado mutaciones somáticas en genes comúnmente alterados en cáncer de páncreas, lo que facilitaría la caracterización del tumor y en la toma de decisiones hacia una medicina más personalizada.

Conclusions:

1. Our data demonstrated that germline mutations in familial cancer patients confer them a higher risk for developing PDAC.
2. We have found germline mutations in 12 patients with familial pancreatic cancer and 3 healthy relatives in 9 different genes, which confirms the locus heterogeneity of this cancer type.
3. Early stages of pancreatic cancer correlated with low cfDNA levels and higher survival, while advanced status correlated with higher cfDNA levels and lower survival rates. We propose for the first time using cfDNA levels as a non-invasive tumor biomarker with diagnostic and prognostic value for this disease.
4. Genetic differences found in familial and sporadic pancreatic cancer might explain the significantly different overall survival rates between the two groups .
5. Massive sequencing of cfDNA obtained by liquid biopsy allowed us to detect somatic mutations in genes commonly altered in pancreatic cancer. This procedure would improve tumor characterization and it would help in decision-making and a more personalized medicine.



Bibliografia

Bibliografía

Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M., Muthuswamy, L. B., et al. 2012. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. **491**: 399–405.

Capurso, G., Signoretti, M., Valente, R., Arnelo, U., Lohr, M., et al. 2015. Methods and outcomes of screening for pancreatic adenocarcinoma in high-risk individuals. *World journal of gastrointestinal endoscopy*. **7**: 833–842.

Carrato, A., Hidalgo, M., Adeva, J., Alés, I., Álvarez, R., et al. 2017. Guía para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de páncreas. Luzán 5, Madrid.

Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J., Galbán, S., et al. 2012. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. **122**: 639–653.

Earl, J., Garcia-Nieto, S., Martinez-Avila, J. C., Montans, J., Sanjuanbenito, A., et al. 2015. Circulating tumor cells (CTC) and KRAS mutant circulating free DNA (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer*. **15**: 1-10.

Goggins, M., Schutte, M., Lu, J., Moskaluk, C. A., Weinstein, C. L., et al. 1996. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Research*. **56**: 5360–5364.

Grover, S. y Syngal, S. 2010. Hereditary pancreatic cancer. *Gastroenterology*. **139**: 1076–1080.

Heitzer, E., Ulz, P. y Geigl, J. B. 2015. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry*. **61**: 112-123.

Hidalgo, M., Álvarez, R., Gallego, J., Guillén-Ponce, C., Laquente, B., et al. 2017. Consensus guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with pancreatic cancer in Spain. *Clinical & Translational Oncology*. **19**: 667–681.

Huang, K., Mashl, R., Wu, Y., Ritter, D. I., Wang, J., et al. 2018. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell*. **173**: 355–370.

Lee, Y. J., Yoon, K., Han, J. Y., Kim, H. T., Yun, T., et al. 2011. Circulating Cell-Free DNA in Plasma of Never Smokers with Advanced Lung Adenocarcinoma Receiving Gefitinib or Standard Chemotherapy as First-Line Therapy. *Clinical Cancer Research*. **17**: 5179-5187.

Lehmann-Werman, R., Neiman, D., Zemmour, H., Moss, J., Magenheimer, J., et al. 2016. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **113**: 1826-1834.

Li, D., Xie, K., Wolff, R. y Abbruzzese, J. L. 2004. Pancreatic cancer. *The Lancet*. **363**: 1049–1057.

Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., DiMagno, E. P., Elitsur, Y., Gates-Lawrence K., et al. 1997. Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. **89**: 442–446.

Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P. y Whitcomb, D. C. 2001. Cigarette Smoking as a Risk Factor for Pancreatic Cancer in Patients With Hereditary Pancreatitis. *JAMA*. **286**: 169–170.

Martinez-Useros, J. y Garcia-Foncillas, J. 2016. The Role of BRCA2 Mutation Status as Diagnostic, Predictive, and Prognosis Biomarker for Pancreatic Cancer. *BioMed Research International*. **2016**: 1-8.

Mocci, E., Guillen-Ponce, C., Earl, J., Marquez, M., Solera, J., et al. 2015. PanGen-Fam: Spanish registry of hereditary pancreatic cancer. *European Journal of Cancer*. **51**:1911–1917.

Murphy, K. M., Brune, K. A., Griffin, C., Sollenberger, J. E., Petersen, G. M., et al. 2002. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: Deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Research*. **62**: 3789–3793.

Nishida, K., Kaneko, T., Yoneda, M., Nakagawa, S., Ishikawa, T., et al. 1999. Doubling time of serum CA 19-9 in the clinical course of patients with pancreatic cancer and its significant association with prognosis. *Journal of Surgical Oncology*. **71**: 140–146.

Reznik, R., Hendifar, A.E. y Tuli, R. 2014. Genetic determinants and potential therapeutic targets for pancreatic adenocarcinoma. *Frontiers in Physiology*. **5**: 1-15.

Rustgi, A.K. 2014. Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes & Development*. **28**: 1–7.

Sakorafas, G.H. y Tsiotos, G.G. 2001. Molecular biology of pancreatic cancer: potential clinical implications. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. **15**: 439–452.

Shindo, K., Yu, J., Suenaga, M., Fesharakizadeh, S., Cho, C., et al. 2017. Deleterious germline mutations in patients with apparently sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. **35**: 3382-3390.

Sohn, T.A. y Yeo, C.J. 2000. The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: A review. *Surgical Oncology*. **9**: 95–101.

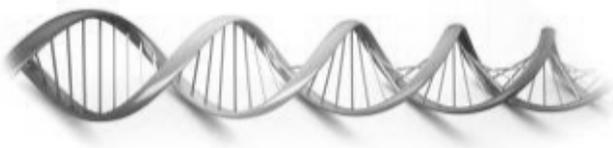
Wang, M., Abbruzzese, J. L., Friess, H., Hittelman, W. N., Evans, D. B., et al. 1998. DNA Adducts in Human Pancreatic Tissues and Their Potential Role in Carcinogenesis. *Cancer Research*. **58**: 38-41.

Witkiewicz, A. K., McMillan, E. A., Balaji, U., Baek, G. L., Lin, W. C., et al. 2015. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nature Communications*. **6**: 1-11.

Zeitouni, D., Pylayeva-Gupta, Y., Channing, J. D., y Bryant, K. L. 2016. KRAS mutant pancreatic cancer: no lone path to an effective treatment. *Cancers*. **8**: 45.

Zhen, D. B., Rabe, K. G., Gallinger, S., Syngal, S., Schwartz, A. G., et al. 2015. BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A Mutations in Familial Pancreatic Cancer (FPC): A PACGENE Study. *Genetics in Medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. **17**: 569–577.

ANEXOS



Anexos

Anexo 1. Primers empleados en validación de mutaciones germinales.

Gen	Mutación	Parejas de primers 5' → 3'
ATM	c.146C>G (p.Ser49Cys)	FWD: gctgccgtcaactagaacatga REV: ccactcctgtccagcaatcag
ATM	c.8560C>T (p.Arg2854Cys)	FWD: tcagctgccatctatgagggat REV: atcatccccctgcaactcagaa
ATM	c.4388T>G (p.Phe1463Cys)	FWD: gccatatgtgagcaagcagc REV: tgttcccaggcaagtagcg
BRCA2	c.1786G>C (p.Asp596His)	FWD: gccacgtatttctagcctacca REV: cagaggtacctgaatcagcattg
BRCA2	c.8850G>T (p.Lys2950Asn)	FWD: tggaggatcattttgccgt REV: tctttgtggcattagtagtgga
CHEK2	c.409C>T (p.Arg137Ter)	FWD: attctgattgccttcttaggct REV: accatattctgtaaggacaggacaa
MLH1	c.1852A>G (p.Lys520Glu)	FWD: cctgtgttctggaacagcct REV: gtggacaacctggaggaagg
MSH2	c.1021C>G (p.Leu341Val)	FWD: ttactaatgagcttgcca REV: gttaccacatgattatac
MSH2	c.382C>G (p.Leu128Val)	FWD: tataaaattttaaagtatgttcaag REV: agaggagattccaggcctaggaaa
FANCC	c.584A>T (p.Asp195Gly)	FWD: ggatttggcctgagcaaac REV: cgacgcaggatgacaggaaa
MSH6	c.1857A>C (p.Glu317Asp)	FWD: tcgccattgttcgagattta REV: tgatgttaccacaggtgct
PMS2	c.2186_2187delTC (p.Leu729Gln)	FWD: tctcaggaagttttgtgacact REV: acctgaagagaggaaactcaca
CFTR	c.1682C>A (p.Ala561Glu)	FWD: gtgctacttctgcaccacttttg REV: aactggttagcatgaggcg

