



Universitat de Girona

MOLÉCULAS SÉRICAS RELACIONADAS CON LA FISIOPATOLOGÍA DEL ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO COMO POSIBLES MARCADORES TUMORALES

María José FERRI IGLESIAS

Dipòsit legal: GI. 1671-2012

<http://hdl.handle.net/10803/95812>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

Tesis Doctoral

Moléculas séricas relacionadas con la fisiopatología del adenocarcinoma pancreático como posibles marcadores tumorales

María José Ferri Iglesias

2012

Programa de doctorado de “Ciències Experimentals i sostenibilitat”

Dirigida por las Dras. Rosa Peracaula Miró y Rosa Núria Aleixandre Cerarols

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universitat de Girona.



Universitat de Girona

Rosa Peracaula Mirò, profesora titular del Departamento de Biología de la Universidad de Girona y Rosa Núria Aleixandre Cerarols, Directora dels Laboratoris Clínics Girona

CERTIFICAN:

Que este trabajo, titulado “**Moléculas séricas relacionadas con la fisiopatología del adenocarcinoma pancreático como posibles marcadores tumorales**”, que presenta María José Ferri Iglesias para la obtención del título de doctora, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Firmas:

Girona, 12 de mayo 2012

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a Rosa Peracaula y a Nuria Aleixandre, por darme la oportunidad de realizar este trabajo. A Nuria por ofrecerme la posibilidad de empezar esta Tesis y confiar en mí. A Rosa por su confianza desde el primer momento y animarme en mis momentos bajos, por su amistad y enseñarme el mundo de la “recerca”.

Gracias a Rafa Llorens por dejarme pertenecer a su grupo.

También quiero destacar la importancia que ha tenido en este estudio la colaboración del Dr. Figueras y todo su equipo: Dr. Codina Barreras, Dr. López-Ben, Dra. Falgueras y Dra Albiol, por su interés desde el principio, su trabajo en la selección de pacientes y en la resolución de mis dudas clínicas, por su actitud colaboradora en todo momento. Como no a las enfermeras de quirófano 2 Montse Serra y Margarita Casadevall.

A la Dra. Ester Fort por su colaboración, por ponerme en contacto con el equipo de Cirugía hepática y por su asesoramiento clínico.

A la Doctora Miriam Sabat del Servicio de Digestivo del Hospital de Santa Caterina, que aunque se incorporó más tarde, ha tenido una colaboración muy activa en la selección de pancreatitis crónicas. También allí, Fina Vidal, desde el laboratorio ha contribuido en la recogida de estas muestras y en ser mi recordatorio en todo momento.

A Marc Sáez por su ayuda estadística, sin la cual no podría haber realizado este estudio.

Ha tenido mucha importancia en este trabajo mucha gente del laboratorio del Hospital U. Dr. Josep Trueta de Girona: las técnicas que me han ayudado en la recogida de muestras: Imma, Ariadna, Ingrid, Encarna y Mariona H, Teresa, Araceli Mis residentes Miriam, Isabel, Anna y Ester. Thanks a lot Isabel and Anna for the corrections.

También he encontrado colaboración cuando la he necesitado, por parte de todos los compañeros a los que se lo he pedido: Lola, José Manuel, Manel, Marisa, Charo, Joana, Pili...

Las enfermeras del laboratorio me han ayudado a realizar este trabajo, inicialmente Carmen Arnau y posteriormente Marina Batlle, Roser Callís, Neus Pelaez, Marisa. También Silvia Caselmeiro y Gemma Simón.

Al personal de Banco de Sangre por su colaboración. Dr. Profitós y todo el personal médico y de enfermería del CTBS.

Al resto de personas del grupo de bioquímica de la facultad también quiero agradecerles su colaboración ya que la he tenido siempre que se la he pedido, especialmente a Dolors (“Apalins”) por recogerme y enviarme las PCR y por su simpatía. También Marta por su ayuda en la PCR y en los cálculos.

Un recuerdo para el Dr. Piujula por el N.E.T. que finalmente he superado.

A mis amigos por entender mis agobios.

A mi familia, a mis hermanos por los buenos momentos de relax cuando necesitaba desconectar y por estar siempre ahí. A mis sobrinos especialmente a mi “favorito” David por su ayuda técnica. A M^a Asunción por la corrección ortográfica.

A mi madre, sin la que todo esto no habría sido posible, por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme en todo momento en mis decisiones.

A todos los que han colaborado de alguna manera y no he recordado citar en estas palabras de agradecimiento, GRACIAS.

ABREVIATURAS

A1G	alfa 1 glicoproteína ácida	Glc	glucosa
Asn	Asparagina	GlcNAc	N-acetilglucosamina
Bmi	Gen perteneciente a la familia Policom (PcG)	GPS	Glasgow Prognostic Score
CA 19.9	antígeno carbohidrato 19.9	hnRNP	ribonucleoproteína nuclear heterogénea
cDNA	DNA complementario	hTERT	telomerasa humana de transcripción inversa
CEA	antígeno carcinoembrionario	IdA	ácido Idurónico
Ct	threshol cycle (ciclo umbral)	IGFBP	proteína transportadora de IGFs
DEPC	dietilpirocarbonato	IGF	factor de crecimiento tipo insulina
DM	Diabetes mellitus	IL-1	Interleucina 1
DTT	ditiotreitól	IL-6	interleucina 6
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético	Kb	kilobases
EGF	factor de crecimiento epidérmico	Le ^a	antígeno Lewis a
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico	Le ^b	antígeno Lewis b
FGFs	factores de crecimiento de fibroblastos	Le ^x	antígeno Lewis x
Fuc	fucosa	Man	manosa
Gal	galactosa	MGPs	partículas de sílice magnéticas
GalNAc	N-acetilgalactosamina	miRNA	micro RNAs
GH	hormona de crecimiento	MIC1	citocina 1 inhibidora de macrófagos
GlcA	Ácido glucurónico	MMP	metaloproteasas de matriz

mRNA	RNA mensajero	VPN	valor predictivo negativo
NeuAc	ácido acetilneuramínico	VPP	valor predictivo positivo
NF-κB	factor nuclear κB	Xyl	xilosa
ONEOS	otras neoplasias gastrointestinales		
PanIN	neoplasia pancreática intraepitelial		
PC	pancreatitis crónica		
PCR	reacción en cadena de la polimerasa		
PDAC	adenocarcinoma pancreático		
qRT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa		
RNA	ácido ribonucleico		
RNAsas	ribonucleasas		
ROS	especies de oxígeno reactivas		
rpm	revoluciones por minuto		
Ser	serina		
sLe ^a	antígeno sialil Lewis a		
sLe ^x	antígeno sialil Lewis x		
SMP	partículas magnéticas cubiertas de estreptavidina		
TCH	tomografía computadorizada helicoidal		
TGFβ	factor de crecimiento transformador β		
Thr	treonina		
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa		
TNM	tumor-Nódulos-Metástasis		
US	ultrasonografía abdominal		

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS	3
ÍNDICE.....	7
RESUMEN	11
RESUM	1
SUMMARY	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. PÁNCREAS.....	1
1.1 PATOLOGÍA INFLAMATORIA DEL PÁNCREAS	2
1.2 INFLAMACIÓN Y DESARROLLO DE CANCER.....	5
2. CÁNCER.....	8
2.1 INCIDENCIA DEL CÁNCER	11
2.2 MARCADORES TUMORALES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER	13
2.3 BIOMARCADORES.....	17
3. CÁNCER DE PÁNCREAS: ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS	18
3.1 EPIDEMIOLOGÍA	18
3.2 ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO EN LA REGIÓN SANITARIA DE GIRONA.....	20
3.3 FACTORES DE RIESGO	21
3.4 DIABETES Y CÁNCER DE PÁNCREAS.....	23
3.5 MARCADORES MOLECULARES.....	24
3.6 FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF) Y NEOPLASIA.....	30
3.7 IGF-I Y ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO.....	33
3.8 CLÍNICA DEL ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS	34

3.9	DIAGNÓSTICO	35
3.10	TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA	39
4.	NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS	40
4.1	DNA PLASMÁTICO COMO MARCADOR TUMORAL	40
4.2	RNA PLASMÁTICO COMO MARCADOR TUMORAL.....	44
5.	GLICOCONJUGADOS	47
5.1	MONOSACÁRIDOS	47
5.2	GLICOSILACIÓN	48
5.3	CLASIFICACIÓN DE GLICOCONJUGADOS.....	49
5.4	FUNCIONES DE LOS GLICOCONJUGADOS	51
5.5	SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS	52
6.	GLICOSILACIÓN Y CÁNCER.....	53
6.1	ANTÍGENOS SIALILADOS EN CÁNCER	56
6.2	SIALILTRANSFERASAS Y CÁNCER.....	58
6.3	ANTÍGENOS SIALILADOS Y SIALILTRANSFERASAS EN CÁNCER DE PÁNCREAS.....	59
II.	OBJETIVOS	63
	OBJETIVO GENERAL	65
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1.	MATERIAL BÁSICO	69
2.	SELECCIÓN DE PACIENTES	70
2.1	GRUPOS DE ESTUDIO.....	70
3.	OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA MUESTRA	73
4.	EXTRACCION DE mRNA.....	74

4.1 PRIMER ENSAYO EVALUADO.....	74
4.2 SEGUNDO ENSAYO: DYNABEADS®.....	75
5. RETROTRANSCRIPCIÓN A cDNA.....	77
5.1. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	78
6. PCR A TIEMPO REAL (REAL TIME PCR): EXPRESIÓN DE SIALILTRANSFERASAS	78
6.1 CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL.....	82
6.2 CEBADORES UTILIZADOS EN LA PCR A TIEMPO REAL.....	84
7. DETECCIÓN DE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS.....	85
7.1. ANTÍGENO CARBOHIDRATO 19.9 (CA 19.9).....	85
7.2 ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA).....	86
7.3 ALBÚMINA.....	86
7.4 PROTEÍNA C REACTIVA.....	86
7.5 ALFA 1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (A1G).....	87
7.6 FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA 1 (IGF-I).....	87
7.7 PROTEÍNA TRANSPORTADORA 3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGFBP-3).....	89
7.8 HORMONA DE CRECIMIENTO (GH).....	89
7.9 PÉPTIDO C.....	90
7.10 GLASGOW PROGNOSTIC SCORE.....	91
8. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	91
8.1. ESTADÍSTICA ANALÍTICA.....	91
8.2. PROCESOS DE DATOS.....	91
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
CAPÍTULO I: EXTRACCIÓN DE MRNA LIBRE EN PLASMA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SIALILTRANSFERASAS	95
I.1 EXTRACCIÓN DE MRNA.....	95

I.2 REPRODUCIBILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA EN PLASMA	96
I.3 CURVAS DE CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE ST3GAL III, ST3GAL IV Y β -ACTINA	97
I.4 DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN DE ST3GAL III Y ST3GAL IV EN PLASMA	99
I.5 NIVELES DE SIALILTRANSFERASAS EN LOS DISTINTOS GRUPOS	104
I.6. COMPARACIÓN DE NIVELES DE CA 19.9 EN LOS DIFERENTES GRUPOS.....	108
CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE MARCADORES DE FASE AGUDA.....	111
II.1 NIVELES SÉRICOS DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN.....	111
CAPÍTULO III: NIVELES DE IGF-I, IGFBP3, RATIO MOLAR IGF-I/IGFBP3, HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) Y PÉPTIDO C.....	115
III. 1 ANÁLISIS DE LOS VALORES DE IGF-1, IGFBP3, GH Y RATIO MOLAR IGF-1/IGFBP3:.....	116
III. 2 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PÉPTIDO C.....	125
CAPÍTULO IV: COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS PARÁMETROS EVALUADOS Y COMBINACIÓN DE LOS MISMOS PARA MEJORAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DEL ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO.....	126
IV.1 UTILIDAD DE LOS NIVELES DE ST3GAL III Y ST3GAL IV COMO MARCADORES TUMORALES	126
IV.2 COMBINACIÓN CON SIALILTRANSFERASAS.....	127
IV.3 COMBINACIÓN CON IGF-I E IGFBP3.....	130
V. DISCUSIÓN FINAL.....	133
VI. CONCLUSIONES	141
VII. ANEXO	145
ANEXO 1	147
VIII. BIBLIOGRAFÍA	151

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública global; en España es la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardiovasculares. En los países desarrollados, la incidencia de enfermedades tumorales aumenta progresivamente por el envejecimiento de la población y por el estilo de vida asociado al cáncer que incluye hábito tabáquico, alimentación y vida sedentaria.

El adenocarcinoma pancreático (PDAC) es uno de los tumores sólidos más letales con índices de supervivencia a los 5 años inferiores al 5%. Es un tumor de rápido crecimiento y con elevada tendencia a invadir órganos adyacentes y metastatizar, es extremadamente difícil de diagnosticar en fases precoces. El diagnóstico se produce de manera tardía por no existir método diagnóstico adecuado. El único marcador tumoral disponible en la práctica clínica es el CA19.9 que carece de la sensibilidad y la especificidad deseables para el diagnóstico temprano, ya que también aumenta en patologías inflamatorias del tracto gastrointestinal como es la pancreatitis crónica (PC).

Es por ello que en este trabajo se evaluarán los niveles séricos de diversas moléculas que pueden estar asociadas a la fisiopatología del PDAC, con el objetivo de determinar su valor diagnóstico, ya sea como marcadores independientes o en combinación, y compararlo con el del CA19.9.

Una de las características de las células neoplásicas es la glicosilación alterada de los glicoconjugados de superficie celular y secretados; esto conlleva a una sobreexpresión de antígenos sialilados como por ejemplo el sialil-Lewis^x (sLe^x) y sus derivados. Las enzimas implicadas en las últimas etapas de la biosíntesis de estas moléculas son las sialiltransferasas y las fucosiltransferasas, que compiten por transferir ácido siálico o fucosa a los precursores de sLe^x y sus derivados.

En trabajos previos de nuestro grupo se ha descrito la sobreexpresión de antígenos Lewis sialilados, sialil-Lewis^x y/o sialil-Lewis^a, en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, en cuya síntesis están implicadas sialiltransferasas como la ST3Gal III y ST3Gal IV. La sobreexpresión de ST3Gal III y ST3Gal IV correlaciona con un aumento de la expresión de sLe^x en la superficie de células tumorales de adenocarcinoma pancreático, facilitando la adhesión celular, migración y metástasis.

En 1994 fue reconocida la importancia de los ácidos nucleicos circulantes en procesos neoplásicos. A partir de este momento se valoró la potencialidad de los ácidos nucleicos circulantes como marcadores tumorales. Se han estudiado varios tipos de mRNA, de genes asociado a tumores, y parece que la presencia de este mRNA en suero, es un reflejo de lo que ocurre en las células cancerosas. También se ha encontrado asociación entre mRNA plasmático y diversas variables clinicopatológicas.

Dado que el suero es uno de los fluidos más fáciles de obtener de forma no invasiva en la práctica clínica y que recientemente se ha descrito la presencia de mRNA libre en plasma proveniente del tumor, la determinación del mRNA de ST3Gal III y Gal IV en plasma podría ser un método que permitiese determinar cambios en la expresión de estas enzimas en pacientes con adenocarcinoma pancreático. Es por ello que en este trabajo se han determinado los niveles de ST3Gal III y ST3Gal IV. Los primeros permiten diferenciar el grupo de pacientes con pancreatitis crónica del grupo de pacientes con PDAC. También se han obtenido niveles inferiores de ST3Gal III en estadios iniciales de PDAC comparados con estadios avanzados ($p=0.032$).

Desde el siglo XIX es conocida la asociación entre cáncer e inflamación. En el adenocarcinoma pancreático es aceptado que la inflamación, mediante la liberación de moléculas proinflamatorias, produce daño en el DNA y por el acúmulo de mutaciones se llega a desarrollar el cáncer. Se ha descrito que la presencia y magnitud de la respuesta inflamatoria sistémica es un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer avanzado. Para poder cuantificar esta respuesta inflamatoria en este trabajo se ha utilizado la escala del Glasgow Prognostic Score que combina dos marcadores de inflamación aguda: la proteína C reactiva y la albúmina. Estos marcadores se han cuantificado en los grupos de estudio: 21 pacientes PDAC, 15 pacientes con diferentes tumores del tracto gastrointestinal (ONEOS), 15 PC y 9 controles sanos (C). Se han obtenido diferencias estadísticamente significativas entre controles *versus* PDAC ($p=0.012$) y entre controles *versus* ONEOS ($p=0.002$). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre PC *versus* PDAC ($p=0.046$) y también PC y ONEOS ($p=0.000$).

Los factores de crecimiento insulinoide (IGFs), son mediadores endocrinos de la hormona del crecimiento en diversos tejidos tanto normales como neoplásicos. El IGF-I tiene características de hormona circulante y de factor de crecimiento tisular. La mayor parte del IGF-I de la circulación sanguínea es sintetizado en el hígado y está regulada por la hormona del crecimiento (GH) y por señales relacionadas con el estado nutricional. El crecimiento de los tumores es probable que inicialmente dependa de los IGFs sintetizados en el hígado, pero en fases más avanzadas adquieran la capacidad de producirlos ellos mismos de manera autocrina.

El eje IGF se ha relacionado con mayor riesgo de desarrollar distintas enfermedades neoplásicas. Dada la relevancia del IGF-I y de la insulina como factores favorables para el desarrollo del adenocarcinoma pancreático, sería interesante poder evaluar en una misma cohorte de pacientes si sus niveles séricos pueden tener valor diagnóstico o pronóstico.

Es por ello, que se ha determinado la concentración de IGF-I en los grupos de pacientes PDAC, PC, ONEOS y C. Encontramos valores disminuidos significativamente en PDAC respecto a PC ($p=0.001$) y controles ($p=0.002$). También se encontraron valores significativamente inferiores en ONEOS comparado con PC ($p=0.005$) y C ($p=0.029$). Para poder explicar los niveles inferiores en pacientes con cáncer se han evaluado los niveles de la prealbúmina ya que el estado nutricional influye directamente en la secreción de IGF-I. La prealbúmina fue estadísticamente inferior en los procesos neoplásicos [PDAC ($p=0.000$); ONEOS ($p=0.000$)], y en este sentido el mal estado nutricional de los pacientes con cáncer podría explicar los bajos niveles de IGF-I. Sin embargo en los pacientes con PC se observan valores significativamente inferiores de prealbúmina ($p=0.002$) que en este caso no afecta a los niveles de IGF-I, por tanto, las diferencias en los niveles de IGF-I que se describen en PDAC no son debidas únicamente al estado nutricional también influyen otros factores.

Por los resultados previos se planteó la determinación de hormona de crecimiento (GH) ya que en distintos tipos de cáncer se ha descrito resistencia a GH. En los pacientes del estudio, se observó resistencia en un 13% de los pacientes con PDAC y en el 7.7% de pacientes con ONEOS, mientras que en controles y pancreatitis crónica no

se encontró resistencia a GH en ningún paciente. Estos resultados pueden ayudar a explicar parcialmente los bajos niveles de IGF-I en PDAC.

Debido a que ninguno de los marcadores evaluados presentó valores mínimos como marcador diagnóstico independiente, se planteó la combinación de las sialiltransferasas con el CA19.9 y otros marcadores que se utilizan de manera rutinaria en clínica, y se obtuvieron buenos resultados cuando se combinó CA 19.9, CEA, ST3Gal IV, Glasgow Prognostic score con valores de sensibilidad de 90%, especificidad 86.4% y AUC 0.963 cuando se evaluó PDAC frente al grupo formado por controles, PC y ONEOS. La asociación de estos cuatro parámetros proporciona una mejor herramienta diagnóstica que cuando se utiliza CA19.9 o la combinación CA19.9+CEA. El único inconveniente es que la metodología utilizada para la determinación de niveles de expresión de sialiltransferasas es muy laboriosa.

Por esta razón se realizó una combinación alternativa de parámetros que incluyó IGF-I, IGFBP3, CA 19.9 y CEA para mejorar su precisión diagnóstica en la diferenciación de PC y PDAC. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación CA 19.9, CEA, IGF-I con AUC de 0.959, sensibilidad de 87.8%, especificidad del 100%, cuando se comparan PDAC y PC. La combinación de estos tres marcadores parecen ser mejores predictores que el CA19.9 en solitario o combinado con CEA.

En el grupo de pacientes del estudio cuando se utilizó un cut-off de CA 19.9 de 36.3 U/ml se clasificaron de manera correcta 36/41 (87.8%) de los PDAC, 11/12 (91.65%) PC, pero si además se incluyen los niveles de IGF-I y CEA en un modelo probabilístico se clasificaron correctamente el 87.8% del los PDAC, y el 100% de las PC, con una especificidad del 100% mejorando así el diagnóstico diferencial entre los pacientes de PDAC y PC. Esta combinatoria de marcadores aplicada a siete nuevos pacientes también supuso una clasificación correcta de los mismos.

La combinación de los niveles séricos de CA 19.9, CEA y IGF-I podría ser utilizada en un futuro como marcador para el diagnóstico diferencial entre PDAC y PC aunque son necesarios estudios con una mayor cohorte de pacientes.

RESUM

El càncer és un problema de salut pública global; en Espanya és la segona causa de mort després de les malalties cardiovasculars. En els països desenvolupats la incidència de malalties tumorals augmenta progressivament per l'envelliment de la població i per l'estil de vida associat al càncer com hàbit tabàquic, alimentació i vida sedentària.

L'adenocarcinoma pancreàtic (PDAC) és un dels tumors sòlids més letals amb índex de supervivència als 5 anys inferiors al 5%. És un tumor de ràpid creixement i amb elevada tendència a envair òrgans adjacents i metastatitzar, és extremadament difícil de diagnosticar en fases precoces. El diagnòstic es produeix de manera tardana per no existir mètode diagnòstic adient. L'únic marcador tumoral disponible en la pràctica clínica és el CA19.9 que no presenta la sensibilitat i la especificitat desitjables pel diagnòstic precoç, ja que també augmenta en patologies inflamatòries del tracte gastrointestinal com és la pancreatitis crònica (PC).

Es per això que en aquest treball s'avaluaran els nivells sèrics de diverses molècules que puguin estar relacionades amb la fisiopatologia del PDAC, amb l'objectiu de determinar el seu valor diagnòstic, sigui com a marcadors independents o en combinació, i comparar-lo amb el del CA19.9.

Una de les característiques de les cèl·lules neoplàsiques és la glicosilació alterada dels glicoconjugats de superfície cel·lular i secretats; això porta a terme una sobreexpressió de antígens sialilats como per exemple el sialil-Lewis^x (sLe^x) i els seus derivats. Els enzims implicats en les últimes etapes de la biosíntesis de aquestes molècules són les sialiltransferases i les fucosiltransferases, que competeixen per transferir àcid siàlic o fucosa als precursors de sLe^x i els seus derivats.

En treballs previs del nostre grup s'ha descrit la sobreexpressió d'antígens Lewis sialilats, sialil-Lewis^x i/o sialil-Lewis^a, en línees cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic, en la seva síntesis estan implicats sialiltransferases com la ST3Gal III i ST3Gal IV. L'expressió de ST3Gal III i ST3Gal IV correlacionen amb un augment de l'expressió de sLe^x en la superfície de cèl·lules tumorals d'adenocarcinoma pancreàtic, facilitant l'adhesió cel·lular i migració i per tant la formació de metàstasis.

A partir d'aquest moment es va valorar la potencialitat dels àcids nucleics circulants com marcadors tumorals. S'han estudiat diversos tipus de mRNA, de gens associats a

tumors, i pareix que la presència d'aquest mRNA en sèrum, es un reflex del que es produeix en les cèl·lules canceroses. També s'ha trobat associació entre mRNA plasmàtic i diverses variables clinicopatològiques.

Donat que el sèrum és un dels fluids més fàcils d'obtenir de forma no invasiva en la pràctica clínica assistencial i que recentment s'ha descrit la presència de mRNA lliure en plasma procedent del tumor, la determinació del mRNA de ST3Gal III i Gal IV en plasma podria ser una tècnica que permetés determinar possibles canvis en la expressió d'aquests enzims en pacients amb adenocarcinoma pancreàtic. Per aquest motiu en aquest treball s'han determinat els nivells de ST3Gal III i ST3Gal IV. Els primers permetrien diferenciar el grup de pacients amb pancreatitis crònica del grup de pacients PDAC. També s'han descrit menors nivells de ST3Gal III en estadis inicials de PDAC comparats amb estats avançats.

Des de el segle XIX és coneguda l'associació entre càncer e inflamació. En adenocarcinoma pancreàtic és acceptat que la inflamació, mitjançant l'alliberació de molècules proinflamatories, produeix dany en el DNA i per l'acúmulo de mutacions s'hi arriba a desenvolupar el càncer. S'ha descrit que la presència i magnitud de la resposta inflamatòria sistèmica es un factor pronòstic independent en pacients amb càncer avançat. Per poder quantificar aquesta resposta inflamatòria en aquest treball s'ha utilitzat l'escala Glasgow Prognostic Score que combina dos marcadors de inflamació aguda: la proteïna C reactiva i l'albumina. Aquests marcadors s'han quantificat en els grups d'estudi: 21 pacients PDAC, 15 pacients amb diferents tumors del tracte gastrointestinal (ONEOS), 15 PC i 9 controls sans (C). S'han obtingut diferències estadísticament significatives entre controls *versus* PDAC ($p=0.012$) i entre controls *versus* ONEOS ($p=0.002$). També s'han trobat diferències estadísticament significatives entre PC *versus* PDAC ($p=0.046$) i també PC i ONEOS ($p=0.000$).

Els factors de creixement insulinoide (IGFs), són mediadors endocrins de l'hormona del creixement en diversos teixits tant normals com neoplàsics. L'IGF-I té característiques d'hormona circulant i de factor de creixement tissular, la seva síntesis es realitza fonamentalment en el fetge i està regulada per l'hormona del creixement (GH) i per senyals relacionades amb l'estat nutricional. És probable que el creixement dels

tumors durant la seva evolució, i en les primers fases depengui dels IGF sintetitzats en el fetge, però en fases més avançades adquireixen la capacitat de produir-los ells mateixos de manera autocrina. L'eix IGF s'ha relacionat amb major risc de desenvolupar diferents malalties neoplàsiques. Donada la rellevància de l'IGF-I i de la insulina com factors favorables per el desenvolupament de l'adenocarcinoma pancreàtic, seria interessant poder avaluar en una mateixa cohort de pacients si els seus nivells sèrics poden tenir valor diagnòstic o pronòstic.

Es per això, que s'ha determinat la concentració d'IGF-I en els diferents grups de pacients PDAC, PC, ONEOS i C, s'observen valors disminuïts significativament en PDAC respecte a PC ($p=0.001$) i controls ($p=0.002$). També es van observar valors significativament inferiors en ONEOS comparat amb PC ($p=0.005$) i C ($p=0.029$).

La prealbúmina va ser estadísticament inferior en los processos neoplàsics Per poder explicar aquestos valors baixos s'ha avaluat els nivells de la prealbúmina ja que l'estat nutricional influeix en la secreció d'IGF-I. La prealbúmina va ser més baixa en processos neoplàsics, i en aquest sentit el mal estat nutricional dels pacients amb càncer podria explicar els nivells baixos d'IGF-I. La prealbúmina va se estadísticament inferior en els processos neoplàsics [PDAC ($p=0.000$); ONEOS ($p=0.000$)], i en aquests sentit el mal estat nutricional dels pacients amb càncer podria explicar els baixos nivells d'IGF-I. En els pacients amb PC s'observen valors significativament inferiors ($p=0.002$) de prealbúmina que en aquest cas no afecta als nivells d'IGF-I, per tant, les diferències en els nivells d'IGF-I obtinguts en PDAC no son a causa únicament pel estat nutricional també influeixen d'altres factors.

Per aquesta causa es va plantejar la determinació d'hormona de creixement (GH) ja que en diferents tipus de càncer s'ha descrit resistència a GH. En els pacients de l'estudi, es va observar resistència en un 13% dels pacients amb PDAC i en el 7.7% de pacients amb altres neoplàsies gastrointestinals, mentre que en controls i pancreatitis crònica no es va trobar resistència a GH en cap pacient. Aquests resultats poden ajudar a explicar parcialment los nivells baixos d'IGF-I en PDAC.

Degut a que cap dels possibles marcadors avaluats va presentar valors mínims per un marcador diagnòstic independent, es va plantejar la combinació de les

sialiltransferases amb el CA19.9 i altres marcadors que s'utilitzen de manera rutinària en clínica, i es van obtenir bons resultats quan es va combinar CA 19.9, CEA, ST3Gal IV, Glasgow Prognostic score amb valors de sensibilitat de 90%, especificitat 86.4% i AUC 0.963 quan es va avaluar el PDAC en front el grup que combina controls, PC i ONEOS. L'associació d'aquests quatre paràmetres proporciona una millor eina diagnòstica que quan s'utilitza CA19.9 o la combinació CA19.9+CEA.

L'únic inconvenient és que la metodologia utilitzada per la determinació de nivells d'expressió de sialiltransferases és molt laboriosa.

Per aquest motiu es va avaluar una combinació alternativa de paràmetres que inclou IGF-I, IGFBP3, CA 19.9 i CEA per millorar la seva precisió diagnòstica en la diferenciació de pancreatitis crònica i adenocarcinoma ductal de pàncrees. Els millors resultats es van obtenir amb la combinació CA 19.9, CEA, IGF-I amb AUC de 0.959, sensibilitat de 87.8%, especificitat del 100%, quan es comparen PDAC i PC. La combinació d'aquests tres marcadors pareixen ser millor predictors que el CA19.9 o la combinació amb CEA.

En el grup de pacients de l'estudi quan es va utilitzar un cut-off de CA 19.9 de 36.3 U/ml es van classificar de manera correcta 36/41 (87.8%) dels PDAC, 11/12 (91.65%) PC, però si a més a més s'inclouen els nivells d'IGF-I i CEA en un model probabilístic es van classificar també correctament 36/41 (87.8%) dels adenocarcinomes de pàncrees, i el 100% de les pancreatitis crònica. Aquesta combinació de marcadors aplicada a set nous pacients també va suposar una classificació correcta dels mateixos

La combinació dels nivells sèrics de CA 19.9, CEA i IGF-I podrien ser utilitzats en un futur com marcadors pel diagnòstic diferencial entre PDAC i PC, malgrat cal ampliar l'estudi amb una cohort major de pacients.

SUMMARY

Cancer is a global public health problem. In this sense, cancer is the second leading cause of death after cardiovascular diseases in Spain. In economically developed countries, the incidence of tumor diseases is progressively increasing as a result of population aging and adoption of cancer-associated lifestyle including smoking, physical inactivity and diet.

Pancreatic adenocarcinoma is one of the most deadly solid tumours and it has the lowest 5-year survival rate, about 5%. It is difficult to diagnose at early stages and it is a tumour of rapid growth and with high tendency to spread and form metastases in early phases.

Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) diagnostic usually arrives in advanced stages since an available diagnosing method is not available. The unique tumour marker used in the clinic is CA 19.9 which lacks of sensitivity and specificity for early diagnosis. Moreover, CA19.9 is also raised in gastrointestinal inflammatory diseases such as chronic pancreatitis (CP).

For that, the serum levels of several molecules associated to PDAC pathophysiology will be evaluated in this work, in order to determine their diagnostic value, alone or in combination, and compared it with that of CA19.9.

Neoplastic cells show altered glycosilation of their cell surface and secreted glycoconjugates, such as an over-expression of sialyled antigens as sialyl-Lewis^x (sLe^x) and their derivatives. The enzymes involved in the last steps of the biosynthesis of these molecules are sialyltransferases and fucosyltrasnferases which compete to transfer sialic acid or fucose to the terminal moieties of their glycan precursors.

In previous reports we described the presence of over-expressed sialyl-Lewis antigens in pancreatic adenocarcinoma cell lines. ST3Gal III and ST3Gal IV sialyltransferases were involved in their synthesis; over-expression of ST3Gal III and ST3Gal IV correlated with an enhancement of sLe^x expression at the surface of pancreatic adenocarcinoma, cell, promoting cellular adhesion, migration and metastases.

In 1994 the importance of circulating nucleic acids in neoplastic diseases was recognized. Since then blood nucleic acids have been considered as potential tumoral markers. According to several studies, we can find several types of mRNA genes

associated to tumours. It seems that the presence of these mRNAs reflects what happens in the tumor cells. Other reports described the association between plasma mRNA and different pathological parameters. Finally, there is an association between the presence of mRNA and aggressiveness of the tumour.

Serum is obtained using a routinely non-invasive technique. Recently it has been described the presence of free tumor mRNA in plasma. Then, the determination of ST3Gal III and Gal IV mRNA levels in plasma would be a technique that would allow us to detect changes in the expression of these enzymes in patients with PDAC. In this work, the levels of ST3Gal III and ST3Gal IV were measured and ST3Gal III could differentiate between patients suffering from chronic pancreatitis and patients with PDAC. Moreover, lower levels of ST3Gal III in early stages of PDAC compared with PDAC advanced stages were reported ($p=0.032$).

The link between inflammation and development of cancer was first suggested in the 19th century. Nowadays it is accepted that inflammation and releasing of pro-inflammatory mediators produce DNA damage and repeated mutations, which may lead to cancer. The presence and magnitude of systemic inflammatory response have been described as a prognostic independent factor for patients with advanced cancer. In order to quantify the inflammatory response, we used the Glasgow Prognostic Score that combines two inflammation markers: C-reactive protein and albumin. We quantified these markers among the studied groups: 21 PDAC patients, 15 patients with different gastrointestinal tumours (GIT), 15 CP and 9 healthy controls (HC). We identified statistically significant differences between either PDAC versus HC ($p=0.012$) and GIT versus HC ($p=0.002$). We also found statistically significant differences between PDAC and CP groups ($p=0.046$), as well as between GIT and PC patients ($p=0.000$).

The insulin-like growth factors (IGFs) are endocrine mediators of growth hormone (GH) in both normal and neoplastic tissues. The IGF-1 shows the characteristics of a circulating hormone and a tissue growth factor. Most of the IGF-1 found in blood circulation is produced by the liver, and its production is regulated by GH and signals related to nutritional status. The beginning of a tumour growth probably depends on

the IGF-1 synthesized by the liver. Thereafter the tumour could be capable to produce IGF-1 in an autocrine manner.

The IGF-1 axis has been correlated with increased risk to develop different neoplastic processes. Given that elevated IGF-1 is considered a risk factor for PDAC development, we decided to evaluate serum levels of this parameter within the same cohort of patients. We hypothesized that IGF-1 could serve as PDAC diagnostic or prognostic marker.

We determined IGF-1 serum levels in PDAC, GIT, PC and HC groups of patients. We found statistically significant lower levels of IGF-1 in PDAC patients in comparison with CP ($p=0.001$) and HC groups ($p=0.002$). We also reported statistically significant reduced values of IGF-1 in GIT patients compared to CP ($p=0.005$) and HC cohorts ($p=0.029$). In order to explain IGF-1 low levels in neoplastic groups of patients, we determined prealbumin levels, since nutritional status directly affects IGF-1 secretion. Prealbumin was statistically significant reduced in PDAC ($p=0.000$), GIT ($p=0.000$) and PC ($p=0.002$) in comparison with HC group. In this sense, deficient nutritional status in cancer patients could explain IGF-1 low levels. However, IGF-1 level in CP patients was not influenced by low prealbumin values. We concluded that other factors besides nutritional status determine IGF-1 secretion in PDAC patients.

Then, we then decided to assess GH serum levels, considering the fact that resistance to GH had been described in cancer and other pathologies. We reported resistance to GH in 13% of PDAC patients and 7.7% of GIT patients, while no GH resistance was detected in CP and HC cohorts. These results could partially explain the low levels of IGF-1 detected in PDAC group.

None of the evaluated markers showed specificity or sensitivity values to be considered independent tumour diagnostic markers. Therefore, we selected several markers and combined them to evaluate their specificity and sensitivity. The combination of CA 19.9, CEA, ST3Gal IV and Prognostic Glasgow score yielded an AUC of 0.963, with 90% of sensitivity and 86.4% of specificity comparing PDAC patients with GIT, CP and HC altogether. The association of these 4 parameters appeared to be a

better diagnostic tool in comparison to CA19.9 alone or combined with CEA (higher sensitivity, specificity and AUC).

However, the methodology used to measure sialyltransferase ST3Gal IV expression levels is quite laborious and this is an important drawback to use the above combination of markers.

For this reason, we evaluated an alternative combination of parameters including IGF-1, IGFBP3, CA 19.9 and CEA with the aim to improve the differential diagnostic between PDAC and CP. The best markers combination was found to be CA19.9, CEA and IGF-1. We obtained an AUC of 0.959, sensitivity 87.8% and specificity 100% comparing PDAC and CP patients. These 3 markers appeared to be better predictors than CA19.9 alone or combined with CEA.

In this group of patients, when CA 19.9 was as a marker with a cut-off of 36.3 U/ml, 87.8% of PDAC and 91.65% of CP patients classified correctly, but when using a probabilistic model combining CA19.9, CEA and IGF-1, 87.8% of PDAC and 100% of PC were classified correctly, thus improving the differential diagnostic. When we applied this combination of markers to new seven patients, the model classified all of correctly.

The combination of IGF-1, CEA and CA19.9 serum levels arises as a potential future marker to improve the differential diagnose between pancreatic cancer and chronic pancreatitis, although further studies including more patients are required.

I. INTRODUCCIÓN

1. PÁNCREAS

El páncreas es una glándula situada en el cuadrante superior de la cavidad retroperitoneal del abdomen. Anatómicamente se divide en cuatro regiones: cabeza, cuello o istmo, cuerpo y cola (Fig. 1). Está en contacto con estómago, duodeno, bazo, colon transverso y riñón izquierdo. También presenta contacto directo con estructuras vasculares como el tronco celíaco y los vasos mesentéricos superiores. Es importante tener en cuenta la situación anatómica del páncreas, sobre todo en el adenocarcinoma pancreático, ya que por la presencia del tumor se pueden afectar los órganos y estructuras vasculares adyacentes.

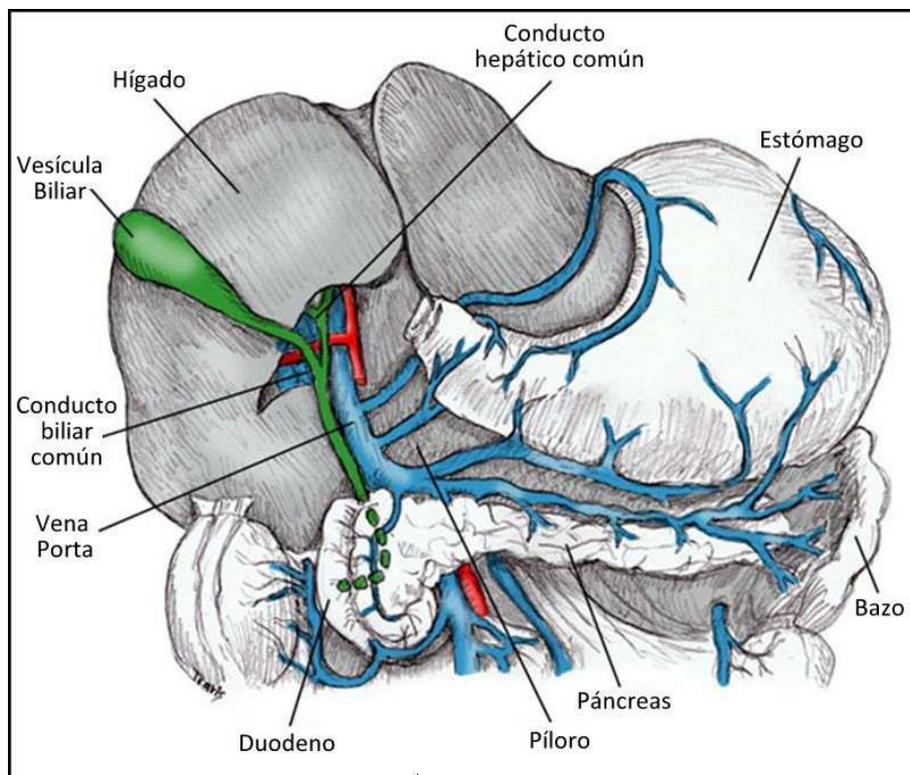


Figura 1: Esquema anatómico del páncreas. Extraído y adaptado de <http://emedicine.medscape.com/article/1948885-overview>

El páncreas es un órgano secretor endocrino y exocrino. Los islotes de Langerghans son los responsables de la secreción endocrina, mientras que el sistema acinar-ductal es el responsable de la secreción exocrina, secretando enzimas al tubo digestivo que participan en el proceso de digestión de los alimentos.

El sistema de drenaje del páncreas se denomina *sistema ductal pancreático* y está formado por los conductos principales de Wirsung y Santorini y los conductos intra e interlobulillares

El 80% del parénquima pancreático está formado por células acinares, en las cuales se localizan gránulos que contienen secreción enzimática compuesta por amilasa, tripsina, antitripsina, quimo y antiquimotripsina. Las células pancreáticas son potencialmente peligrosas para el propio organismo, ya que las enzimas que contienen son proteolíticas. En condiciones normales, el organismo tiene mecanismos para protegerse de la autodigestión. Estos mecanismos son la síntesis de los enzimas en forma de precursores inactivos, la síntesis de inhibidores de proteasas y la compartimentalización de los diferentes zimógenos a lo largo de los procesos de síntesis y transporte (Navarro, 2002; Capítulo 1).

1.1 PATOLOGÍA INFLAMATORIA DEL PÁNCREAS

Las enfermedades inflamatorias del páncreas se clasifican en pancreatitis aguda y crónica. Esta clasificación se basa fundamentalmente en criterios clínicos. En el caso de la pancreatitis aguda, después de un episodio se restablece la función normal del páncreas y en el caso de la pancreatitis crónica, queda una lesión residual permanente.

El estudio de los procesos inflamatorios del páncreas es importante, ya que existen estudios que relacionan la inflamación con el cáncer. La inflamación, podría ser una etapa previa para el desarrollo del adenocarcinoma pancreático, siendo los cambios genéticos manifestaciones tardías del proceso inflamatorio sostenido (Farrow, 2002).

1.1.1. PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda se inicia por activación prematura de los enzimas digestivos en las células acinares, dando lugar a autodigestión de la glándula. Histológicamente se produce necrosis de las células acinares e infiltrados inflamatorios del parénquima (Vonlaufen, 2008).

Durante la pancreatitis aguda, tiene lugar un importante estrés oxidativo en la glándula y los radicales libres formados pueden dañar estructuras celulares. Los

radicales libres derivados de oxígeno actúan como en cualquier proceso inflamatorio, amplificando la lesión y realimentando el proceso inflamatorio.

La importancia de diferentes mediadores de la inflamación se refleja en el incremento de niveles séricos de diferentes citocinas proinflamatorias en pacientes con pancreatitis aguda, así como una correlación directa entre estos niveles y la gravedad de la pancreatitis. Entre las citocinas implicadas destacan el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6). Además, estas citocinas actúan induciendo la síntesis de más citocinas, amplificando la respuesta inflamatoria tanto a nivel local como sistémico (Navarro, 2002; Capítulo 12).

1.1.2. PANCREATITIS CRÓNICA

Se define como una enfermedad inflamatoria progresiva del páncreas y se caracteriza por cambios morfológicos irreversibles asociados a dolor y/o permanente alteración de su función. En la pancreatitis crónica, la glándula es anormal antes y/o después del ataque (Steer, 1995; Witt, 2007)

Clínicamente la **triada clásica** se compone de

- 1) Calcificación del sistema ductal pancreático.
- 2) Esteatorrea.
- 3) Diabetes mellitus.

Esta clínica suele establecer el diagnóstico de pancreatitis crónica, pero el conjunto de estos síntomas aparece en menos del 33% de los pacientes, por ello en ocasiones puede ser difícil el diagnóstico basado únicamente en la clínica.

En la pancreatitis crónica, se producen cambios morfológicos agudos que incluyen: edema, inflamación aguda y necrosis; los cuales se superponen a cambios morfológicos crónicos que incluyen fibrosis, inflamación y pérdida de tejido exocrino. Tras una fase subclínica, se producen crisis recurrentes de dolor abdominal apareciendo insuficiencia exocrina y/o endocrina. Se puede llegar a perder entre el 80 y 90% del tejido (exocrino y endocrino) antes de que se presenten síntomas de malabsorción y diabetes.

Histopatológicamente los hechos clave son: fibrosis pancreática, atrofia acinar, inflamación crónica y obstrucción de los ductos (Witt, 2007).

En el páncreas afecto de pancreatitis crónica, debido a los episodios repetidos de inflamación, existe una reducción gradual e incluso desaparición de la masa de células acinares, que van a ser sustituidas por matriz extracelular, dando lugar a una atrofia glandular y fibrosis (Fibrosis: es un exceso de matriz extracelular que presenta alteración en su composición cualitativa y que afecta a la comunicación célula-célula y célula-matriz.) (Navarro, 2002. Capítulo 12; Witt, 2007).

Como agentes causales de la pancreatitis crónica destacan: alcohol, dieta, hipercalcemia, obstrucciones del conducto pancreático, pancreatitis crónica hereditaria, idiopática y pancreatitis tropical. En los países occidentales es el abuso en el consumo de alcohol el principal agente etiológico.

En la patogenia de la pancreatitis crónica se considera que existen 3 elementos fundamentales implicados en el daño pancreático irreversible (Fig. 2).

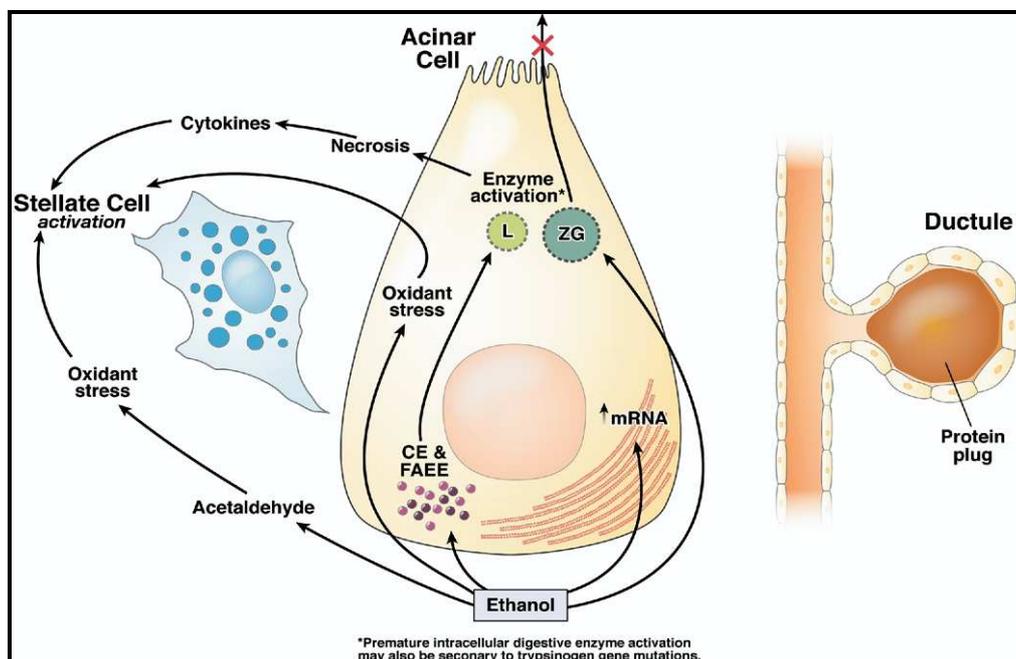


Figura 2: Concepto actual de la patogenia de pancreatitis crónica (Witt, 2007).

1) En función de la causa de la pancreatitis, las células acinares son susceptibles de lesión por autodigestión, ya sea por el efecto del alcohol y sus metabolitos en los orgánulos celulares, que implica un aumento del contenido de enzimas digestivas y lisosomales y desestabilización de los lisosomas y los gránulos de zimógenos, o bien

por el empeoramiento de los procesos de activación/desactivación de tripsinógeno. En presencia del factor desencadenante se inicia el daño de las células acinares.

2) Las células estrelladas pancreáticas, que son activadas por la liberación de citocinas durante la necroinflamación pancreática o por efecto directo del etanol, sus metabolitos y estrés oxidativo, llevando a la producción excesiva de proteínas de la matriz extracelular

3) Los ductos pancreáticos se bloquean por la precipitación de proteínas que además pueden facilitar la progresión de la enfermedad. (Witt, 2007)

1.2 INFLAMACIÓN Y DESARROLLO DE CANCER

Durante muchos años se ha intuido la posible relación entre inflamación y desarrollo de cáncer. Ya en 1863 Rudolf Virchow encontró leucocitos en tejido neoplásico, sugiriendo que esto reflejaba el desarrollo del cáncer en localizaciones en las cuales existía inflamación crónica (Balkwill, 2001).

En procesos de inflamación crónica se produce liberación de citocinas y especies de oxígeno reactivas -ROS-, produciendo daño en las células del estroma, alteraciones en el DNA, que pueden provocar mutaciones en los genes relacionados con el cáncer. Posteriormente, durante el proceso de curación del daño celular, las células dañadas están expuestas a factores de crecimiento. Al combinarse daño celular y proliferación se genera un microambiente en el cual se puede favorecer la expansión clonal de las células transformadas (Fig. 3) (Farrow, 2002).

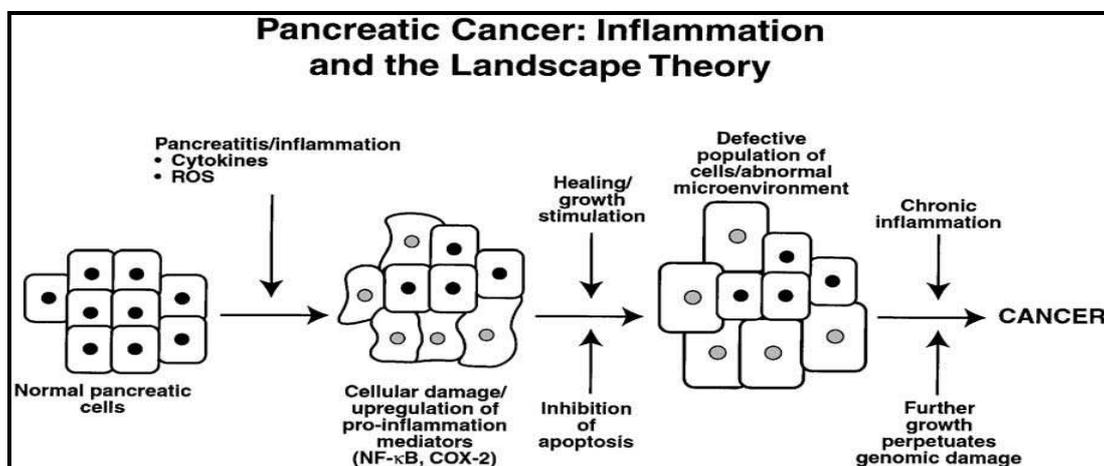


Figura 3: Adenocarcinoma pancreático: Inflamación y la teoría "landscape" (Farrow and Evers, 2002).

Recientemente se ha descrito otro mecanismo que relaciona el cáncer con la inflamación. Se basa en que los mediadores inflamatorios (citocinas pro-inflamatorias, ROS, etc.) son capaces de inducir inestabilidad genética, que genera la acumulación de alteraciones genéticas en las células cancerígenas (Colotta, 2009).

Existen diversos ejemplos que demuestran que un proceso inflamatorio prolongado puede dar lugar a un proceso de malignización celular. En el carcinoma celular escamoso, originado en pacientes con quemaduras en la piel, el tumor proviene de la epidermis inflamada, quedando clara la correlación entre inflamación y malignidad (Phillips, 1998). También se puede relacionar inflamación y cáncer en el cáncer gástrico, originado por inflamación crónica por *Helicobacter pylori* y en el cáncer de colon, precedido de procesos de inflamación intestinal (Farrow, 2002).

Es probable que los mediadores de la inflamación que se liberan en la pancreatitis crónica, produzcan cambios que finalmente lleguen a producir adenocarcinoma pancreático. De hecho, los pacientes con pancreatitis crónica tienen una probabilidad superior de desarrollar adenocarcinoma pancreático comparado con la de los controles, lo que indica que la inflamación crónica puede ser un factor que predispone para el desarrollo del adenocarcinoma pancreático (Lowensfels, 1993; Howes, 2002; Malka 2002)

La inflamación pancreática se asocia con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), liberación de citocinas como TNF- α , IL-6 y especialmente IL-8, y desregulación de factores de transcripción pro-inflamatorios como el factor nuclear κ B (NF- κ B). Estos mediadores pueden producir daño genético, proliferación celular e inhibición de la apoptosis en células del páncreas (Farrows, 2002).

Histológicamente, en la pancreatitis crónica se desarrolla un estroma fibrótico alrededor de las células acinares, que contiene células inflamatorias, fibroblastos y células estrelladas activadas. De manera similar, en el adenocarcinoma pancreático, se induce una reacción desmoplástica y el estroma que se genera está formado por los mismos tipos celulares que en pancreatitis crónica. Este estroma provee en ambos casos de mediadores de inflamación (como citocinas y ROS) y factores de crecimiento que actúan favoreciendo el desarrollo y progresión, desde pancreatitis crónica hasta

adenocarcinoma pancreático y soportan el crecimiento del tumor y la metástasis (Dvorak, 1986).

1.2.1 Glasgow Prognostic Score

Se ha descrito que la presencia y magnitud de la respuesta inflamatoria sistémica es un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer avanzado. En pacientes con tumores inoperables, es importante saber cuál es su pronóstico para seleccionar los candidatos para los distintos tratamientos. (Ramsey 2006). La respuesta inflamatoria se puede poner de manifiesto por la detección de elevadas concentraciones de proteína C reactiva constituyendo un factor pronóstico en pacientes con enfermedad avanzada en distintos tipos de cáncer (Falconer JS, 1995; O’Gorman, 2000; Ueno H, 2000; Scott, 2002; Engelken, FJ; Maltoni, 2005).

Forrest en 2003 utilizó la combinación de proteína C reactiva y la hipoalbuminemia (marcador de fase aguda negativo) para formar una escala pronóstica en pacientes con cáncer inoperable de pulmón; Glasgow Prognostic Score (GPS), con valor pronóstico. También se ha evaluado la utilidad de esta escala en pacientes con adenocarcinoma pancreático y se ha visto que en pacientes inoperables el GPS es un factor pronóstico independiente del estadio tumoral (TNM) (Glen 2006; Shimoda 2010).

El mecanismo por el cual la respuesta inflamatoria sistémica influye en la supervivencia de los enfermos de cáncer no está claro, pero es posible que partiendo de una situación de inflamación sistémica y un mal estado nutricional, los pacientes respondan y toleren mal el tratamiento antineoplásico (Ramsey, 2006).

La utilización de este factor pronóstico tiene gran importancia, ya que se basa en parámetros fácilmente mesurables en laboratorios asistenciales por técnicas estandarizadas.

2. CÁNCER

El término **cáncer**, agrupa un centenar de enfermedades, que se caracterizan por la aparición en un tejido de una serie de células con una capacidad de crecimiento descontrolada. Estas células son capaces de invadir los tejidos vecinos, diseminarse y colonizar otros órganos a distancia –metástasis-, pudiendo producir finalmente la muerte del paciente.

Se define **Tumor** como una masa de células con crecimiento anormal. El proceso de formación de tumores engloba alteraciones en las señales intra e intercelulares, produce la desregulación del ciclo celular, facilita la proliferación celular y promueve que las células invasivas se separen del tumor y migren a través de la matriz extracelular, que prolifere la vascularización *de novo* en los tejidos circundantes y que se diseminen células a otros tejidos produciendo metástasis (Fuster y Esko, 2005) (Fig. 4). Existe gran variedad de tumores. La nomenclatura utilizada, une la terminación -**oma**, a la raíz del tejido de origen.

Los tumores malignos de origen epitelial se denominan genéricamente Carcinomas y representan el tipo de cáncer más frecuente en humanos, probablemente porque la proliferación celular ocurre principalmente en el epitelio o porque los tejidos epiteliales están más frecuentemente expuestos a carcinógenos. Si estos carcinomas provienen de epitelio glandular, y en especial si son secretores, se llaman **adenocarcinomas** y son el principal tipo de cáncer en tejidos de colon, pulmón, ovario, mama, próstata y páncreas entre otros.

El grado de **diferenciación** de un tumor implica el nivel de semejanza morfológica y/o funcional de un tumor con el tejido normal del que procede. Un tumor bien diferenciado indica que es muy similar en apariencia al tejido del cual procede. El grado de diferenciación histológica guarda relación directa con el pronóstico, que es peor cuanto menos diferenciado sea.

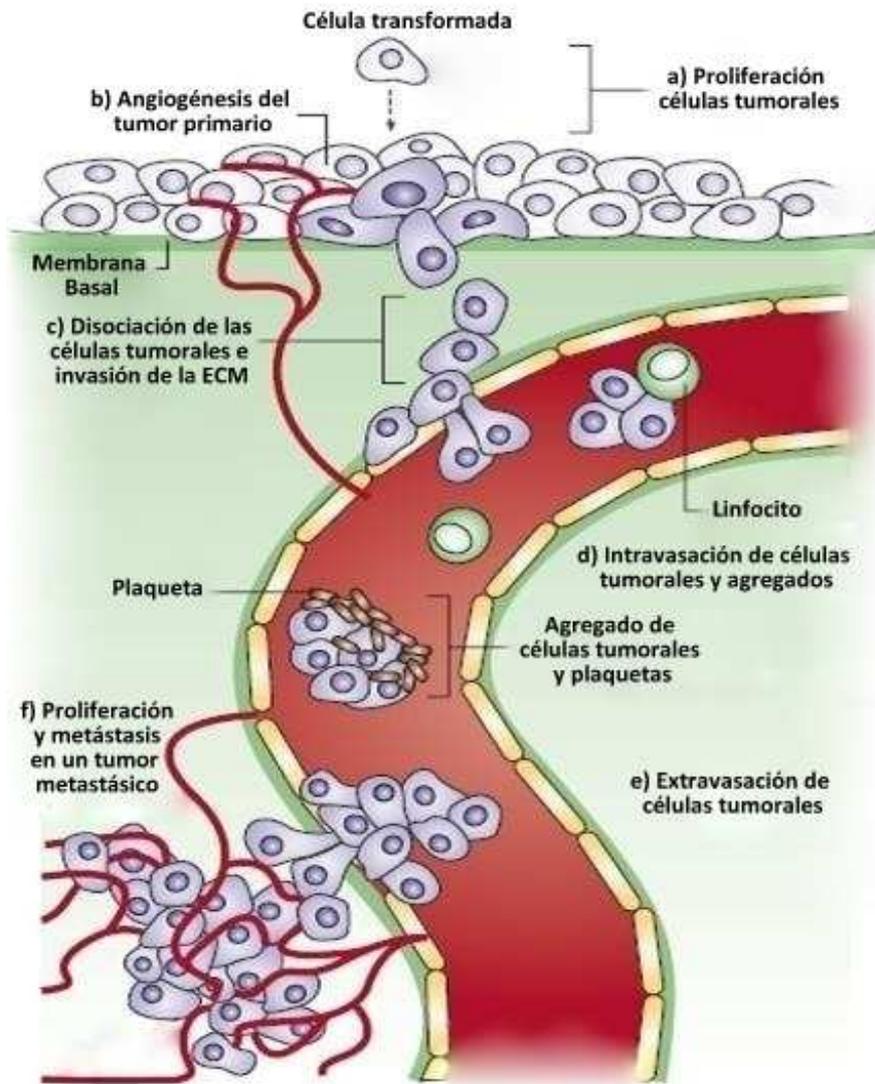


Figura 4: Fases de progresión tumoral. (a) Proliferación celular es una etapa inicial en la progresión. (b) Angiogénesis del tumor, necesaria para el crecimiento del tumor primario (c) Durante la invasión, las células tumorales adquieren la capacidad de degradar y migrar a través de la membrana basal y matriz extracelular (ECM) (d) Extravasación y diseminación de las células tumorales al torrente sanguíneo y formación de agregados con células sanguíneas (e) Las células tumorales mimetizan los linfocitos para poder llevar a cabo su extravasación (f) Tras la extravasación las células tumorales proliferan y desarrollan una red vascular, formando tumores secundarios (metástasis). (Extraído y modificado de Fuster y Esko (Fuster y Esko, 2005).

El cáncer presenta una historia natural característica, consta de diferentes fases que son el resultado de alteraciones genéticas que producen la alteración progresiva de las células normales, dotándolas de ventajas de crecimiento y finalmente transformándolas en células malignas (Hanahan, 2000). En un tejido epitelial, ciertas

células normales puede transformarse en displásicas mostrando ligeras anormalidades que sugieren el comienzo de la transformación maligna. Los patólogos denominan estos cambios como neoplasia intraepitelial y se clasifican como bajo grado (leve) y alto grado (de moderada a severa). Un mayor incremento de la proliferación celular conduce a carcinoma *in situ*, que corresponde al primer estadio maligno del cáncer. El tumor puede progresar invadiendo la membrana basal y a los tejidos circundantes, ganando la capacidad de desprenderse del tumor primario, pueden alcanzar los vasos linfáticos o sanguíneos locales y diseminarse a los ganglios linfáticos regionales o distantes y también a otros órganos (Fuster y Esko, 2005). Esta última etapa llamada metástasis. La característica biológica más importante de los tumores malignos es su capacidad de producir metástasis a distancia, es decir, la capacidad de las células tumorales de diseminarse a otras partes del organismo. Las metástasis son la causa del 90% de muerte por cáncer (Fuster y Esko 2005).

En la pasada década Hanahan y Weinberg propusieron que todos los cánceres compartían seis alteraciones comunes y complementarias en la fisiología celular que desencadenan el crecimiento maligno (Hanahan, 2000). Posteriormente, en 2011 Hanahan y Weinberg han actualizado estas características y las han ampliado (Hanahan y Weinberg, 2011):

1. La autosuficiencia en las señales de crecimiento: diversas mutaciones activan protooncogenes, permitiendo a las células tumorales generar sus propias señales de crecimiento.
2. La insensibilidad a las señales de los inhibidores de crecimiento.
3. La evasión de la muerte celular programada (apoptosis) a través de mutaciones, que inactivan genes supresores de tumores como el p53, o a través de activación de vías de supervivencia.
4. Potencial replicativo sin límites: han perdido su capacidad de limitar su multiplicación.
5. Angiogénesis sostenida o formación de nuevos vasos sanguíneos: las neoplasias son capaces de mantener sus necesidades de oxígeno y nutritivas por promoción de la angiogénesis. El proceso de neo vascularización se produce por la expresión de agentes proangiogénicos como el factor de crecimiento

- endotelial vascular (VEGF) producido por las células tumorales o por la represión de procesos antiangiogénicos.
6. Invasión de tejidos y metástasis: células del tumor primario se desprenden del sitio primario, invaden tejidos adyacentes y viajan a lugares distantes que colonizarán y producirán metástasis en los cánceres metastásicos.
 7. Inflamación: inflamación puede contribuir favoreciendo la formación de tumores mediante la producción de moléculas bioactivas. (Colotta 2009).
 8. Metabolismo alterado: las células neoplásicas requieren ajustes en su metabolismo para poder suministrar la energía necesaria para llevar a cabo su crecimiento y división aumentados.
 9. Interacción con el estroma que rodea al tumor: las células mesenquimales que rodean al tumor forman el estroma asociado al tumor y contribuyen a la biología del tumor.

2.1 INCIDENCIA DEL CÁNCER

El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad. Representa la tercera causa de muerte en los países desarrollados. Esta enfermedad es un importante problema, porque su prevalencia aumenta cada año, o que implica un aumento en los costes clínicos tanto a nivel de diagnóstico como de tratamiento y seguimiento (Greenberg, 2010).

En EEUU se estima que en 2011 se diagnosticarán 1.596.670 nuevos casos y 571950 muertes por cáncer (Siegel, 2011). Actualmente en EEUU una de cada cuatro muertes es debida al cáncer.

En Europa en el 2006 se estima que hubieron 3.191.600 nuevos casos y el número de muertes por cáncer se estima que fue de 1,7 millones (Ferlay, 2007).

En España se diagnostican 150.000 casos de cáncer cada año según estudios realizados por el Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer del Instituto de Salud Carlos III. El cáncer es la primera causa de muerte por enfermedad en hombres y la segunda en mujeres (López-Abente, 2003).

Incidenca de càncer en la Regi3n Sanitaria de Girona

Durante el a1o 2006 se registraron en la regi3n sanitaria de Girona, 3263 nuevos casos de c1ncer, 2012 en hombres y 1251 en mujeres.

Esta incidencia presenta una relaci3n importante con la edad, ya que un 62% de los casos se diagnostican en edades superiores a los 62 a1os. Tambi3n se presenta m1s frecuentemente en hombres que en mujeres. Analizando los datos de incidencia acumulada hasta los 74 a1os de edad, se puede concluir que el riesgo de desarrollar c1ncer hasta los 74 a1os es en uno de cada tres hombres y uno de cada cinco mujeres (CanGir, 2011) (Fig. 5).

En cuanto a la supervivencia observada a los 5 a1os para todos los tumores, en el per3odo se observa un aumento, por ejemplo, el c1ncer de mama presenta una supervivencia aproximada del 75%, esta mejora se ha producido fundamentalmente porque se han aplicado m3todos de *screening* que han favorecido el diagn3stico precoz y por tanto la posibilidad de tratamiento en etapas m1s tempranas de la enfermedad.

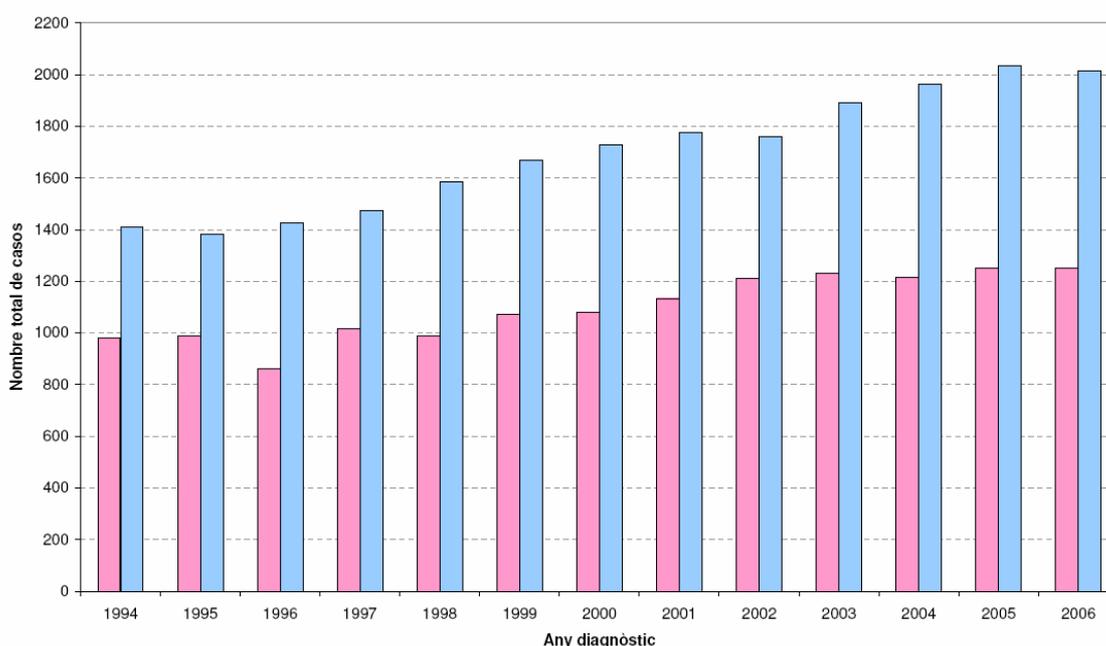


Figura 5: Evoluci3n del n1mero de casos en funci3n del sexo en la Regi3n Sanitaria de Girona (CanGir, Març 2009)

2.2 MARCADORES TUMORALES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER

El término **Marcador tumoral** engloba un amplio espectro de moléculas, de características muy variables, producidas por la célula neoplásica o inducidas por ésta, que reflejen su crecimiento y/o actividad y que permitan conocer la presencia, evolución o respuesta terapéutica de un tumor maligno (Molina, 1994).

Diversas sustancias pueden ser consideradas como marcadores tumorales, incluyendo enzimas, hormonas, proteínas y antígenos de superficie celular.

Un marcador tumoral ideal debería cumplir los siguientes objetivos:

- Diagnóstico precoz de la enfermedad neoplásica, incluso en pacientes asintomáticos mediante estudios a la población general.
- Valor pronóstico de la enfermedad.
- Detección precoz de recidivas tras tratamiento.

La precisión o capacidad para distinguir la enfermedad de los marcadores tumorales viene definido por su: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo.

Se considera **sensibilidad** a la capacidad de detectar la enfermedad cuando ésta está presente; es decir corresponde al porcentaje de pacientes portadores de un determinado tumor, con valores de un determinado marcador fuera del intervalo de referencia.

Se considera **especificidad** a la capacidad de diferenciar entre la patología que se está evaluando y cualquier otra. Es el porcentaje de pacientes sin un tumor maligno, con valores de un determinado marcador dentro del margen establecido como normal.

Valor predictivo positivo: es el porcentaje de personas que presentan el marcador positivo (valor fuera del intervalo de referencia establecido como no patológico) y que realmente tienen la enfermedad.

Valor predictivo negativo: es el porcentaje de personas que presentan el marcador negativo (valor dentro del los márgenes establecidos como normal) y que no tienen la enfermedad.

En base a su utilidad clínica, el marcador tumoral ideal sería aquel que sólo pudiera ser detectado en pacientes con cáncer (especificidad 100%) y que además esta detección pudiera llevarse a cabo en los estadios más precoces de la enfermedad (sensibilidad 100%). (Tabla 1)

	CÁNCER PRESENTE	CÁNCER AUSENTE
MARCADOR POSITIVO	Verdaderos positivos	Falsos positivos
MARCADOR NEGATIVO	Falsos negativos	Verdaderos negativos

Tabla 1: Características de un marcador tumoral ideal (en azul los pacientes que debe ser capaz de detectar)

Las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) se utilizan usualmente para establecer la precisión de un marcador tumoral determinado y para compararlo con otros test diagnósticos o con otros marcadores. Estas gráficas representan la sensibilidad vs. (1-especificidad). El área bajo la curva ROC (AUC) se toma como una medida de la precisión diagnóstica del test. El rango de valores puede ir de uno (separación perfecta de los valores del test en los dos grupos) a 0.5 (no se observa diferencia aparente de los valores del método entre los dos grupos). Es posible determinar si el test diagnóstico es efectivo en diferenciar las dos poblaciones. El rechazo de la hipótesis de que el área teórica de la curva es 0.5 da evidencia que el test tiene la capacidad para distinguir entre los dos grupos ($p < 0.05$) (Zweig y Campbell, 1993).

2.2.1. Clasificación de los marcadores tumorales

En función de la sensibilidad y especificidad, los marcadores tumorales se pueden clasificar en

- Marcadores tumorales de muy elevada especificidad y sensibilidad: aunque pueden ser detectados en diversas situaciones fisiológicas o en ausencia de éstas o ante incrementos importantes, indican siempre la existencia de un tumor maligno.
- Marcadores tumorales de especificidad y sensibilidad variables: son marcadores tumorales con una de especificidad y sensibilidad baja en los estadios iniciales, con valores séricos en la mayoría de casos indistinguibles de

los individuos sanos o en pacientes con enfermedades benignas. Por el contrario, en los estadios avanzados, las concentraciones séricas de estos marcadores permiten asegurar que se trata de un tumor maligno. Este grupo incluye la mayoría de marcadores utilizados en la práctica clínica.

- Marcadores tumorales de baja especificidad: marcadores con sensibilidad dependiente del estadio, pero cuya especificidad es baja incluso en las fases avanzadas de la enfermedad.

El problema es que los marcadores tumorales actuales presentan sensibilidad y especificidad limitadas.

2.2.2. Optimización del uso de marcadores tumorales

Cuando se detectan valores elevados de cualquier marcador es importante diferenciar si el aumento es debido o no a la presencia de una neoplasia para lo cual se utilizan tres criterios (Molina 1994; Molina 1998)

- Concentraciones séricas del marcador: en general, el aumento de concentración sérica de los marcadores tumorales en ausencia de neoplasia suele ser moderada y muy inferior a la que se detectan en caso de metástasis. Cuanto mayor es la concentración del marcador, mayor es la probabilidad de tratarse de un tumor maligno.
- Descartar patología benigna: para mejorar la especificidad es importante conocer las causas ajenas al desarrollo del tumor que pueden causar elevación sérica del marcador (falsos positivos).
- Control evolutivo: el hallazgo de concentraciones elevadas de cualquier marcador, de manera aislada, tiene un valor limitado. Es necesario realizar dos o tres determinaciones seriadas con un intervalo superior a la semivida plasmática del marcador y estudiar en conjunto los resultados respecto al tiempo. En general el plazo mínimo que debe transcurrir entre las dos determinaciones es de quince días, y los incrementos o decrementos han de superar el 20% para ser significativos, fuera del intervalo de referencia. Si las cifras del marcador sufren un incremento continuo, se puede afirmar con

relativa seguridad un origen tumoral, si los valores no se modifican o tienen una tendencia a descender, el origen habrá que buscarlo en otra patología.

Actualmente se utilizan bastantes marcadores en la práctica diaria de un laboratorio clínico. En la Tabla 2 se indican los principales junto con los tipos de tumores a los que se asocian y las causas de resultados falsos positivos (Molina, 2011).

Marcador	Tumor asociado	Falsos positivos
AFP (Alfa- fetoproteína)	Carcinoma hepatocelular. Tumores germinales de testículo u ovario. Cáncer gástrico	Hepatopatías
CEA (Antígeno Carcinoembrionario)	Neoplasias epiteliales especialmente digestivas. Cáncer medular de tiroides, mama, pulmón....	Hepatopatías; insuficiencia renal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn
β-hCG (Subunidad β de la hormona gonadotrofina coriónica)	Tumores trofoblásticos y neoplasias germinales de testículo y ovario (no seminomas)	Embarazo
Calcitonina	Cáncer medular de tiroides. Cáncer de pulmón. Síndrome Zollinger-Ellison	Insuficiencia renal, hipercalcemia, hipergastrinemia, sepsis.
Tiroglobulina	Carcinoma diferenciado de tiroides (folicular > papilar)	Tiroiditis subaguda, embarazo, adenoma tóxico tiroideo, síndrome de Goitier
CA 125 (Antígeno carbohidrato CA 125)	Carcinomas ováricos, pulmonares y de endometrio.	Derrames serosos; Insuficiencia renal; endometriosis
CA 19.9 (Antígeno carbohidrato CA 19.9)	Neoplasias digestivas en especial de Páncreas. Carcinomas mucinosos e indiferenciados de ovario.	Pancreatitis, colestasis, quistes mucinosos o bronquiectasias.
CA 15.3 (Antígeno carbohidrato CA 15.3)	Carcinomas de mama y ovario	Anemias megaloblásticas.
CA 72.4 (Antígeno carbohidrato CA 72.4)	Carcinomas digestivos, ováricos y pulmonares.	Tratamientos con AINES, corticoides u omeprazol.
CIFRA 21-1 (Fragmento de la citokeratina 19)	Neoplasias epiteliales, mesotelioma. Linfomas y sarcomas	Cirrosis hepática e insuficiencia renal.
PSA (Antígeno prostático específico)	Cáncer de Próstata	Prostatitis; Hiperplasia benigna de próstata
NSE (Enolasa neuronal específica)	Carcinoma microcítico de pulmón. Tumor carcinoide, neuroblastomas y tumor de Wilms	Hemorragias cerebrales, isquemia cerebral y hemólisis
SCC (Antígeno asociado a carcinomas escamosos)	Carcinomas escamosos	Insuficiencia renal; Eccemas; Pénfigo, psoriasis
HER2/neu (Oncoproteína del gen c-erb B-2-neu)	Cáncer de mama. Discretos incrementos en próstata y pulmón.	Hepatopatías
5-HIAA (5 Hidroxiindolacético)	Tumores carcinoides, feocromocitoma.	Factores alimenticios.

Tabla 2: Principales marcadores tumorales, indicaciones y causas de falsos positivos. Adaptado de Molina 2011 (Molina, 2011)

2.3 BIOMARCADORES

Actualmente, el concepto de marcador tumoral se ha ampliado al concepto denominado Biomarcador; el *National Institute of Health* lo define como una característica que se mide y evalúa de manera objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacéuticas a intervenciones terapéuticas (Véñzala, 2007). El concepto de biomarcador incluye estados fisiológicos, imágenes, moléculas específicas, alteraciones genéticas y perfiles de expresión genética y proteica.

Jain en 2007 define biomarcador en cáncer como cualquier alteración molecular específica de las células cancerígenas o en los niveles de DNA o RNA como: mutación genética, amplificación, inestabilidad de microsatélites o pérdida de heterocigosidad, alteraciones del DNA mitocondrial, patrón de expresión alterado de mRNA o miRNA (microRNAs) (Jain, 2007).

Los biomarcadores se pueden clasificar en: Marcadores basados en DNA, marcadores basados en RNA, marcadores proteicos –incluyendo determinantes carbohidratados y peptidoma sanguíneo, e imágenes moleculares (Peracaula, 2008; Bensalah, 2007; Petricoin, 2006, Okarvi, 2008).

3. CÁNCER DE PÁNCREAS: Adenocarcinoma ductal de páncreas

Dentro de los cánceres de páncreas, la gran mayoría (el 90%) corresponden a adenocarcinomas de origen ductal (PDAC). El adenocarcinoma pancreático es un tumor agresivo y de mal pronóstico, ya que es difícil de predecir, detectar y diagnosticar en estadios iniciales, debido a su localización anatómica, a la inespecificidad de su sintomatología, así como a la tendencia a diseminarse de forma precoz a ganglios linfáticos e hígado y a la afectación de órganos vecinos. Es resistente a todos los tratamientos actuales excepto la cirugía en etapas tempranas de la enfermedad.

Es considerada una de las enfermedades malignas asociadas a mayor mortalidad ya que el ratio muerte: incidencia es aproximadamente de 0.99 (Lillemoe, 2000).

Desde 1920 hasta 1978 la incidencia ha aumentado 3 veces, pero en EEUU a partir de 1978 se ha estabilizado (9 casos por 100000 habitantes), mientras que en Europa sigue aumentando.

La esperanza de vida de los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático es baja, debido a que:

- El adenocarcinoma pancreático se disemina fácilmente y muchas veces, cuando se diagnostica, ya ha formado metástasis.
- El progreso de la enfermedad está asociado con importante morbilidad, caracterizada por caquexia y astenia.
- El adenocarcinoma pancreático es muy resistente a los distintos tratamientos.

3.1 EPIDEMIOLOGÍA

Dentro de los distintos tipos de carcinomas, el adenocarcinoma de páncreas es el que tiene peor pronóstico, con una supervivencia a los 2 años de diagnóstico del 10% (Mckema, 2003) y a los cinco años inferior al 5%. Ello fundamentalmente debido a que en el momento del diagnóstico, más de la mitad de los cánceres de páncreas han

metastatizado. Prácticamente el 100% de los pacientes desarrollan metástasis y mueren por los efectos debilitantes del cáncer y por su crecimiento descontrolado (Lillemoe, 2000; Donghui, 2004).

El adenocarcinoma de páncreas es la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres en EEUU y constituye el 6% de todas las muertes relacionadas con el cáncer. En EEUU en 2011 se estima que habrá 44030 nuevos casos en EEUU (22050 hombres y 21980 mujeres) (Figura 6) y que morirán 37660 personas (19360 hombres y 18300 mujeres) (Siegel, 2011) (Figura 7).

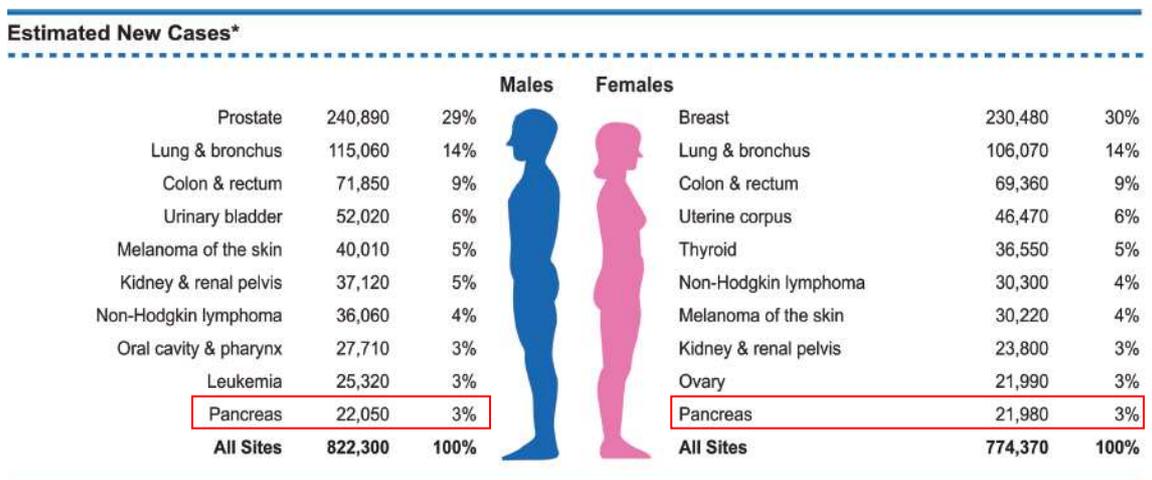


Figura 6: Estimación de nuevos casos de cáncer en EEUU. (Extraído de Siegel, R. 2011)

A nivel mundial, el adenocarcinoma pancreático ocupa la posición 13 en incidencia, pero la octava como causa de muerte por cáncer (Anderson, 2006).

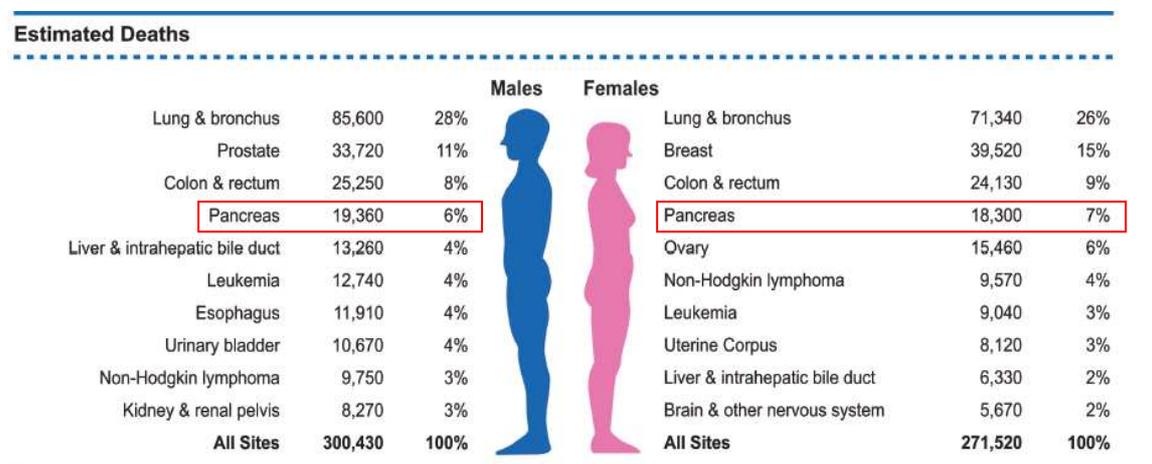


Figura 7: Estimación de muertes por cáncer en EEUU. (Extraído de Siegel, R. 2011)

El 80% de los adenocarcinomas ductales pancreáticos se producen en la cabeza de la glándula. El carcinoma de páncreas en cola y cuerpo se produce menos frecuentemente, aproximadamente un 15% (Lygidakis, 2005).

Muchos de los carcinomas ductales infiltran los espacios vasculares, linfáticos y perineurales. Los pacientes que padecen invasión perineural, presentan menor supervivencia que los que no la padecen. Algunas neoplasias metastatizan en los nódulos linfáticos peripancreáticos. Además también en el momento de la muerte los pacientes presentan metástasis en el hígado, peritoneo, pulmón y glándulas adrenales.

3.2 ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO EN LA REGIÓN SANITARIA DE GIRONA

Si se analizan los tumores más frecuentes sin distinción de sexo, el adenocarcinoma pancreático ocupa el decimosegundo lugar en incidencia en la región sanitaria de Girona en el periodo 2006 (<http://wwwdep.iarc.fr/>). En ninguno de los sexos está presente entre las diez neoplasias con mayor incidencia. Los datos de incidencia según el sexo, en mujeres ocupa el puesto número 14 en incidencia y en hombres ocupa el número 11. Según los datos del Registre de Mortalitat de Catalunya (RMC) durante los años 2003-2004 murieron 2944 (26.9%) personas por tumor maligno. En el área de Girona el número de defunciones anuales en 2006 por adenocarcinoma pancreático fue de 58 (Fig. 8).

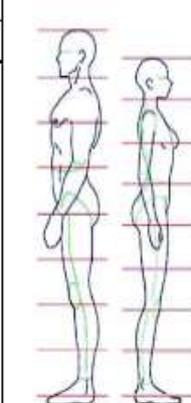
Homes				Dones		
Localització	n	(%)		Localització	n	(%)
Tràquea, bronquis i pulmó	247	25,3	Colorrectal	72	14,8	
Colorrectal	158	16,2	Mama	71	14,6	
Pròstata	75	7,7	Estómac	47	9,7	
Bufeta urinària	57	5,8	Tràquea, bronquis i pulmó	31	6,4	
Fetge	56	5,7	Ovari	27	5,6	
Estómac	50	5,1	Fetge	19	3,9	
Pàncrees	40	4,1	Linfoma no Hodgkin	19	3,9	
Esòfag	26	2,7	Pàncrees	18	3,7	
Llavi, cavitat oral i faringe	25	2,6	Bufeta urinària	17	3,5	
Aparell urinari	24	2,5	Sistema nerviós	15	3,1	

Figura 8: Casos de defunció anuals y frecuencia relativa para los 10 tumores más frecuentes en función del sexo. <http://wwwdep.iarc.fr/>

Si se analiza la mortalidad por sexo, en hombres el adenocarcinoma pancreático ocupa el séptimo lugar con 40 defunciones anuales y en mujeres el octavo lugar con 18 muertes en el año 2006.

Un tratamiento efectivo depende, en la mayoría de casos, de que el tumor se detecte antes que el cáncer esté extendido y haya formado metástasis. Por este motivo es necesario encontrar marcadores indicativos del inicio del tumor, que permitan su detección precoz, y en consecuencia el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos.

3.3 FACTORES DE RIESGO

Debido a la gravedad del adenocarcinoma pancreático, los factores de riesgo han sido estudiados ampliamente y los únicos que se han confirmado son la edad avanzada y el hábito tabáquico (Donghui, 2004).

3.3.1. Demográficos

- Edad avanzada es el factor más importante. El 80% de los casos están comprendidos en el rango de edad de 60-80 años, siendo raros casos antes de los 40 años.
- Raza negra. La incidencia en afroamericanos es mayor que en población blanca. Probablemente debido a la diferencia racial en la capacidad de degradar carcinógenos.
- Género masculino, probablemente debido a las diferencias en el hábito tabáquico, aunque actualmente se están igualando los casos en ambos sexos.
- La incidencia es mayor en países industrializados que en países en vías de desarrollo, quizás debido a los hábitos alimenticios y tabáquicos (Lillemoe, 2000).

3.3.2 Factores individuales

- Alteraciones genéticas
Las alteraciones genéticas son importantes en el desarrollo del adenocarcinoma pancreático, y existen 6 síndromes genéticos con mayor incidencia que son: Cáncer de colon No polipósico hereditario, cáncer de mama familiar asociado con la mutación del gen BRCA2, Síndrome de Peutz-Jeghers,

Síndrome de ataxia-telangiectaxia, Síndrome familiar de melanoma múltiple y Pancreatitis hereditaria (Lillemoe, 2000).

- Diabetes: existen estudios a favor y en contra de la de la relación entre Diabetes Mellitus y adenocarcinoma pancreático. Pero si hay un inicio brusco de diabetes en una persona sana, no obesa de mediana edad o mayor sin antecedentes familiares de Diabetes Mellitus, es recomendable investigar la posibilidad de desarrollar adenocarcinoma pancreático (Lygudakis, 2005).
- Pancreatitis crónica: existe un riesgo 15 veces mayor en el desarrollo de adenocarcinoma pancreático en pacientes con pancreatitis crónica de larga duración (Lowenfels, 1993; Talamini, 1999).
- Obesidad: existen estudios que muestran un riesgo incrementado de desarrollar adenocarcinoma pancreático con el aumento del Índice de Masa Corporal (Lygudakis, 2005).
- Grupo sanguíneo: recientemente se ha observado mayor incidencia de adenocarcinoma pancreático en pacientes de los grupos sanguíneos A, B Y AB comparados con los pacientes del grupo sanguíneo O (Hidalgo, 2010).

3.3.3 Medioambientales

- Tabaco.

Existe evidencia científica que el tabaco aumenta el riesgo de adenocarcinoma pancreático. Diversos estudios prospectivos han demostrado una asociación positiva entre fumar y el adenocarcinoma pancreático, aumentando el riesgo con el número de cigarrillos. El riesgo de padecer adenocarcinoma pancreático es el doble en fumadores y ex-fumadores.

Estudios en animales demuestran que las nitrosaminas y el humo del tabaco son carcinogénicos para el páncreas (Anderson, 1996).

- Dieta y nutrición.

Existe una asociación entre adenocarcinoma pancreático y una dieta hipercalórica con alto contenido en hidratos de carbono y grasas y con bajo contenido en frutas y verduras. Se considera que una dieta rica en frutas y verduras, tiene un papel protector del adenocarcinoma pancreático (Li, 2004).

- Factores ocupacionales.

Se ha observado un riesgo incrementado de padecer adenocarcinoma pancreático en trabajadores de la industria química, de la industria del metal y del aluminio, industria textil y de tintes. No se conoce el mecanismo implicado en esta relación.

A pesar que clásicamente se habían considerado factores relacionados no existe evidencia de la relación del alcohol, café y radiaciones con el adenocarcinoma pancreático.

3.4 DIABETES Y CÁNCER DE PÁNCREAS

Uno de los posibles factores de riesgo del adenocarcinoma pancreático es la intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus tipo 2 (Huxley, 2005; Stolzenberg-Solomon, 2005), aunque hay controversia sobre si la diabetes mellitus está implicada etiológicamente en la carcinogénesis pancreática o es un consecuencia subclínica de la enfermedad. En estudios experimentales se ha demostrado el efecto promotor del crecimiento y mitogénico de la insulina en células de adenocarcinoma pancreático (Kazakoff, 1996) y la presencia de hiperinsulinemia en fases tempranas de la enfermedad (Wang, 2003). La insulina puede influir en el desarrollo del adenocarcinoma pancreático debido a sus efectos en la regulación del crecimiento (Kaaks, 2001).

La insulina es una hormona polipeptídica de peso molecular de 6000 daltons compuesta por dos cadenas unidas entre sí mediante dos puentes disulfuro. La secreción de insulina se produce por respuesta directa a la glucosa exógena, pero también puede ser estimulada por muchos factores como la hiperglucemia, glucagón, aminoácidos y mecanismos complejos en los que participan la hormona de crecimiento o las catecolaminas (Travis, 1980). En el páncreas, en primer lugar se forma la proinsulina que se separa enzimáticamente en insulina y péptido C, que corresponde a una cadena de 31 aminoácidos con un peso molecular de 3020 daltons. Ambos se secretan a la circulación portal en concentraciones equimolares y es por ello que la medida de péptido C puede ser un índice de la secreción de insulina. Debido a que los pacientes en tratamiento con insulina pueden desarrollar anticuerpos antiinsulina que

interfieren con los ensayos de insulina, es importante la cuantificación de péptido C como medida indirecta de la secreción de Insulina.

Estudios epidemiológicos han mostrado que diabetes mellitus de larga duración se asocia con un riesgo aumentado de adenocarcinoma pancreático. (Lin, 2004; Fisher, 2001). La diabetes asociada al adenocarcinoma pancreático se caracteriza por hiperinsulinemia y resistencia periférica a la insulina, mientras que la diabetes asociada a la pancreatitis crónica se caracteriza por disminución de los islotes pancreáticos secretores de insulina, que conduce a una disminución de su secreción. (Meisterfeld, 2008)

La elevada exposición a insulina puede promover el crecimiento *in vitro* de la mayoría de carcinomas pancreáticos humanos (Lin, 2004). En este sentido se ha postulado la secreción de insulina como posible factor determinante en el riesgo de adenocarcinoma pancreático (McCarty, 2001). La insulina a altas concentraciones es capaz de activar el receptor de IGF-I, promoviendo la proliferación celular. Además, la insulina aumenta la síntesis de factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I) y la proteína transportadora de factores de crecimiento insulinoide 3 (IGFBP3) por incremento de los receptores de la hormona de crecimiento (Lin, 2004). También la insulina regula la biodisponibilidad de IGF-I de manera aguda a través de la regulación de la síntesis de IGFBP en el hígado (Macaulay, 1992).

3.5 MARCADORES MOLECULARES

El carcinoma de páncreas está bien caracterizado a nivel genético, pero se desconoce el mecanismo molecular que explique los cambios que se dan en el genoma con la naturaleza agresiva de esta enfermedad. Es decir, se desconoce el mecanismo molecular de cómo las distintas mutaciones, dan lugar a un cáncer tan agresivo.

A nivel histopatológico (Fig. 9), existe progresión en el páncreas desde epitelio ductal normal, a lesiones ductales hasta adenocarcinoma ductal invasivo, pasando por precursores definidos histológicamente llamados “*neoplasia pancreática intraepitelial*” (PanIN). Las alteraciones genéticas asociadas con el adenocarcinoma pancreático se

han identificado en PanIN. Existe una clara acumulación de alteraciones genéticas asociadas con la progresión histológica desde PanINs de grado bajo (I), intermedio (II) y elevado (III) hasta carcinoma invasivo (Hruban, 2000; Maitra, 2006; Ghaneh, 2007; Hruban 2008).

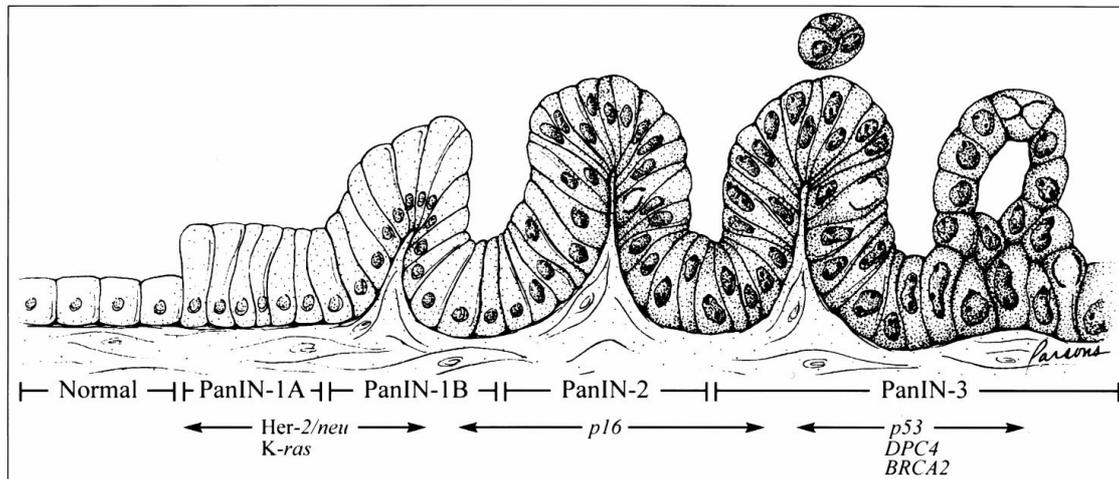


Figura 9: Modelo de progresión para el adenocarcinoma pancreático. La progresión desde histología del epitelio normal, hacia Pan IN, Pan IN de alto grado hasta carcinoma invasivo (izquierda a derecha del esquema) se asocia con acumulación de alteraciones genéticas específicas (Hruban, 2000).

A nivel genético, las principales alteraciones encontradas en el adenocarcinoma pancreático están relacionada con la mutación y/o sobreexpresión de protooncogenes con ganancia de función (oncogenes) y la inactivación de genes supresores de tumores perdiendo su función supresora; así como con anomalías en los factores de crecimiento y sus receptores, que afectan las distintas etapas relacionadas con el crecimiento y diferenciación.

En lesiones ductales pancreáticas con mínima atipia (PanIN I) ya se presentan mutaciones puntuales del gen k-ras y se sobreexpresa el gen Her2/neu, ambos oncogenes (Fig. 10). La inactivación del gen supresor de tumores p16 (INK4a) suele ocurrir posteriormente, en etapas intermedias. La pérdida de los genes supresores de tumores p53, DPC4/Smad4 y BRCA2 tiene lugar en etapas finales del desarrollo del PDAC (PanIN III).

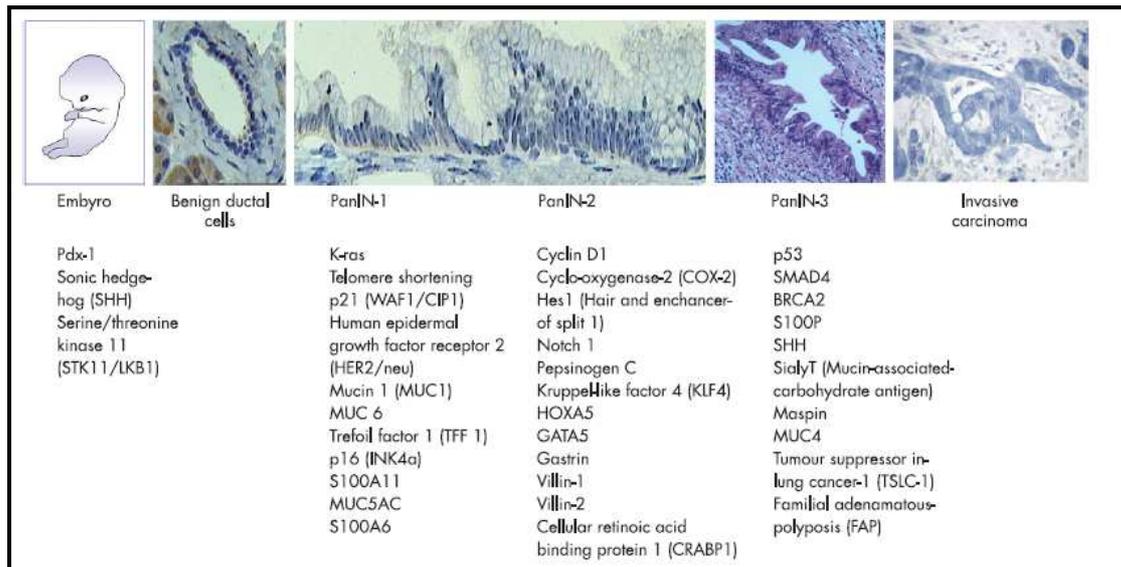


Figura 10: Imágenes histológicas de células benignas epiteliales ductales, lesiones progresivas PanIN y carcinoma invasivo con las alteraciones genéticas asociadas (Ghaneh, 2007).

3.5.1. GENES

La presencia de oncogenes y pérdida de función de genes supresores de tumor en el adenocarcinoma ductal de páncreas, todos ellos relacionados con el control de ciclo celular (especialmente en la fase de transición G1/S), explica la elevada capacidad proliferativa de las células tumorales del PDAC (Maitra 2006 y Ghaneh 2007). Prácticamente todos los pacientes con adenocarcinoma de páncreas bien establecido presentan de uno a más de cuatro alteraciones genéticas (Maitra y Hruban, 2008).

A. GENES SUPRESORES DE TUMORES: p16, p53, DPC4

Son genes que controlan la proliferación celular, frenando el paso de G1 a S. Cuando estos genes sufren mutaciones, se produce pérdida de su acción inhibitoria y por tanto regulación anormal del crecimiento. En el adenocarcinoma pancreático ductal destacan los siguientes:

- o p16 juega un papel fundamental en el punto de control G1 del ciclo celular. El producto del gen INK4A, p16 (INK4A), se une a la quinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6) y evita la formación del complejo activo ciclina D-CDK4/6, que media la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, pRb. Cuando pRb está fosforilada libera factores de

transcripción como E2F que inducen la expresión de genes necesarios para la síntesis de DNA, y la célula entra en la fase S. La acción de p16 es pues la de frenar el inicio del ciclo celular. p16 se encuentra inactivado en el 95% de PDACs (Hidalgo 2010).

- p53 interviene en el control del ciclo celular deteniéndolo en G1, a través de p21, y en la inducción de la apoptosis como respuesta al daño celular. Aparece inactivado en el 50-75% de cánceres de páncreas (Hidalgo 2010). Su inactivación se produce en etapas finales en la tumorigénesis (Garcea, 2005).
- SMAD4/DPC4 aparece inactivado en el 55% de los cánceres de páncreas. La pérdida de su función supone perder uno de los principales componentes de la supresión del crecimiento. Su inactivación se produce en etapas avanzadas de la formación del tumor (Hahn, 1996).
- p21 se induce por p53 y su función es la de inhibir CDK2, que al final de G1 puede fosforilar la pRb. Está inactivado en el 30-60% de los cánceres de páncreas.

B. ONCOGENES

Codifican proteínas, que cuando se activan por una mutación o bien se sobreexpresan, poseen propiedades mitogénicas. Algunos de los oncogenes que se encuentran más ampliamente alterados en adenocarcinoma pancreático son:

- K-ras: Mutaciones puntuales en k-ras inducen la activación oncogénica. El gen K-ras codifica por una proteína de membrana de 21 kDa de unión a GTP (proteína Ras), que cuando está activada es capaz de estimular multitud de cascadas de señalización que conducen a la proliferación celular. Las mutaciones de k-ras provocan que la proteína Ras pierda su actividad GTPasa y se mantenga unida a GTP, induciendo cascadas de señalización celular con actividad mitogénica.

Es la alteración genética más común en el adenocarcinoma pancreático; se encuentra en el 80-90% de los casos (Garcea, 2005; Hidalgo 2010). Se produce en etapas iniciales de la formación del tumor y puede encontrarse en precursores con elevado riesgo de adenocarcinoma pancreático. Estas mutaciones son fáciles de detectar, por lo que en principio se postuló su utilización como posibles candidatos a un test de screening para el adenocarcinoma pancreático, pero no se pudo aplicar debido a que las mutaciones no se dan únicamente en tumores pancreáticos apareciendo también en hipertrofias mucinosas e hiperplasia ductal papilar (Caldas, 1994).

- Ciclina D1: Este gen regula la fase de transición G1/S del ciclo celular. El aumento de los niveles de la ciclina D1 reduce la dependencia de mitógenos externos y acorta la fase G1.

3.5.2 FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES

Son un grupo de moléculas que transmiten señales entre células y funcionan como inductores de la división celular, diferenciación y migración. Diversos factores de crecimiento y sus receptores intervienen en la regulación del adenocarcinoma pancreático y pueden estar relacionados con la agresividad del mismo. La abundancia de factores de crecimiento y la alteración de factores inhibidores del crecimiento en el adenocarcinoma pancreático lleva a la evasión de la apoptosis, inducción del crecimiento, angiogénesis y metástasis (Garcea, 2005).

A. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR)

El EGF pertenece a la familia de factores de crecimiento que inducen la proliferación de tejido epidérmico. Inducen asimismo el crecimiento de las células cancerígenas. Un aumento de su expresión correlaciona con etapas avanzadas del cáncer.

B. Factor de crecimiento transformante β (TGF β)

Superfamilia de factores de crecimiento que influyen en una gran variedad de procesos tanto en células normales como tumorales. Funcionan como inhibidores de la proliferación de muchos tipos celulares, pero son

estimuladoras del crecimiento de las células mesenquimales. Se expresan en el páncreas normal.

Existe una hipótesis que dice que su sobreexpresión aumenta la agresividad del tumor, por promover la angiogénesis del tumor, alterando varios componentes de la matriz extracelular y aumentando la expresión de moléculas de adhesión que facilitan las metástasis del tumor. (Lillemoe, 2000)

C. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFS)

Son factores que estimulan la angiogénesis intensamente y también intervienen en la diferenciación celular, regeneración de tejidos, reparación y migración celular. Se han encontrado expresados a niveles elevados en carcinomas pancreáticos humanos en un 50-60 % de los casos. Su expresión correlaciona con estadíos avanzados del tumor (Yamanaka, 1993)

Participan en el crecimiento de las células pancreáticas y pueden participar en interacciones anormales durante el crecimiento.

3.5.3 OTROS MARCADORES MOLECULARES

El mal pronóstico del adenocarcinoma pancreático es a causa de su elevada capacidad invasiva y metastásica. La invasión por las células tumorales de los tejidos próximos es debida a la pérdida de la adhesión celular, invasión de la membrana basal y rotura de la estructura de la matriz extracelular; en este proceso son fundamentales las colagenasas. Otro factor importante en la evolución del adenocarcinoma pancreático es el incremento de la vascularización, que facilita la expansión del tumor y en el que intervienen los factores angiogénicos.

A. COLAGENASAS O METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ (MMPs)

Las MMPs constituyen una familia de enzimas proteolíticos capaces de degradar diversos componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal. Una de las etapas iniciales en la invasión del cáncer es la degradación de la membrana basal, formada fundamentalmente por Colágeno tipo IV. Las dos principales colagenasas IV son las metaloproteasas de matriz (MMP): MMP2 y

MMP9. Un incremento de su expresión correlaciona con peor pronóstico del adenocarcinoma pancreático (Garcea, 2005; Jones, 1999).

B. FACTORES ANGIOGÉNICOS

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es quimiotáctico y mitógeno para las células endoteliales, y actúa incrementando la permeabilidad del endotelio y favoreciendo la angiogénesis. Se encuentra expresado en el 90% de los cánceres de páncreas (Garcea, 2005).

3.6 FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF) Y NEOPLASIA

Los factores de crecimiento tipo insulina (IGFs) son mediadores endocrinos de la hormona del crecimiento, y también actúan de manera autocrina y paracrina para regular el crecimiento celular, diferenciación y transformación (Moschos, 2002) en diversos tejidos, incluyendo el páncreas exocrino (Stolzenberg-Solomon, 2004). Los IGFs actúan tanto en células normales como neoplásicas e intervienen por tanto en el desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer (Larsson, 2005).

El sistema IGF está formado por dos ligandos: IGF-I y IGF-II; los respectivos receptores: IGF-IR y IGF-IIR; y las proteínas transportadoras de los IGFs, las IGFBP, de las cuales hay 6 tipos, la más abundante en nuestro organismo es la IGFBP3.

El IGF-I tiene características de hormona circulante y de factor de crecimiento tisular, su síntesis se realiza fundamentalmente en el hígado y está regulada por la hormona del crecimiento (GH) y por señales relacionadas con el estado nutricional (Burroughs 1999); una pequeña parte de síntesis se realiza en otros órganos por mecanismos paracrinos y autocrinos (Fig. 11) (Pollak, 2004). IGF-I es una proteína de 70 residuos con 3 enlaces disulfuro intramoleculares y presenta una masa molecular de 7649 daltons. Estructuralmente presenta un 62% de homología con IGF-II y proinsulina (Daughaday, WH; Rotwein, 1989; Moshos, 2002). Su síntesis es estimulada *in vitro* por la GH y por la ingestión de alimentos. (Lee, PD; Rosenfeld RG, 1987). Los niveles plasmáticos de IGF-I son casi indetectables al nacer, aumentan gradualmente

alcanzando un nivel máximo en la pubertad a partir de la cual va disminuyendo (Hall, 1980).

El IGF-II también se sintetiza en hígado y en otras localizaciones extrahepáticas, pero su producción no es tan dependiente de la hormona del crecimiento.

Tanto IGF-I como IGF-II son ligandos del receptor IGF-IR que es un receptor de superficie celular, se expresa de manera ubicua en todos los tejidos donde es importante para el crecimiento tisular, mayoritariamente a través de la hormona del crecimiento, la cual libera IGF-I que activa este receptor (Larsson, 2005). Su activación provoca la fosforilación de sus residuos tirosina intracelulares, que activan la vía de señalización del Akt, lo que conduce a la proliferación celular. La biodisponibilidad de estos factores IGFs va a depender de sus proteínas transportadoras (Firth and Baxter, 2002). La IGFBP3 es la que presenta mayor capacidad de transporte en suero, ya que es la forma predominante y aumenta la vida media de los IGFs circulantes. IGFBP3 es una proteína de 264 aminoácidos con un peso molecular de 29 kDa (Daughaday, 1989).

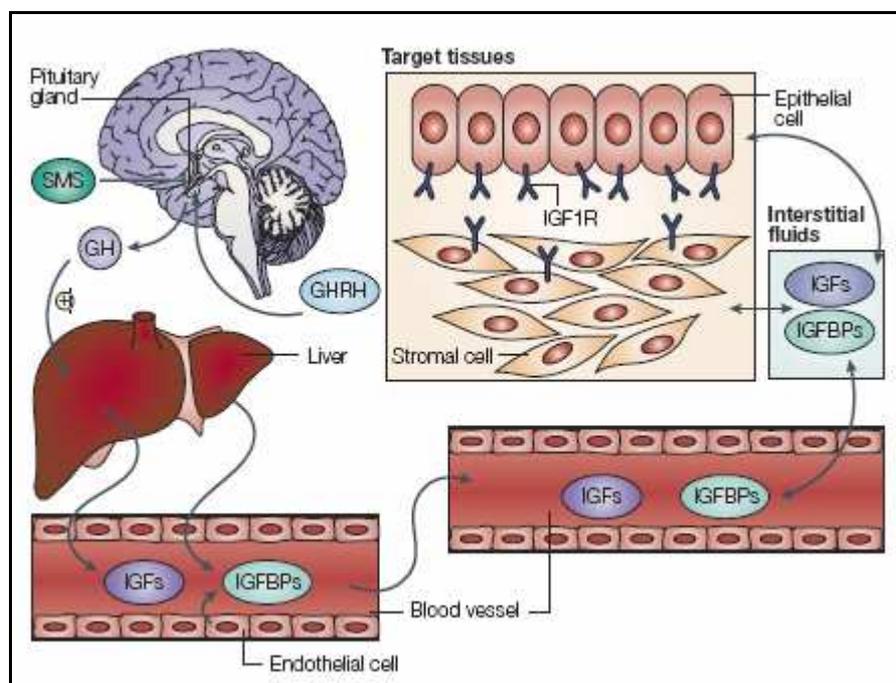


Figura 11: Regulación de los niveles circulantes y en tejidos de los IGFs (Extraído de Pollak 2004)

Entre el 80-90% del IGF-I en sangre está unido a IGFBP3 (Moschos y Mantzoros, 2002; Wolpin, 2007) que inhibe su acción, ya que el IGF-I cuando está unido a la proteína

Es probable que el crecimiento de los tumores durante su evolución, y en las primeras fases dependa de los IGF sintetizados en el hígado, pero en fases más avanzadas adquieran la capacidad de producirlos ellos mismos de manera autocrina, lo que se asocia a un comportamiento más agresivo del tumor (Wu, 2002; Pollak, 2004).

Estudios epidemiológicos han asociado niveles elevados de IGF-I con mayor riesgo de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata y páncreas (Yu, 1999; Hankinson, 1998; Ma, 1999; Chan, 1998; Douglas, 2010). Estos estudios muestran que niveles aumentados de IGF-1, niveles disminuidos de IGFBP3 y/o niveles altos de IGF-I/IGFBP3 predicen riesgo aumentado de cáncer (Stolzenberg-Solomon, 2004).

Por otra parte, existen estudios que no encuentran esta asociación entre niveles elevados de IGF-I y riesgo aumentado de cáncer de próstata (Woodson, 2003; Chen, 2005); cáncer de colon (Max, 2008), cáncer de pulmón (Chen, 2009) o adenocarcinoma pancreático (Stolzenberg-Solomon, 2004; Wolpin, 2007).

También existen diversos estudios que muestran la expresión aumentada del receptor de IGF-I en distintos tipos de cáncer: mama, colon, próstata, pulmón (Diamantopoulos, 2008) y páncreas (Bergman, 1995; Tomizawa, 2010).

3.7 IGF-I Y ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

Como ya se ha dicho anteriormente el eje IGF se ha relacionado con mayor riesgo de desarrollar distintas enfermedades neoplásicas. El IGF-I en tejido pancreático normal se expresa a baja concentración, mientras que en tejido de adenocarcinoma pancreático el mRNA de IGF-I está sobreexpresado, tanto en las células cancerosas como en el tejido conectivo circundante, con aumento de la expresión de sus receptores (Bergmann, 1995).

Hay evidencia que IGF-I aumenta el crecimiento y supervivencia de líneas celulares de carcinomas pancreáticos humanos por mecanismos autocrinos y paracrinos (Stolzenberg-Solomon, 2004). IGF-I y su receptor están sobreexpresados en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, donde la iniciación de señal intracelular se

realiza a través del IGF-IR aumentando la proliferación, invasión y expresión de mediadores de la angiogénesis (Ohmura, 1990; Bergmann, 1995; Wolpin, 2007).

La mayor parte de estudios que relaciona el eje IGF y adenocarcinoma de páncreas estudian la relación entre los niveles de las distintas proteínas y el riesgo de desarrollar adenocarcinoma pancreático. Lin y colaboradores en 2004 realizaron un estudio de casos anidados que muestra que niveles basales elevados de IGF-I e IGFBP3 en pacientes con adenocarcinoma pancreático se asocian positivamente a elevada mortalidad. En 2007 otro estudio de casos anidados-control sugiere que niveles bajos de IGFBP1 predice significativamente el riesgo de adenocarcinoma pancreático (Wolpin, 2007), pero no indican riesgo los niveles de IGF-I, IGF-II e IGFBP3 (Stolzenberg-Solomon, 2004; Wolpin, 2007).

No existen demasiados estudios sobre la asociación de niveles séricos de IGF-1 y este tipo de cáncer. Evans en 1997 en un estudio que incluyó 20 pacientes con adenocarcinoma pancreático y 20 controles; y Meggiato en un estudio posterior con 35 adenocarcinomas pancreáticos, 15 pancreatitis crónica (Meggiato, 1999), no detectaron niveles elevados de IGF-1 e IGFBP3 en pacientes con adenocarcinoma pancreático. En cambio, Karna en 2002 mostró niveles significativamente más altos en suero de IGF-I e IGFBP3 en pacientes con adenocarcinoma pancreático (n=10), comparado con pacientes control (n=10) y con pancreatitis (n=10). El problema de este último estudio es que incluye pocos pacientes.

Dada la relevancia del IGF-I y de la insulina (apartado 3.4) como factores favorables para el desarrollo del adenocarcinoma pancreático, sería interesante poder evaluar en una misma cohorte de pacientes si sus niveles séricos pueden tener valor diagnóstico o pronóstico.

3.8 CLÍNICA DEL ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

Los síntomas del adenocarcinoma de páncreas son muy inespecíficos, lo cual va a retrasar el diagnóstico. Los síntomas más específicos se desarrollan en las etapas más avanzadas, cuando se produce obstrucción e invasión de las estructuras adyacentes, como en el caso de cáncer de cabeza y cuerpo de páncreas

Muchos adenocarcinomas se producen en la cabeza del páncreas, produciendo obstrucción del árbol biliar, que causará ictericia como síntoma de presentación.

Los síntomas iniciales incluyen: anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal y náuseas. Otro de los síntomas es el dolor epigástrico que irradia la espalda. Este dolor es debido a la invasión del tumor en el plexo esplénico y retroperitoneo, y por obstrucción del ducto pancreático.

Las neoplasias del cuerpo y en la cola del páncreas representan el 18% de los tumores de páncreas, y como síntomas presentan dolor inespecífico y pérdida de peso. Es menos probable que produzcan signos y síntomas de obstrucción, por lo que se detectan cuando son de mayor tamaño.

3.9 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico *in vitro* puede realizarse a través de parámetros bioquímicos o de marcadores tumorales

3.9.1 BIOQUÍMICO

En casos de cáncer de cabeza de páncreas se producen niveles elevados en suero de Bilirrubina total, fosfatasa alcalina y gamma glutamil transferasa, y niveles medios de transaminasas. En casos de cáncer de cuerpo y cola de páncreas estos parámetros al principio pueden estar dentro del intervalo de referencia. Aunque existan valores elevados, éstos aparecen cuando el tumor ya está muy desarrollado y obstruye los órganos que le rodean.

3.9.2 MARCADORES TUMORALES

Durante los últimos años se han utilizado distintos tipos de marcadores tumorales para el diagnóstico del adenocarcinoma pancreático, pero aún no se ha encontrado ninguno suficientemente sensible y específico. Se han probado enzimas pancreáticos, inhibidores de proteasas, antígenos de grupo sanguíneo, marcadores glicoproteicos y antígenos oncofetales, como CA 19.9, CA 242, CA 50, CA 494, DUPAN 2, Span 1.

En los últimos años se han probado otros marcadores como MUC1 (Gold, 2006), CEACAM1 (Simeone, 2007) o la citocina 1 inhibidora de macrófagos (MIC1) (Koopmann, 2006); aunque alguno presenta una sensibilidad mayor a la del CA 19.9,

todos presentan menor especificidad que el CA 19.9 en distinguir adenocarcinoma de páncreas de pancreatitis crónica.

Sólo nos referiremos al **CA 19.9**, ya que es el único utilizado en la práctica clínica. Corresponde a un antígeno carbohidrato sialilado, del grupo sanguíneo Lewis^a (Le^a): lacto-N-fucopentosa II, en concreto el sialil-Lewis^a. Su expresión requiere la presencia del enzima alfa1-4 fucosil transferasa (codificado por el gen Lewis). Este marcador no es útil en los pacientes que sean Lewis negativos (5-10% de la población) ya que no podrán sintetizar el CA 19.9, y en estos casos no se puede utilizar el CA 19.9 para su monitorización.

Es el marcador de elección en el adenocarcinoma pancreático, pero su sensibilidad y especificidad son limitadas, sus valores se encuentran dentro del intervalo de referencia en estadios iniciales del cáncer y puede presentar valores elevados en otros cánceres gastrointestinales y en patologías no malignas como colangitis y pancreatitis crónica. Está elevado en el 80% de adenocarcinomas pancreáticos pero también en el 20% de pancreatitis crónica. Además la inflamación de la pancreatitis crónica puede ser mal diagnosticada como cáncer y viceversa. Es por ello necesario encontrar un test que diferencie adenocarcinoma pancreático de pancreatitis crónica.

El CA 19.9 también es producido en cantidades significativas por células epiteliales no malignas, las mucinas secretadas en el jugo pancreático y en la bilis lo contienen. La oclusión de los ductos eferentes en estos órganos produce la acumulación y reflujo del determinante en la circulación general, lo cual produce falsos positivos en el diagnóstico. Estos falsos positivos se producen en pacientes con ictericia (Kannagi, 2007).

En una revisión sobre la utilidad del CA 19.9, Steinbert encontró una sensibilidad del 81% (69%-93%) y una especificidad del 90% (76-99%), más tarde Goonnetilleke en una revisión de 22 estudios encontró una sensibilidad del 79% (70-90%), si se usa como línea de corte un valor de 37 U/ml. Cuando usan un punto de corte de 75 U/ml obtienen sensibilidad del 79% en casos resecables y 91% en irresecables (Steinberg, 1990). Haglund y colaboradores detectan una sensibilidad de 84% en casos avanzados y del 65 % en casos localizados. Los valores de sensibilidad varían dependiendo del

estadío del tumor en el momento que se determina el CA 19.9, cuanto más avanzada esté la enfermedad en el momento del diagnóstico mayor sensibilidad. Lo mismo ocurre con la especificidad, Steinberg encontró un valor medio de 90% (76-99%) y Goonnetilleke de 82% (68-91%).

Todos estos datos indican que el CA 19.9 no se puede usar como un test independiente para el diagnóstico, pero sí es útil para pronóstico y seguimiento (Magnani, 2004), ya que niveles en ascenso indican progreso de la enfermedad, mientras que niveles estabilizados o en descenso indican estabilidad del tumor, ausencia de recurrencias y mejor pronóstico. De hecho está aprobado por la FDA (2005) para su utilización como ayuda en la monitorización de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático y que presentan valores elevados (Burtis, 2008; Capítulo 20).

Se ha visto que la combinación de varios marcadores tumorales como CEA, CA 19.9 y CA 242 puede mejorar la especificidad. Individualmente el CA 19.9 presenta una mayor sensibilidad pero la especificidad es la más baja para distinguir adenocarcinoma pancreático y colangiocarcinoma.

Es importante indicar que en muchos de los pacientes con adenocarcinoma pancreático la concentración de CA 19.9 en el momento del diagnóstico suele ser muy elevada, superior a 1000 U/ml. Como la clínica suele ser inespecífica para hacer un diagnóstico diferencial con otras neoplasias digestivas, según la experiencia de Molina y Cols., concentraciones de CA 19.9 superiores a 1000 U/ml y niveles de CEA negativos o inferiores proporcionalmente al CA 19.9 ($CA\ 19.9/CEA > 5$) indican con elevada probabilidad una neoplasia pancreática (Molina y Filella, 2003).

3.9.3 ESTUDIOS RADIOLÓGICOS

La **ultrasonografía abdominal** (US) es frecuentemente la primera técnica que se realiza en pacientes con clínica abdominal inespecífica o con ictericia. Su sensibilidad para el diagnóstico es del 76% y la especificidad del 75% (Bipat, 2005).

Se considera que el papel de la US en el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático es como herramienta inicial de *screening* en pacientes con sospecha de adenocarcinoma pancreático por dilatación de la vía biliar, pero el diagnóstico definitivo va a tener que completarse con otras técnicas de imagen.

La **tomografía computadorizada helicoidal** (TCH) es la técnica más utilizada en el diagnóstico y estadificación del adenocarcinoma pancreático. La sensibilidad publicada en diferentes series oscila del 76 al 98% (Bipat, 2005; Lu 1996; Lehmann, 1998)

La **TC multicorte** (TCMC), supone una mejora sustancial en la calidad de la imagen y ofrece múltiples ventajas en el estudio de la patología pancreática (Schueller, 2006; Ichikawa, 2006)

La **ultrasonografía endoscópica** (USE) proporciona una imagen de alta resolución por lo que permite detectar lesiones de muy pequeño tamaño, hasta de 2-3 mm (Rösch, 2004). La USE ha demostrado un alto valor predictivo negativo, que llega a alcanzar el 100% en algunos estudios de forma que si no detecta masa en el páncreas el diagnóstico queda prácticamente descartado.

3.9.4 ESTADIAJE

La clasificación de adenocarcinoma pancreático se realiza utilizando el sistema Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM), que clasifica los adenocarcinomas de páncreas en función del tamaño del tumor primario (Tabla 3a), extensión, presencia o ausencia de metástasis en nódulos linfáticos regionales (Tabla 3b) y presencia o ausencia de metástasis a distancia (Tabla 3c). Estos parámetros son los factores más importantes para la resectabilidad y pronóstico del tumor (TNM 7ª Edition).

Cuando el diagnóstico del tumor se efectúa después del estudio histopatológico de la lesión, la letra p se antepone a los parámetros, dando lugar a una clasificación de las lesiones según pT, pN, pM.

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
TX	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 2 cm limitado al páncreas
T2	Tumor > 2 cm limitado al páncreas
T3	Tumor que se extiende más allá del páncreas pero sin afectación del tronco celíaco o la arteria superior mesentérica.
T4	Tumor que afecta a tronco celíaco o arteria superior mesentérica.

Tabla3a: Clasificación del adenocarcinoma pancreático en función del tamaño del tumor primario

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Nx	No pueden valorarse los ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales

Tabla3b: Clasificación del adenocarcinoma pancreático en función de la afectación de ganglios linfáticos regionales

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Mx	No puede valorarse si existen metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia

Tabla3c: Clasificación del adenocarcinoma pancreático en función de la presencia o ausencia de metástasis

pTNM Clasificación patológica

Atendiendo a la descripción de la extensión de la enfermedad basada en el TNM, se utiliza un estadio clínico que agrupa los tumores por categorías de pronóstico (Tabla 4)

ESTADÍO	T	N	M
ESTADÍO 0	T in situ	N0	M0
ESTADÍO IA	T1	N0	M0
ESTADÍO IB	T2	N0	M0
ESTADÍO IIA	T3	N0	M0
ESTADÍO IIB	T1-3	N1	M0
ESTADÍO III	T4	Cualquier N	M0
ESTADÍO IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 4: Clasificación TNM del adenocarcinoma pancreático. (Extraído de TNM classification of malignant tumours. UICC (International Union Against Cancer).

3.10 TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA

La cirugía es el único tratamiento curativo, pero debido a que el adenocarcinoma pancreático tarda en diagnosticarse, menos del 20% de los pacientes presentan un tumor resecable en el momento del diagnóstico (McKenna, 2003).

El adenocarcinoma de páncreas es menos sensible a la quimioterapia que otros tumores sólidos, con unos índices de repuesta de menos del 10%. Los fármacos más utilizados son la Gemcitabina (familia de los análogos de los nucleósidos) y el 5-Fluorouracilo (Familia de antimetabolitos). Estos fármacos se suelen combinar con Radioterapia.

Si se realiza pancreaticoduodenonectomía, para carcinomas periampulares, la supervivencia es dependiente de la localización del tumor. La supervivencia tras resección de tumores del duodeno, ampolla de Váter o ducto biliar es mayor que en carcinoma pancreático. Los tumores periampulares tienen supervivencia a los 5 años de 30-50% mientras que los adenocarcinomas de cabeza de páncreas tienen 5%.

4. NUEVAS ESTRATEGIAS DIAGNÓSTICAS

Para poder mejorar la supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma pancreático, habría que desarrollar técnicas que detectasen la enfermedad en fases pre-sintomáticas, ya que, como se ha comentado en el apartado 3.1, más del 50% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico. Sohn en 2000 mostró que la supervivencia mejora notablemente cuando se diagnostican los pacientes con tumores de pequeño tamaño, con los márgenes de resección negativos y cuando los ganglios linfáticos no se halla afectados (Sohn, 2000). Debido a que los marcadores tumorales de los que se dispone presentan baja sensibilidad y especificidad, para el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático, se sigue investigando para encontrar nuevos marcadores que ayuden en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de este adenocarcinoma tan agresivo.

Desde hace décadas, se sabe que es posible detectar ácidos nucleicos libres en suero/plasma humanos. El primer estudio en el que se describió la presencia de ácidos nucleicos libres en plasma data de 1948, utilizando un método de precipitación (Mandel y Metais, 1948). Posteriormente en 1972 se determinó, por un método fluorimétrico, la concentración de DNA y RNA en plasma de personas sanas (Kamm, 1972).

4.1 DNA PLASMÁTICO COMO MARCADOR TUMORAL

La primera asociación entre ácidos nucleicos circulantes en sangre periférica y condiciones clínicas fue descrita en 1966 cuando se detectó DNA libre en el suero de pacientes con Lupus eritematoso sistémico (Tan, 1966). En 1970 fue descrita la presencia de DNA y RNA en plasma de pacientes con cáncer (Leon, 1977; Shapiro, 1983) pero, no fue hasta 1994 cuando fue reconocida la importancia de los ácidos nucleicos circulantes en procesos neoplásicos, tras detectarse fragmentos de genes

mutados RAS en la sangre de pacientes con cáncer (Sorenson, 1994; Vasioukhin1994). En 1996 se detectaron en pacientes con cáncer alteraciones de microsatélites en el DNA libre en plasma (Nawroz, 1996). A partir de este momento se valoró la potencialidad de los ácidos nucleicos circulantes como marcador tumoral.

Durante los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de los ácidos nucleicos libres en plasma/suero: DNA, mRNA y microRNAs (miRNA) que están presentes en sangre de pacientes con cáncer. La detección de ácidos nucleicos libres en plasma/suero podría servir como “Biopsia líquida” ya que podría ser útil para múltiples aplicaciones diagnósticas pudiendo evitar la realización de numerosas biopsias (Schwarzenbach, 2011), otra posible aplicación es su utilización como factores pronósticos y factores predictivos (Goebel, 2005).

4.1.1 Niveles de DNA en sangre asociados a patologías

Diversos estudios demuestran que la mayoría de sujetos sanos tienen bajas concentraciones de DNA libre en plasma si se compara con pacientes con cáncer, pero el aumento de DNA libre en plasma no sólo se produce en enfermedades malignas, también se encuentra elevado en enfermedades premalignas, inflamación, trauma, tras ejercicio exhaustivo y en pacientes con edad avanzada que sufren enfermedades agudas o crónicas (Atamaniuk, 2004; Fournie, 1995; Jiang, 2005; Laktionov, 2004; Lo, 2000; Marx, 2004).

Las patologías no neoplásicas a las que se ha asociado la presencia de DNA libre en plasma son: artritis reumatoide, glomerulonefritis, pancreatitis, colelitiasis, enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera péptica, hepatitis y esofagitis (Koffler, 1973; Steinman, 1975; Rumore, 1990).

4.1.2 Niveles de DNA circulante en cáncer

A pesar de que el DNA libre en plasma se puede detectar en diversas situaciones clínicas, su determinación, podría tener una aplicación de gran importancia en el diagnóstico de enfermedades malignas. Varios estudios han encontrado elevadas concentraciones de ácidos nucleicos en plasma de pacientes con cáncer, superiores a las encontradas en controles sanos o en enfermedades no malignas (Stroun, 1987). Estos hallazgos se han producido en: cáncer de pulmón (Sois, 2003) y en carcinoma

nasofaríngeo (Lo, 1999). Los mayores niveles de ácidos nucleicos circulantes se asocian con cáncer metastásico y disminuyen hasta un 90% en los pacientes sometidos a radioterapia como respuesta al tratamiento, así mismo valores persistentemente altos o el aumento de los mismos indican una falta de respuesta al tratamiento (Shapiro, 1983). Gautschi en 2004 demostró en pacientes con cáncer de pulmón que los niveles plasmáticos de DNA estaban asociados de manera significativa con el estadio del tumor y estos niveles tenían valor pronóstico (Chan 2007).

La cuantificación de manera aislada del DNA circulante en cáncer no parece ser útil en el diagnóstico ya que en ocasiones se pueden superponer pacientes sanos con enfermos. El uso de las concentraciones de DNA tendría que combinarse con otros biomarcadores sanguíneos para mejorar su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del cáncer. Para este propósito se ha utilizado la detección de alteraciones genéticas específicas de tumor en el DNA plasmático como mutaciones puntuales, microsatélites, alteraciones epigenéticas, nucleosomas e integridad del DNA (Schwarzenbach H, 2011) (Figura 13).

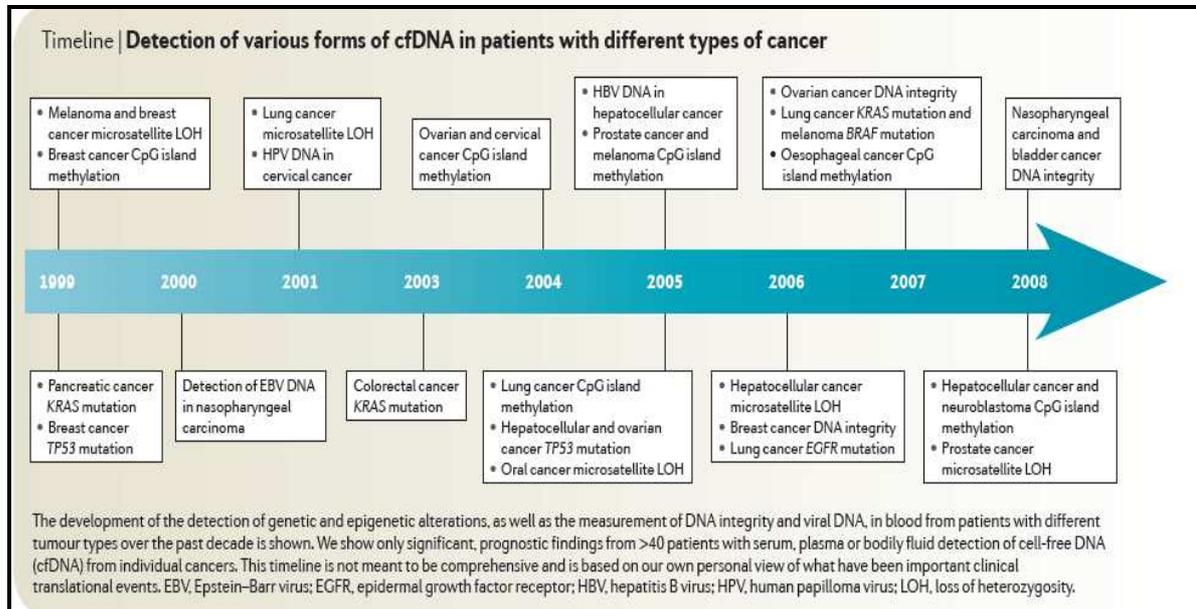


Fig. 13: Evolución de los estudios de las alteraciones del DNA libre en plasma. Mutaciones, metilaciones, integridad del DNA, alteraciones de microsatélites y DNA viral se pueden detectar como DNA libre en sangre (Extraído de Schwarzenbach H., 2011).

Actualmente no se conoce totalmente la fisiología del incremento de ácidos nucleicos en plasma en procesos neoplásicos pero el análisis del DNA circulante permite la detección de alteraciones epigenéticas y genéticas relacionadas con el desarrollo y progresión del cáncer.

4.1.3 Origen del DNA circulante.

En 1989 Stroun observó que el DNA circulante presentaba alteraciones genéticas idénticas a las observadas en el tumor primario (Stroun, 1989). En 1996 Nawroz detecta mutaciones en oncogenes, iguales a las ocurridas en el tumor primario. Estas alteraciones presentes en el DNA circulante son descritas por distintos autores en distintos tipos de cáncer; colorrectal (Ander, 1997), mama (Silva, 1999; Chen, 1999). La mutación de los genes de la familia *ras* detectados en DNA plasmático fueron las primeras alteraciones genéticas relacionadas con tumores.

La liberación de ácidos nucleicos en el torrente sanguíneo parece estar relacionado con la apoptosis y necrosis de las células tumorales en las proximidades del tumor, también se ha postulado la secreción como potencial fuente de ácidos nucleicos (Fleischhacker, 2007; Schwarzenbach H, 2011) (Figura 14).

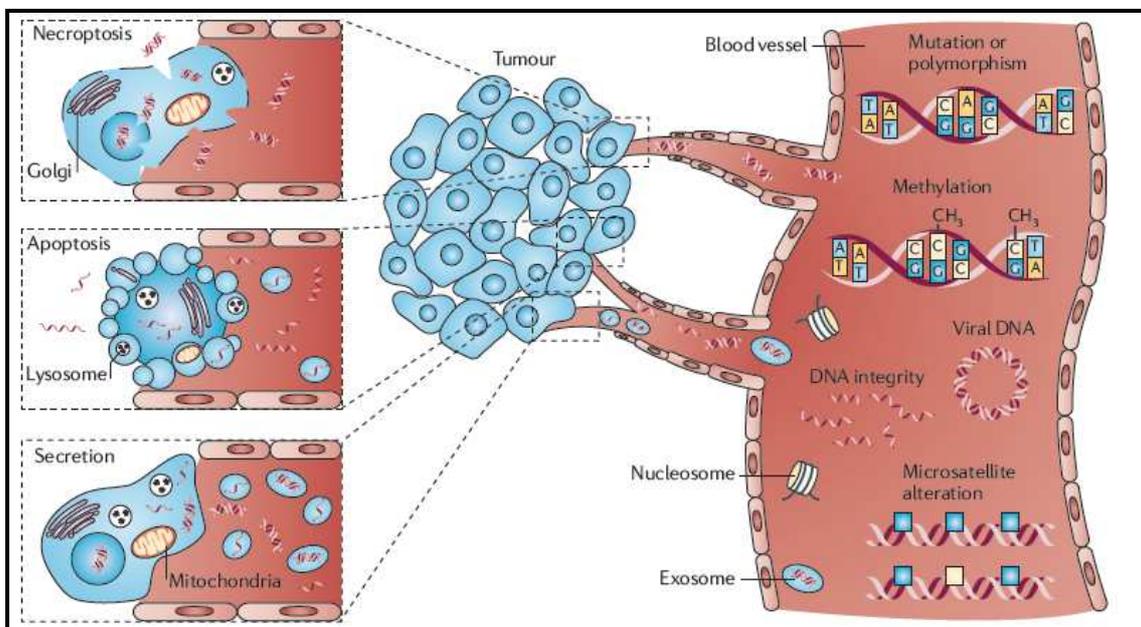


Fig. 14: DNA libre en sangre. Mutaciones, metilaciones, integridad del DNA, alteraciones de microsatélites y DNA viral se pueden detectar como DNA libre en plasma en sangre. El DNA libre que circula en sangre de pacientes con cáncer puede ser liberado por las células tumorales de diferentes formas y a distintos niveles. Puede ser liberado como doble hebra o hebra única. La liberación por las células tumorales se puede realizar por apoptosis, necrosis y secreción. (Extraído de Schwarzenbach H, 2011)

4.1.4 Aplicación de la determinación de DNA circulante.

Una posible aplicación de la determinación de los ácidos nucleicos libres en plasma, además de marcador diagnóstico, sería como marcador pronóstico. De hecho, ya existen estudios que asociación del DNA plasmático relacionado con el tumor y mal pronóstico (Dasi, 2001; Silva, 1999; Silva, 2002; Tabaco, 2001; Shao ,1999; Lo, 1999; Fleischhacker, 2007).

A pesar que el incremento de DNAs no sea específico de una enfermedad, un estudio cuantitativo combinado con otros parámetros clínicos podría ser útil en la evaluación de la terapia (Fleischhacker, 2007).

4.2 RNA PLASMÁTICO COMO MARCADOR TUMORAL

4.2.1 Niveles de RNA en cáncer

El RNA es mucho más frágil que el DNA y susceptible a la degradación por parte de las enzimas ribonucleasas (RNAsas). Es sabido desde hace tiempo que las RNAasas están aumentadas en suero/plasma de pacientes con cáncer (Reddi, 1976), por ello resulta sorprendente que en diversos estudios se encontrara RNA aumentado en distintos tipos de cáncer.

Probablemente la protección de los RNAs frente a las RNAsas sea debida a que éstos se encuentran dentro de cuerpos apoptóticos integrados por complejos de nucleoproteínas y fosfolípidos (Haselman, 2001) o exosomas como micropartículas, micovesículas o multivesículas que son liberadas por desde la superficie de las células tumorales (Schwarzenbach H, 2011; Orozco AF, 2010). En los estudios iniciales de expresión de RNA circulante se utilizaba indistintamente suero y plasma, pero se vio que cuando se utilizaba plasma el método era más sensible y específico (Silva, 2002).

El hecho que el RNA exista con suficiente integridad como para poder detectarlo por qRT-PCR representa una nueva herramienta en el estudio de detección de ácidos nucleicos en plasma de pacientes con cáncer, aunque la poca cantidad de RNA libre en plasma, limita el uso generalizado de esta tecnología.

4.2.2 Detección de RNAs de genes específicos asociados al cáncer

Se han detectado varios tipos de RNA mensajero de genes asociado a tumores: Lo y colaboradores encontraron RNA asociado al Virus de Epstein Barr en pacientes con carcinoma nasofaríngeo; Kopreski encontró mRNA de tirosinasa -gen sobreexpresado en el melanoma- en el suero de pacientes con melanoma (Kopreski, 1999), Chen detectó RNA de telomerasa -enzima relacionada con el cáncer- en cáncer de mama en etapas iniciales, sin metástasis en los nódulos (Chen, 2000 Silva, 2001; Kopreski, 2001), colorrectal (Silva, 2002; Lledo, 2004; Wong, 2004), carcinoma nasofaríngeo (Lo, 1999), pulmón (Kopreski, 2001; Dasi, 2001; Silva, 2002; Wong, 2004; Lo, 1999) y hepatocarcinoma (Miura, 2005). Parece pues que la presencia de este mRNA en suero, es un reflejo de lo que ocurre en las células cancerosas.

También se ha encontrado asociación entre mRNA plasmático y diversas variables clinicopatológicas, asociándose la presencia de mRNA con mayor agresividad del tumor (Silva, 2001; Silva, 2002; Wong, 2004).

Así, Silva y colaboradores en 2001 estudiaron pacientes afectas de adenocarcinoma de mama y encontraron asociación entre la detección de mRNA circulante codificador de los genes mamaglobina y CK19 y parámetros clínico-patológicos relacionados con mal pronóstico, como tamaño del tumor e índice de proliferación.

La presencia de mRNA en cáncer de colon se ha correlacionado con distintos parámetros patológicos compatibles con una mayor agresividad del tumor y la presencia de células tumorales circulantes en estos pacientes (Silva, 2002).

Wong detectó mRNA de beta catenina en pacientes con cáncer colorrectal y otros con adenoma. Aunque el mRNA se encontró en todos los grupos, los niveles fueron significativamente superiores en pacientes con cáncer; además se observó correlación entre los niveles y el estadio del tumor y también se observó disminución de los niveles posterior a la eliminación del tumor (Wong, 2004).

Los mismos resultados se obtienen cuando se determina la expresión de *Bmi* (protooncogen) en cáncer de mama (Silva, 2007) y el mismo grupo investigador estudió el mRNA de Timidilato sintasa en pacientes con cáncer de colon y detectaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos cuando compara pacientes con

cáncer y controles sanos, y estos niveles correlacionan con las metástasis en nódulos y estadios avanzados del tumor (Garcia, 2006).

También estudiaron mRNA de LISCH7 (gen asociado a metástasis) en pacientes con cáncer de colon y pacientes sanos, y este mRNA debido a la especificidad de proceso tumoral no se encontró en ningún control. Se encuentra asociación entre mRNA, metástasis en nódulos linfáticos e invasión vascular (García 2007).

Existen estudios en plasma de mRNA de factores relacionados con la angiogénesis como el VEGF factor A (Garcia, 2008) que es estimulador de la proliferación de células endoteliales y de la formación de vasos sanguíneos. Está desregulado en muchos cánceres y correlaciona con la invasividad, densidad vascular, recurrencia de la enfermedad y menor supervivencia. Se estudió en pacientes con cáncer de colon y se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con neoplasias y los pacientes control. Asimismo los niveles de la proteína son superiores en los pacientes con cáncer.

Sin embargo, la presencia de mRNA y la correlación con datos clínicos presenta resultados contradictorios ya que también existen estudios en los que no se encuentra correlación entre el RNA y parámetros clínicos: Sueoka y colaboradores estudiaron los niveles de mRNA de Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) en pacientes con cáncer de pulmón y no encontraron correlación entre los niveles de mRNA de hnRNP y parámetros clínicos relacionados con el tumor (Sueoka, 2005).

Tampoco Dasí y colaboradores en 2001 han encontrado correlación con variables clinicopatológicas asociadas al tumor: en 2001 en cáncer colorrectal y linfoma folicular, ni Leelawat en 2006 encuentra relación entre la expresión de telomerasa humana de transcripción inversa (hTERT mRNA) y parámetros clínicos en pacientes con colangiocarcinoma. Sin embargo en todos ellos, los niveles de mRNA sí que diferencian de manera significativa entre cáncer y controles sanos.

A pesar de la existencia de gran cantidad de estudios todavía falta demostrar que el estudio cuantitativo de los niveles de RNA de ciertos genes asociados al proceso tumorogénico sirva para el diagnóstico de un determinado tipo de cáncer.

5. GLICOCONJUGADOS

El término Glicobiología se definió por primera vez en 1988 por Rademacher, Parekh y Dwek. La Glicobiología es la ciencia que se ocupa del estudio de la estructura, biosíntesis y funciones biológicas de los glicanos o azúcares. Tiene gran importancia, ya que más del 1% del genoma de los vertebrados codifica por proteínas relacionadas con la síntesis y reconocimiento de los glicanos o azúcares.

Los glicoconjugados (Fig. 15) son compuestos con una o más subunidades mono u oligosacáridas (glicón o glicano), que se unen covalentemente a una parte no glucídica (aglicón). Se encuentran ampliamente distribuidos en los seres vivos y se definen según la naturaleza de la parte no glucídica. Así se distinguen: glicolípidos, glicoproteínas, proteoglicanos y glicofosfolípidos de anclaje (Varki, 1999).

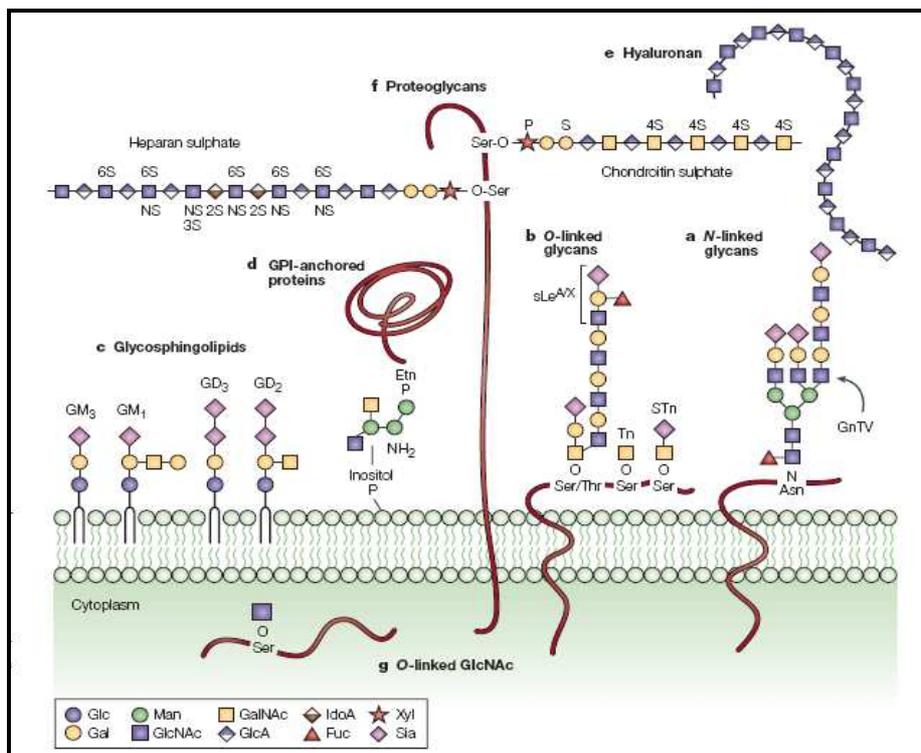


Figura 15: Principales tipos de glicoconjugados (a y b: Glicoproteínas con N- y O- glicanos respectivamente; c y d: Glicolípidos: Glicosfingolípidos, y GPI de anclaje respectivamente; e y f: Proteoglicanos. (Extraído de Fuster y Esko, 2005)

5.1 MONOSACÁRIDOS

Son las unidades más sencillas de los hidratos de carbono. Corresponden a carbohidratos que no se pueden hidrolizar a unidades más simples. Químicamente son

polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas. Son las unidades básicas que se utilizan para la síntesis de oligo y polisacáridos.

Los monosacáridos que forman parte de los oligosacáridos son:

- Ácidos siálicos: familia de azúcares ácidos con 9 átomos de carbono, el representante principal es el Ácido acetilneuramínico, que se suele denominar NeuAc y es el precursor biosintético de todos los demás.
- Hexosas: azúcares neutros de 6 átomos de carbono donde se incluyen: Glucosa (Glc), Galactosa (Gal) y Manosa (Man).
- Hexosaminas: derivan de las hexosas en las cuales se sustituye un hidroxilo por un grupo amino, se incluyen en este grupo: glucosamina y galactosamina. Normalmente están N-acetiladas como: *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) o la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).
- Desoxihexosas: azúcares neutros sin el grupo hidroxilo en posición 6, como la Fucosas (Fuc).
- Pentosas: azúcares de 5 carbonos como la Xilosa (Xyl)
- Ácidos urónicos: hexosas con un grupo carboxilo en posición 6. Ácido glucurónico (GlcA) y ácido Idurónico (IdA).

5.2 GLICOSILACIÓN

Es una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes en las proteínas y lípidos de secreción y de membrana de la célula, pudiendo generar una gran diversidad funcional.

Todas las células de mamíferos contienen un glicocalix formado por glicolípidos, glicoproteínas, glicofosfolípidos y proteoglicanos que se encuentran en la membrana plasmática, núcleo, suero y otros fluidos biológicos (Varki, 1999). La localización de los glicanos en la superficie celular externa y en macromoléculas secretadas por las células les proporciona posición para modular gran variedad de eventos en las interacciones célula a célula, célula-matriz y célula-moléculas. (Varki, 2008)

5.3 CLASIFICACIÓN DE GLICOCONJUGADOS

Se clasifican en función de la naturaleza de la parte no glucídica.

- **GLICOLÍPIDOS:** Estructuras glucídicas unidas a lípidos. Forman parte de las membranas celulares.
- **GLICOPROTEÍNAS:** Glicoconjugados en el que la proteína lleva una o más cadenas oligosacáridas unidas covalentemente a la estructura polipeptídica, normalmente por enlaces N- ó O- glicosídicos.

N-Glicano: es un oligosacárido con unión covalente tipo N- sobre un residuo de asparagina (Asn) de una cadena polipeptídica que contiene la secuencia peptídica consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina). Los N-Glicanos comparten una región central pentasacárida (core), formada por dos N-Acetilglucosaminas y tres manosas. La unión a la asparagina es a través de la N-Acetilglucosamina. Se pueden clasificar en 3 tipos principales: ricos en manosa, tipo complejo e híbrido (Fig. 16).

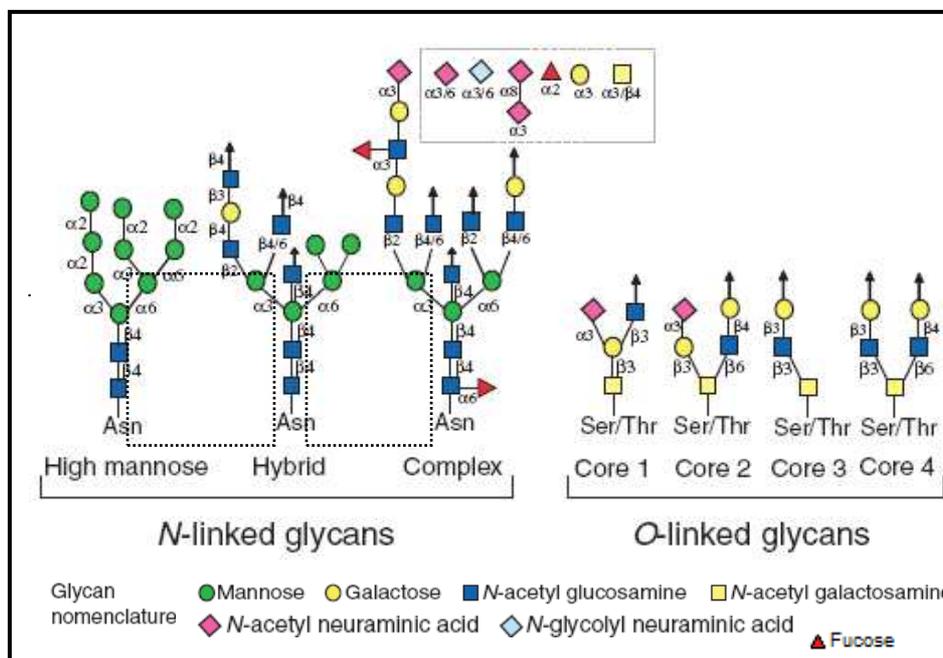


Figura 16: Clasificación de Glicoproteínas: N-Glicanos y O-Glicanos (Extraído de Raman, 2005)

Las estructuras glucídicas híbridas y complejas, tienen en común la unión Galactosa- N-acetil glucosamina (Gal-GlcNAc) con enlaces β 1-3 o β 1-4, que generan las estructuras TIPO 1 y TIPO 2 respectivamente (Fig.

17). Estas estructuras son sustratos para diversas modificaciones como la adición de fucosa y ácido siálico, dando lugar a antígenos tipo Lewis que, según la posición de estos residuos reciben el nombre de Lewis^a (Le^a) y la forma sialilada (sLe^a), Lewis^b (Le^b), Lewis^x (Le^x) y la forma sialilada (sLe^x).

Estas estructuras se generan por la acción de genes, que codifican glicosiltransferasas específicas responsables de la glicosilación terminal de las cadenas de carbohidratos (Kim y Varki, 1999; Fukuda, 1993).

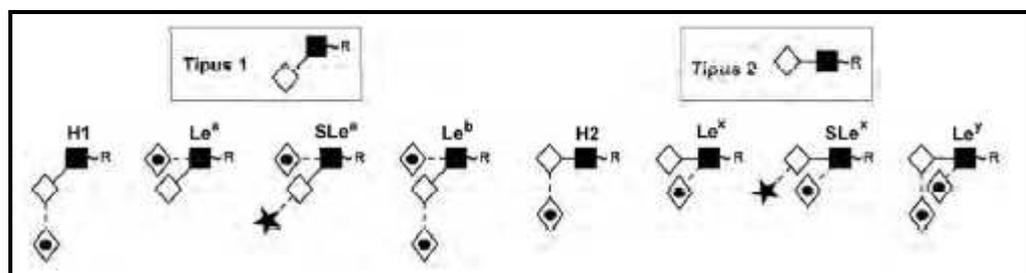


Figura 17: Antígenos glucídicos tipo 1 y 2. R hace referencia a la cadena oligosacárida.

O-Glicano (Fig. 16): es un oligosacárido con unión tipo *O*- (Serina, Treonina). Normalmente está unido al polipéptido vía *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a un residuo de serina o treonina. Los *O*-Glicanos son abundantes en mucinas, y se dan también proteoglicanos y en glicoproteínas. **Las cadenas oligosacáridas de tipo *O*-** son mucho más complejas que las de tipo *N*-, ya que existen hasta 8 tipos de estructuras *core* a partir de los cuales se produce la elongación de la cadena oligosacárida. La estructura de las cadenas carbohidratadas con uniones tipo *O*- varían en función del tipo celular y el tejido estudiado. La primera reacción de la *O*-glicosilación, adición de GalNAc a la cadena peptídica forma el antígeno Tn (GalNAc-*O*-Ser/Thr) (Fig. 18). A partir de esta estructura pueden formarse los diferentes “*core*” mediante la acción de glicosiltransferasas específicas que actúan de manera secuencial. Por ejemplo el *core* 1 se sintetiza por la adición a Tn de un residuo de galactosa unida por un enlace β 1,3 a la GalNAc. Esta estructura conocida también como antígeno TF o de Thomsen-Friedehreich formará posteriormente el *core* 2 por acción de otra

glicosiltransferasa que adiciona otra GalNAc con enlace β 1,6 (Van den Steen, 1998).

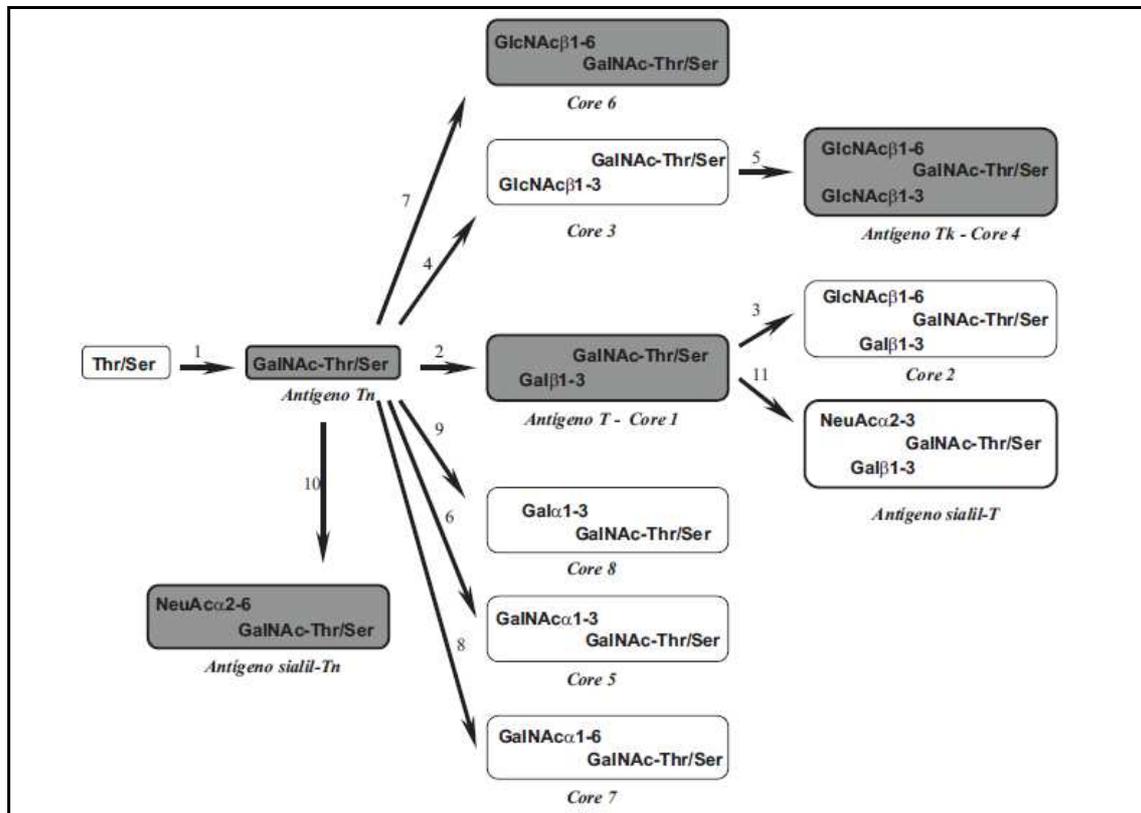


Figura 18. Estructura y biosíntesis del “core” de los O-glicanos. En color oscuro se indican los antígenos asociados a tumor identificados hasta el presente. La primera etapa de la O-glicosilación ocurre por la adición de GalNAc a un residuo de Thr o de Ser de la cadena polipeptídica. Esta reacción es catalizada por una ppGalNAc-T (paso 1). Ocho tipos diferentes de “core” de O-glicanos pueden luego formarse por la actividad de distintas glicosiltransferasas: “core” 1 β 3Gal-T (paso 2), “core” 2 β 6GlcNAc-T (paso 3), “core” 3 β 3GlcNAc-T (paso 4), “core” 4 β 6GlcNAc-T (paso 5), “core” 5 α 3GalNAc-T (paso 6), “core” 6 β 6GlcNAc-T (paso 7), “core” 7 α 6GalNAc-T (paso 8) y “core” 8 α 3Gal-T (paso 9). Las estructuras sialil-Tn y sialil-TF se forman mediante sialilación de los antígenos Tn y TF, en reacciones catalizadas por la α 6-sialil-T (paso 10) o la α 3sialil-T (paso 11), respectivamente. (Freire, 2002)

- **GPI DE ANCLAJE O ANCLAJE TIPO GLICOFOSFOLÍPIDO (Gllicosilfosfatidilinositol):**
Formados por un enlace-puente oligosacárido entre el fosfatidilinositol de membrana y la fosfatidiletanolamina, la cual se une por enlace amida al terminal carboxilo de una proteína. Este enlace sirve para anclar las proteínas a la membrana plasmática (Varki, 1999).

5.4 FUNCIONES DE LOS GLICOCONJUGADOS

Las principales funciones son de tipo estructural y modulador de función.

- Función estructural de la pared celular y de la matriz extracelular.

- Modificación de las propiedades de las proteínas a las cuales se unen: solubilidad y estabilidad.
- Mediadores y moduladores de la adhesión celular.
- Mediadores y moduladores de señales extra e intracelulares.

5.5 SÍNTESIS DE GLICOCONJUGADOS

La biosíntesis de estas cadenas glucídicas tiene lugar fundamentalmente en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi. En todo este proceso de síntesis están implicados: monosacáridos activados (substratos), transportadores de azúcares específicos, **glicosiltransferasas**, glicosidasas y otras enzimas modificadoras de glicanos.

Las glicosiltransferasas, catalizan la formación de enlace glicosídico entre dos azúcares. Estas enzimas se nombran con el nombre del monosacárido-nucleótido donador, la naturaleza del aceptor y del enlace formado. Son enzimas muy específicas que sólo adicionan un tipo de azúcar en un enlace específico.

5.5.1 SIALILTRANSFERASAS

Son las glicosiltransferasas, responsables de la transferencia de ácido siálico a la posición terminal no reductora de cadenas de oligosacáridos, glicoproteínas, o glicolípidos (Harduin-Lepers, 2001). Son altamente específicas. Se han caracterizado más de 20 sialiltransferasas humanas que difieren en: los parámetros bioquímicos, especificidad de sustrato y expresión celular y tisular (Peracaula, 2005; Takashima, 1999).

Se pueden clasificar en cuatro familias en función del enlace que sintetizan (Takashima, 1999; Wang, 2005).

- ST3Gal (α 2,3-STs): transfieren residuos de Neu5Ac, formando un enlace α 2,3- en residuos terminales de Gal presentes en glicoproteínas y glicolípidos. Incluye 6 subfamilias I-VI
- ST6Gal (α 2,6-STs): Comprende solo 2 subfamilias y ambas usan Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAcR como sustrato aceptor. Catalizan la transferencia de residuos de Neu5Ac, formando un enlace α 2,6- en residuos de Gal.

- ST6GalNAc (α 2,6-STs): Catalizan la transferencia de residuos de Neu5Ac, formando un enlace α 2,6- en residuos de GalNAc de glicoproteínas o glicolípidos. Comprende 6 subfamilias.
- ST8Sia (α 2,8-STs I-VI). Catalizan la transferencia de residuos de Neu5Ac, formando un enlace α 2,8- en residuos de Neu5Ac de glicoproteínas o glicolípidos. Comprende 6 subfamilias.

Los niveles de ácidos siálicos en la superficie celular dependen de los niveles de mRNA de los genes de las sialiltransferasas. En humanos, las sialiltransferasas se expresan en distintos tejidos a diferentes niveles. Además, el nivel de expresión de sialiltransferasas cambia durante la transformación maligna (Wang, 2005).

La expresión de los genes que codifican estas enzimas, se altera también en la embriogénesis, lesiones e inflamación dando lugar a patrones de glicanos alterados (Varki, 2007).

6. GLICOSILACIÓN Y CÁNCER

La glicosilación alterada se produce en diversos estados patológicos como pueden ser los procesos inflamatorios y el cáncer (Dube y Bertozzi, 2005). La primera demostración de que los glicanos de las células cancerosas difieren de los de células sanas se realizó en 1969 por Meezan (Meezan, 1969).

La transformación maligna de los tejidos produce una importante alteración de los procesos de glicosilación celular, con cambios que varían en función del tipo de tejido. Las alteraciones de la glicosilación se manifestarán en la superficie celular con alteración en las cadenas de glicanos de las glicoproteínas o glicolípidos anclados a la superficie celular. Estas alteraciones van a influir en las interacciones celulares (Orntoft y Vestergaard, 1999) y afectaran a su capacidad para invadir y metastatizar (Aubert, 2000). La glicosilación aberrante ocurre en todos los tipos de cánceres humanos y experimentales y muchos de los epítomos glicosilados constituyen los llamados “antígenos carbohidrato asociados a tumores” (Hakomori, 2002; Wang, 2005).

Las alteraciones de la glicosilación no sólo se manifiestan en los glicanos de la superficie celular, también las glicoproteínas secretadas por las células tumorales

pueden ser liberadas al torrente sanguíneo. Este hecho puede tener gran importancia en el diagnóstico de tumores ya que estas glicoproteínas se podrían utilizar como marcadores de cáncer.

Las modificaciones de los glicanos en cáncer, incluyen sobre- y baja- expresión de los glicanos naturales así como re-expresión de glicanos restringidos a tejidos embrionarios. Estos cambios normalmente se producen por alteraciones en los enzimas que intervienen en la biosíntesis de las cadenas de glicanos como: glicosiltransferasas, glicosidasas y enzimas que modifican los monosacáridos.

Las alteraciones más frecuentes en la Glicosilación en cáncer son: (Fig. 19)

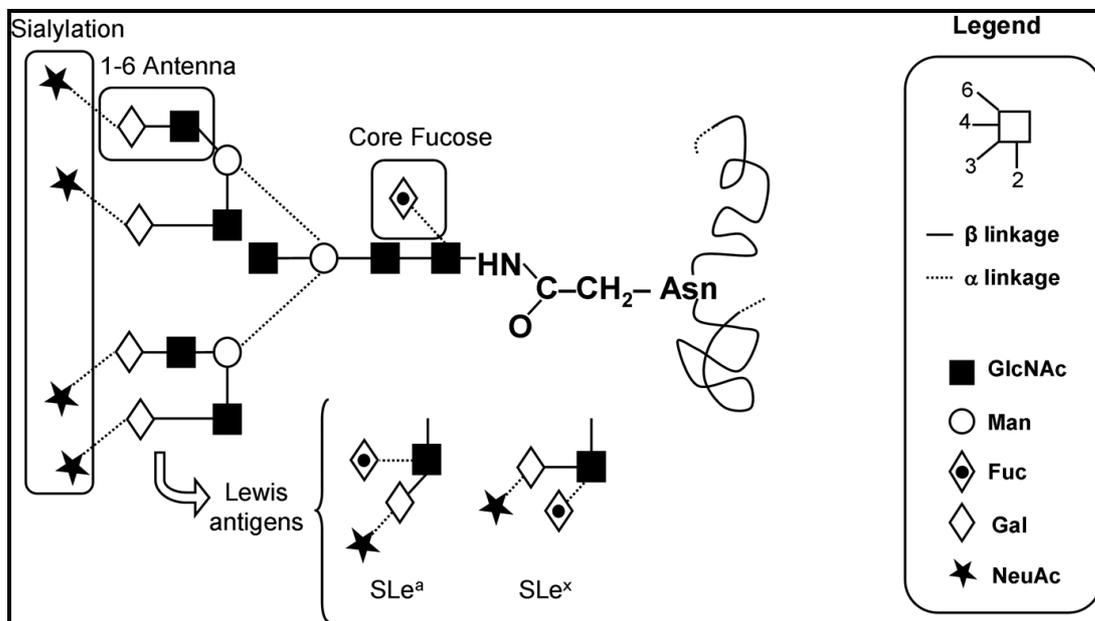


Figura 19: Ejemplo de una estructura N-glicano conteniendo algunas de las alteraciones de carbohidratos encontradas en tumores: incremento de la ramificación β -1,6, incremento de la sialilación, cambios en la proporción de estructuras con fucosilación core y cambios en la expresión de antígenos Lewis (Extraído de Peracaula 2008).

- INCREMENTO DE LAS RAMIFICACIONES DE LAS CADENAS DE N-GLICANOS

El aumento de las ramificaciones de los N-glicanos es frecuente en la mayoría de células malignas. Al aumentar el tamaño del glicano éste será capaz de presentar más estructuras terminales susceptibles de ser sialidadas. El aumento de las ramificaciones en la posición β 1-6 de los glicanos (dando lugar a estructuras tetraantenarias) se

Debido al aumento del ácido siálico en la superficie celular, se produce un aumento de la carga negativa global del glicano, haciendo que la célula pierda su localización tisular específica lo que favorece su invasión (Fuster y Esko, 2005).

- REDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS CORE-2

Durante la transformación maligna, uno de los cambios que ocurren en las cadenas de O-glicanos es la formación de estructuras de menor complejidad por reducción del número de estructuras core 2 y por aumento de estructuras simples. Esto es debido a la reducción de la actividad de la core 2 β -1-6-GlNAc transferasa y β (1-3)-galactosiltransferasa (Orntoft y Vestergaard, 1999).

6.1 ANTÍGENOS SIALILADOS EN CÁNCER

Los antígenos sialilados sLe^a y sLe^x se suelen encontrar aumentados en distintos carcinomas. Estas estructuras son sintetizadas en las últimas etapas por fucosiltransferasas y sialiltransferasas que adicionan moléculas de fucosa y ácido siálico en residuos de GlcNAc o galactosa, respectivamente. En muchos tipos de cáncer la actividad de estas enzimas está desregulada, como en el cáncer de colon (Orntoft, 1991, Dube y Bertozzi, 2005).

El aumento de sialil-Lewis^a y sialil-Lewis^x, se puede correlacionar con la progresión del tumor, el potencial metastásico y mal pronóstico, calificándose estos determinantes antigénicos como antígenos tumorales (Kim y Varki, 1997; Orntoft y Vestergaard, 1999; Fukuda, 1996).

La presencia de estos antígenos sialilados parece proporcionar mayor capacidad de metástasis a las células tumorales por mimetización del proceso de extravasación leucocitaria en procesos inflamatorios (Orntoft, 1999; Kim, Varki, 1997; Fukuda, 1996).

La migración de los linfocitos a un determinado tejido (extravasación leucocitaria) se produce gracias a ciertas moléculas de adhesión en los linfocitos y de ligandos de estas moléculas en las células endoteliales de los vasos. Estas moléculas que juegan un papel clave en la adhesión celular, pertenecen a familia de las **selectinas**. Se expresan en plaquetas activadas (P-selectina), leucocitos (L-selectina) y células endoteliales (E-selectina). En muchos leucocitos se expresa constitutivamente la L-selectina que,

reconoce ligandos sialilados en las células endoteliales. La E-selectina no se expresa de manera constitutiva en células endoteliales, su expresión es inducida fuertemente por estímulos inflamatorios, como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$ o $\text{IL-1}\beta$, intervenciones quirúrgicas, tratamiento con quimioterapia o radioterapia (Kannagi, 2004).

Los determinantes antigénicos sLe^a y sLe^x son ligandos de la E-selectina y cuando se expresan en las células tumorales permiten el primer paso de adhesión de éstas sobre las células endoteliales activadas, que expresan E-selectina, facilitando así su extravasación, proceso previo a la metástasis (Fig. 21). De hecho, la sobreexpresión de sLe^a y sLe^x se correlaciona con el potencial metastásico de las células tumorales. Además, elevados niveles de E-selectina en sangre de pacientes con tumores sLe^a y sLe^x positivos predicen alto riesgo de desarrollar metástasis (Kannagi, 2004).

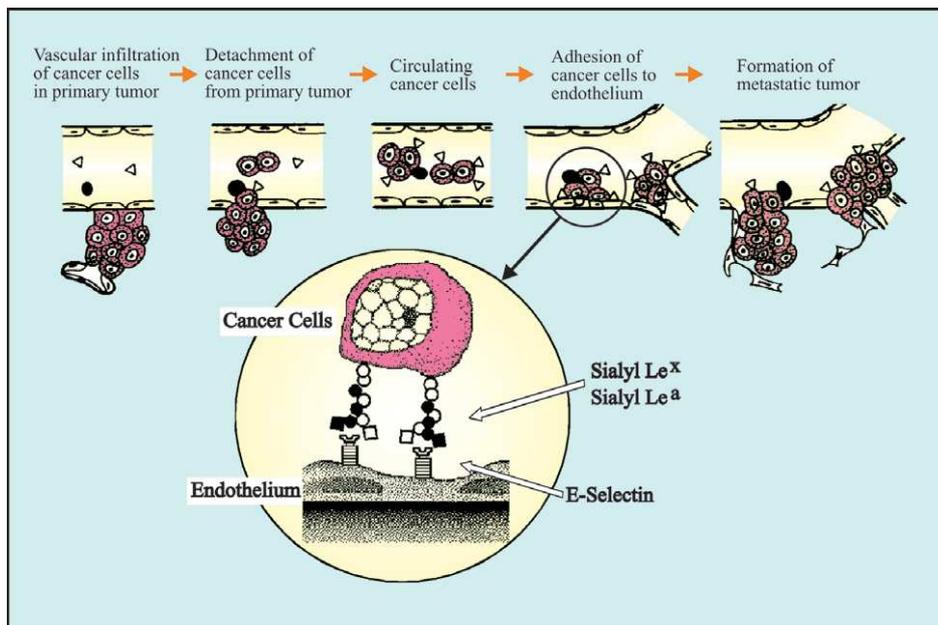


Figura 21: Proceso de metástasis hematogénica en cáncer: se inicia con la intravasación de las células cancerosas en el torrente sanguíneo en la lesión tumoral primaria. Las células cancerosas viajan a través del torrente sanguíneo, donde interactúan con varias células sanguíneas como leucocitos y plaquetas, finalmente se adhieren a las células endoteliales en cualquier lugar de las paredes de los vasos periféricos. La adhesión celular es mediada por la interacción de E-selectina en las células endoteliales y determinantes sialil lewis ^{a/x} de las células cancerosas implicadas en esta etapa (Kannagi, 2004).

A nivel de expresión tisular en tumores, el antígeno sialil Lewis^a se detecta frecuentemente en cánceres de páncreas, tracto biliar, estómago, colon y recto

mientras que el sialil Lewis^x se expresa de manera preferencial en cáncer de pulmón, ovario y mama (Kannagi, 2007).

6.2 SIALILTRANSFERASAS Y CÁNCER

Los ácidos siálicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, como azúcares terminales de oligosacáridos unidos a proteínas o lípidos. Su presencia determinará la vida media de las glicoproteínas, intervienen en la comunicación célula a célula, comunicación con la matriz extracelular y en el reconocimiento molecular durante el desarrollo del tumor, diferenciación y progresión.

Las células tumorales presentan a menudo distinto contenido en ácido siálico en su superficie respecto a las células normales, debido a la diferente expresión de sialiltransferasas (enzimas que catalizan la transferencia de ácido siálico a las cadenas oligosacáridos) y a cambios en la actividad sialiltransferasa. También se altera el contenido de ácido siálico en glicoproteínas secretadas por el tumor como AFP, ribonucleasa pancreática o PSA (Dall'Olio y Chiricolo, 2003, Peracaula, 2005).

Existen evidencias que soportan el concepto de que la expresión aumentada en tejido canceroso de ST6Gal tiene un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer: de mama, colon, hepatocelular y cáncer cervical. (Wang, 2005). Como confirmación también se observa una inhibición de la ST3Gal IV ya que compiten por el mismo sustrato, en cáncer de ovario. En cáncer de ovario también se observa un aumento en la expresión de mRNA de ST6Gal I.

Las sialiltransferasas son importantes en cáncer por varias razones (Dall'Olio y Chiricolo, 2003):

1. Los ácidos siálicos pueden impedir las interacciones celulares debidos a fuerzas de repulsión, ya que confieren carga negativa.
2. Las estructuras sialiladas pueden unirse específicamente a moléculas de adhesión celular como las selectinas.
3. Los ácidos siálicos pueden enmascarar las estructuras glucídicas, evitando el reconocimiento por otras moléculas.

4. Los elementos reguladores de los genes de sialiltransferasas pueden ser dianas de las vías de señalización celular. La sobrerregulación de sialiltransferasas en células de cáncer puede indicar que una vía de señalización específica haya sido activada.

6.3 ANTÍGENOS SIALILADOS Y SIALILTRANSFERASAS EN CÁNCER DE PÁNCREAS

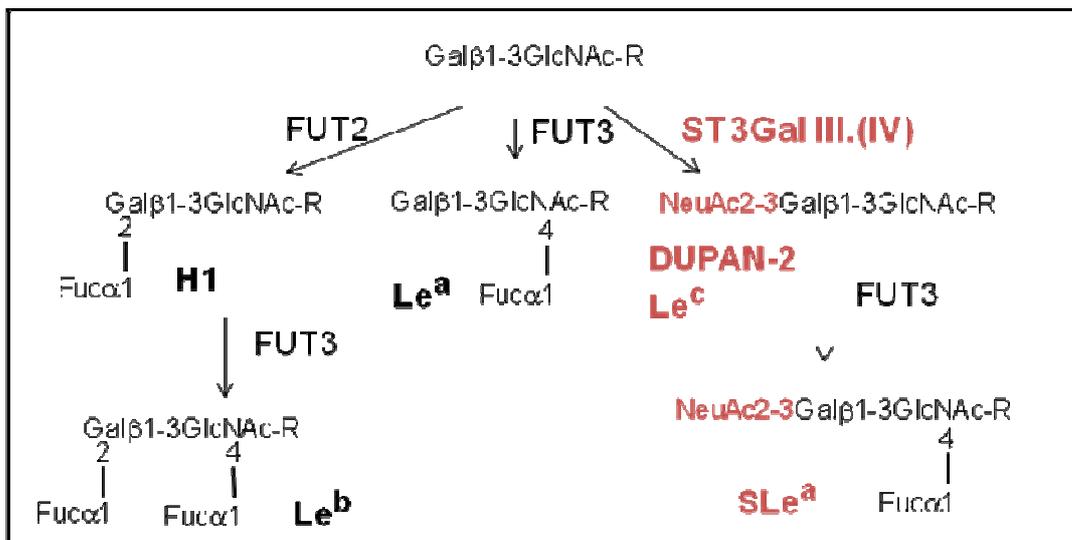
ANTÍGENOS SIALILADOS

En células de adenocarcinoma pancreático las estructuras sLe^a y sLe^x son predominantes (Kim, 1988; Sinn, 1992; Nakamori, 1999; Mas, 1998), hecho que no ocurre en las células pancreáticas normales. Le^x y antígenos relacionados se expresan frecuentemente y se pueden considerar antígenos asociados al adenocarcinoma pancreático.

SIALILTRANSFERASAS

Los cambios en la glicosilación en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, en concreto el aumento en sialil-Lewis^x se asocian con una disminución en la actividad de α 1,2-fucosiltransferasa (FUT) en concreto la FUT1 y además con un aumento en la actividad α 1,3/4-fucosiltransferasa (FUT3) (Mas, 1998; Aubert, 2000). Como la α 1,2-fucosiltransferasa y la α 2,3-sialiltransferasa compiten por el mismo sustrato, la disminución de la actividad de la α 1,2-fucosiltransferasa en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático puede favorecer el aumento de actividad de la α 2,3-sialiltransferasa, produciendo el aumento de antígenos sialilados. También se ha descrito que la actividad α 1,2FUT es inferior en adenocarcinoma pancreático metastásico, aunque no existe correlación con la expresión de FUT1 y FUT2 (Mas, 1998; Aubert, 2009).

CADENAS TIPO I



CADENAS TIPO 2

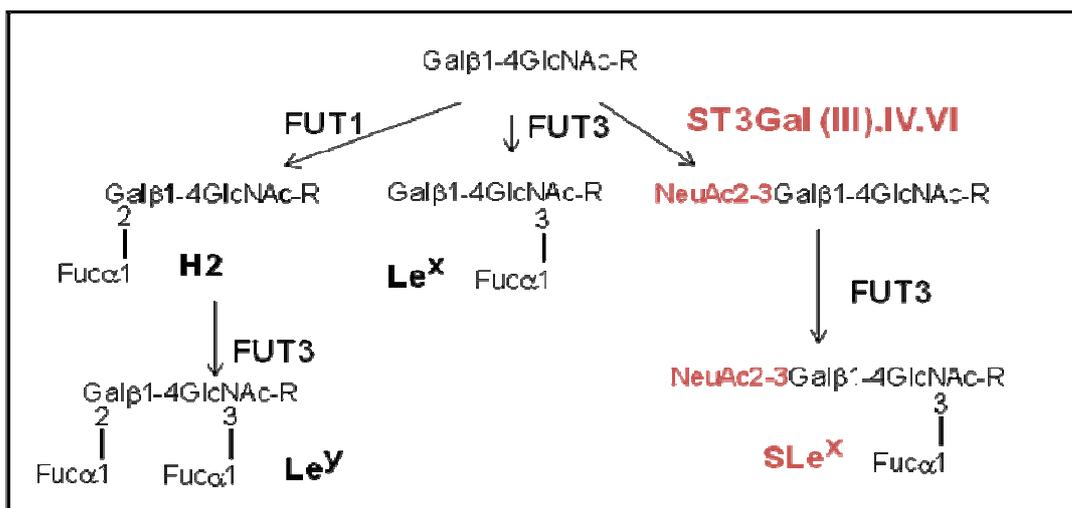


Figura 22: Biosíntesis de los antígenos tipo Lewis. Glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de antígenos tipo Lewis. En las estructuras de tipo 1, el enlace es de una Gal unida β1,3 a GlcNAc. En las estructuras tipo 2, el enlace es de una Gal unida β1,4 a GlcNAc (Extraído de Peracaula 2005).

La síntesis de sLe^x y sLe^a requiere la adición de ácido siálico en el parte externa de las estructuras precursoras de tipo I y tipo II por acción de las α2,3-sialiltransferasas (ST3Gal III, IV y VI). Las alfa-2,3-sialiltransferasas, ST3Gal III y ST3Gal IV, catalizan la formación de enlaces α2,3 en cadenas tipo I y tipo II (Fig. 22). ST3Gal III actúa preferentemente en cadenas tipo I (Gal β1-3GlcNAc) y es por tanto la que interviene en la síntesis de sLe^a. ST3Gal IV (y VI), utiliza glicoproteínas o glicolípidos que contienen cadenas tipo II (Gal β14GlcNAc) y genera el precursor del sLe^x.

En la década de los años 70, se llevaron a cabo estudios sobre posibles cambios de sialiltransferasas en pacientes con cáncer, que se basaron en la determinación de la actividad general de sialiltransferasas utilizando fetuina desialidada como sustrato (Kessel, 1975) en suero y tejido tumoral en pacientes con diversos tipos de neoplasias, pero no en adenocarcinoma pancreático. Una revisión de dichos trabajos por parte de Weiser y Wiston en 1981 muestra que el aumento de actividad sialiltransferasa en cáncer correlaciona con el aumento de la carga tumoral y que en los diferentes tumores las sialiltransferasas afectadas presentan diferentes especificidades de sustrato, pero que tiene poca utilidad en el diagnóstico de procesos tumorales ya que también se observa aumento de la actividad en procesos no neoplásicos como artritis reumatoide y cirrosis hepática. Sin embargo, la determinación de la actividad específica de ciertas sialiltransferasas involucradas en la biosíntesis de antígenos asociados a tumor como sLe^x y/o sLe^a y que desempeñan un rol determinante en etapas clave de la tumorigénesis; sí que podría ser útil como marcadores del tumor, por ejemplo en diagnóstico o en la evaluación de la efectividad de la terapia.

En trabajos previos de nuestro grupo se ha detectado sobreexpresión de antígenos Lewis sialilados, sialil-Lewis^x y/o sialil-Lewis^a, en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático en cuya síntesis están implicadas sialiltransferasas como la ST3Gal III y ST3Gal IV (Peracaula 2005). La expresión de ST3Gal III y ST3Gal IV correlaciona con un aumento de la expresión de sLe^x en la superficie de células tumorales de adenocarcinoma pancreático, facilitando la adhesión celular y migración y por tanto la formación de metástasis; siendo mayor estos efectos en células transfectadas con ST3Gal III que con ST3Gal IV (Pérez Garay 2010).

Es por ello que la determinación de la expresión de ST3Gal III y ST3Gal IV en muestras clínicas podría ser útil como marcadores del adenocarcinoma pancreático.

Dado que el suero es uno de los fluidos más fáciles de obtener de forma no invasiva en la práctica clínica asistencial y que recientemente se ha descrito la presencia de mRNA libre en plasma proveniente del tumor, la determinación del mRNA de ST3Gal III y Gal IV en plasma podría ser una técnica que permitiese determinar posibles cambios en la expresión de estas enzimas en pacientes con adenocarcinoma pancreático.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de diferentes parámetros séricos relacionados con la fisiopatología del adenocarcinoma pancreático y con la inflamación en pacientes con adenocarcinoma pancreático, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda, otras neoplasias gastrointestinales y controles sanos. Valorar la utilidad de estos parámetros, así como las posibles combinaciones entre los mismos, para determinar el nivel de aplicación como test analítico en el diagnóstico de pacientes con adenocarcinoma pancreático, o como diferenciación respecto a los otros grupos de pacientes.

Objetivos específicos.

1. Análisis de los niveles séricos del mRNA de las α 2,3 sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV en los grupos de pacientes con adenocarcinoma pancreático, pancreatitis crónica, o con otras neoplasias gastrointestinales así como en pacientes sanos.
2. Análisis de los niveles de distintos marcadores de fase aguda y la relación entre ellos (Proteína C reactiva, alfa-1-glicoproteína ácida (A1G), albúmina y Glasgow Prognostic Score) en los pacientes de los grupos descritos.
3. Análisis de los niveles de IGF-1, IGF-BP3, y el ratio molar IGF-1/ IGF-BP3 y de péptido C en los grupos de pacientes con adenocarcinoma pancreático, pancreatitis crónica, otras neoplasias gastrointestinales y controles sanos.
4. Comparar la especificidad y sensibilidad de los distintos parámetros analizados, con los marcadores utilizados actualmente en la práctica clínica para el diagnóstico/pronóstico del adenocarcinoma pancreático, y evaluar si los valores obtenidos permiten la diferenciación entre los grupos de estudio
5. Combinar los parámetros calculados y evaluar su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BÁSICO

Durante la realización de este trabajo se ha utilizado el material que se detalla en la tabla 5. La utilización de equipamiento más específico se detalla en la explicación de cada técnica en la cual se ha utilizado.

APARATO	MODELO	CASA COMERCIAL Y PAÍS
Agitador horizontal	Rotamax/Spiramix	Heildolf, Alemania
Agitador vortex	Genie 2	Scientific Industries, EEUU
Agitador roller	MOVIL-ROD	P-Selecta, España
Agitadores magnéticos	Agimatic-NM/ A-163	Selecta, España
Aparatos de ultrafiltración de agua	Milli-RO/ Milli-Q Elix 10/Milli-Q	Millipore, EEUU
Autoclave	AE-75	Raypa, España
Balanzas	FY-300; ER-120A/EK-410i	Salter, Japón/ AND, Japón
Baño de agua refrigerado	Tectron S-543	P-Selecta, España
Campana de flujo laminar	BIO 48M	Cultek, España
Baño seco digital	Accublock™D1200	Labnet internacional, NJ (EEUU)
Centrífuga de microtubos	Mikro 12-24	Sigma, España
Centrífuga de microtubos refrigerada	5415 R	Eppendorf, Alemania
Congelador -20°C/ Nevera 4°C	ExpressCool/ KF 5850SD	LG Electronics/ Miele Alemania
Congelador -80°C	Ultralow freezer	Nuaire, Japón
Espectrofotómetro	NanoDrop™ND-1000	Thermo Fisher Scientific, EEUU
Fuente de alimentación electroforesis	PowerPac300/EPS200/EPS3500XL	BioRad, EEUU/ Pharmacia Biotch, Suecia
Microondas	FM 1535E	Moulinex, Francia
Micropipetas	Gilson/ Eppendorf	Gilson, Francia/ Eppendorf, Alemania
Minicentrífuga	Sprout	Heathrow Scientific, EEUU
pH-metro	MicropH2000	Crison, España
Sistema de electroforesis	Mini Protean III	BioRad, EEUU
Separador magnético para tubos microcentrífuga	CS15000	Invitrogen, EEUU
Termociclador	My Cycler Thermal Cycler	BioRad, EEUU
Detector y amplificador de PCR a tiempo real	7300 Real time PCR system	Applied Biosystem, EEUU
Centrífuga placas PCR tiempo real	Centrifuge 5804R	Eppendorf, Alemania

Tabla 5: Equipamiento básico utilizado

2. SELECCIÓN DE PACIENTES

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona. Se ha obtenido consentimiento informado de los pacientes después de informarles del propósito del estudio (Anexo 1).

Es un estudio prospectivo, los pacientes han sido seleccionados por el equipo de Cirugía Hepática y el equipo de Gastroenterología del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta; también ha participado el equipo de Gastroenterología del Hospital de Santa Caterina de Salt (Girona).

Los controles han sido seleccionados de donantes sanos del Banco de Sangre y Tejidos del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona. Estos pacientes no estaban en ayunas.

Un segundo grupo de controles se ha seleccionado de pacientes sanos, en ayunas, que se han realizado una extracción de control en el Laboratorio del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona.

La selección de pacientes ha sido de manera consecutiva durante el período Febrero 2006-Julio 2011.

2.1 Grupos de estudio

En este estudio se distinguen dos grupos de pacientes, que se diferencian en cuanto a número de pacientes, aunque algunos de ellos son comunes a ambos grupos. En el primer grupo de pacientes se ha focalizado el estudio en la expresión de alfa 2,3-sialiltransferasas entre otros parámetros; y en el segundo grupo, se ha analizado IGF-1, IGFBP3 y otros parámetros relacionados, que requerían para su comparación disponer de pacientes con el mismo índice de masa corporal.

2.1.1 Grupo de pacientes de la primera parte del estudio.

Se han estudiado un total de 61 pacientes de ambos sexos y de edad superior a los 38 años distribuidos en 5 grupos:

- 0) Pacientes **adultos sanos** sin ninguna enfermedad pancreática diagnosticada, del mismo grupo de edad que los pacientes con adenocarcinoma de páncreas, no es necesario que sean del mismo sexo. Seleccionados en el Banco de Sangre y tejidos del Hospital Dr. Josep Trueta. (**n=9**)

La media de edad de este grupo ha sido 57 (50-64).

- 1) Pacientes con criterios clínicos diagnósticos de **pancreatitis aguda**. La media de edad de este grupo ha sido 70 (42-84) ; (**n=7**)
- 2) Pacientes adultos diagnosticados de **pancreatitis crónica**. Las muestras de este grupo se tomaron cuando no presentaban síntomas de brote agudo de la enfermedad. La media de edad de este grupo ha sido 54 (38-79); (**n=15**)
- 3) Pacientes adultos diagnosticados de **adenocarcinoma ductal de páncreas** (PDAC). Se incluyeron pacientes que se encontraban en distintos estadios de la enfermedad. La media de edad de este grupo ha sido 65 (45-93); (**n=21**)

En cuanto a los hallazgos quirúrgicos y clasificación anatomopatológica (Clasificación TNM UICC) de los 21 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático, no se obtuvo pieza quirúrgica de 7 pacientes por cardiopatía grave (1 paciente); presencia de metástasis en 4 pacientes; 2 páncreas irresecables. De los 21 pacientes uno (4.8%) se encontraba en estadio IIA, once (52.40%) en estadio IIB, tres (14.2%) en estadio III y seis (28.6%) en estadio IV.

- 4) Otras neoplasias gastrointestinales. La media de edad de este grupo ha sido 65(44-84). Este grupo está formado por pacientes con neoplasias del tracto gastrointestinal; la mayoría de ellos (7/9) son tumores periampulares, un tumor de recto y un tumor de klatskin (n=9).

Los tipos de tumores periampulares han sido:

- 3 ampulomas (adenocarcinoma de ampolla de Vater)
- 3 adenocarcinomas de duodeno
- 1 adenocarcinoma de colédoco intrapancreático

Se ha elegido este grupo de tumores para poder compararlos con los PDAC ya que se ubican en la misma región anatómica y además comparten ciertas características clínicas en su forma de presentación y en ocasiones no se pueden diferenciar durante el estudio preoperatorio con las técnicas de imagen.

2.1.2 Grupo de pacientes de la segunda parte del estudio.

Se han estudiado un total de 81 pacientes de ambos sexos y de edad superior a los 38 años distribuidos en 4 grupos:

- 0) Pacientes **adultos sanos** sin ninguna enfermedad pancreática diagnosticada, del mismo grupo de edad que los pacientes con adenocarcinoma de páncreas, no es necesario que sean del mismo sexo. Seleccionados de pacientes que se han realizado una analítica de control en el laboratorio del Hospital Dr. Josep Trueta (**n=15**). La media de **edad de este** grupo ha sido 61 (44-75).
- 1) Pacientes adultos diagnosticados de **pancreatitis crónica**. Las muestras de este grupo se tomaron cuando no presentaban síntomas de brote agudo de la enfermedad. La media de edad de este grupo ha sido 60 (44-79); (**n=12**).
- 2) Pacientes adultos diagnosticados de **adenocarcinoma ductal de páncreas** (PDAC). Se incluyeron pacientes que se encontraban en distintos estadios de la enfermedad. La media de edad de este grupo ha sido 64 (47-79); (**n=41**).

En cuanto los hallazgos quirúrgicos y clasificación anatomopatológica (Clasificación TNM UICC) de los 41 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático, uno (2.4%) se encontraba en estadio IB, uno (2.4%) en estadio IIA, veintiuno (51.3%) en estadio IIB, siete (17.1%) en estadio III y once (26.8%) en estadio IV.

- 3) **Otras neoplasias gastrointestinales**. La media de edad de este grupo ha sido 64 (44-80). Este grupo está formado por pacientes con neoplasias del tracto gastrointestinal; la mayoría de ellos (11/13) son tumores periampulares, dos neoplasias de páncreas no adenocarcinomas ductales (una neoplasia de células acinares y un adenocarcinoma medular) (**n=13**).

Se ha elegido este grupo de tumores para poder compararlos con los PDAC ya que se ubican en la misma región anatómica y además comparten ciertas características clínicas en su forma de presentación y en ocasiones no se pueden diferenciar durante el estudio preoperatorio con las técnicas de imagen.

2.1.3. Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con otras enfermedades malignas diagnosticadas o tratadas en los últimos cinco años.

En los pacientes con pancreatitis crónica se excluyeron aquellos que se encuentren en brote agudo de la enfermedad.

3. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA MUESTRA

Los **tipos de muestra** utilizados han sido: suero y plasma.

- La obtención de muestra de los pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas y otras neoplasias, se realizó antes de la intervención quirúrgica en el día de cirugía.
- Las muestras de donantes sanos, se obtuvieron en el Banco de Sangre del Hospital, antes de una donación de sangre.

La muestra del segundo grupo de controles se obtuvo antes de una extracción de control en el laboratorio del Hospital.

- Muestras de pacientes con pancreatitis crónica se obtuvieron aprovechando un control analítico prescrito por el digestólogo.
- Muestras de pacientes con pancreatitis aguda se obtuvieron durante su ingreso en el hospital aprovechando una extracción de control.

En todos los casos se obtuvieron 20-40 ml de sangre distribuidas en 3-4 tubos de 8 ml con EDTA K₃ como anticoagulante y 1 tubo de 8 ml con gel separador y un activador de la coagulación.

Las muestras con anticoagulante se centrifugaron rápidamente tras su obtención y las muestras de sangre para la obtención de suero se centrifugaron una vez producida la retracción del coágulo. La centrifugación de las muestras se realizó a 3500 rpm. A continuación se separó el plasma y el suero y se realizaron alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Las muestras no se volvieron a congelar después de su uso.

Para el análisis de la expresión de alfa2,3-sialiltransferasas, el proceso seguido tras la obtención de la muestra fue: a) extracción de mRNA que posteriormente b) se retrotranscribió a cDNA, y finalmente c) se amplificó y cuantificó por PCR a tiempo real para determinar la expresión de las alfa-2,3-sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV.

4. EXTRACCION DE mRNA

4.1 Primer ensayo evaluado.

Inicialmente para la extracción de mRNA plasmático se ensayó el kit *mRNA Isolation Kit for Blood /Bone Marrow* de Roche Diagnostics (Ref. 11 934 333 001), basado en la tecnología que utiliza partículas magnéticas. Indicado para aislar mRNA de sangre total y de médula ósea después de añadir reactivo estabilizante (*Reagent for Blood/Bone Marrow*; Ref 1 934 317) de Roche Diagnostics.

El método de extracción consta de dos etapas (Fig. 23): la primera consiste en la preparación de la fracción de ácidos nucleicos basándose en su capacidad para adsorberse de manera no específica a las superficies de sílice, y en una segunda fase el mRNA es purificado por su capacidad para hibridar a los oligo (dT) unidos a biotina y capturado por partículas magnéticas unidas a estreptavidina, seguido de una separación magnética.

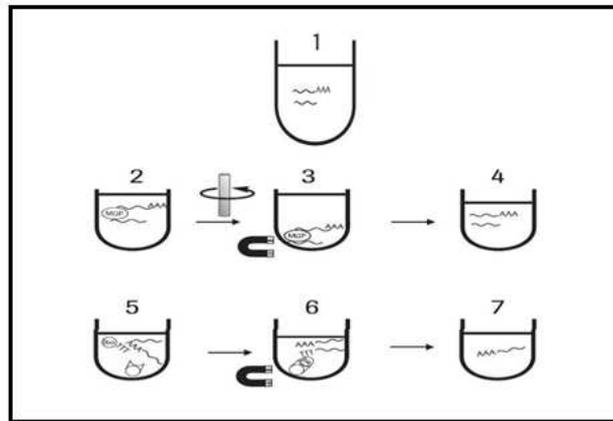


Figura 23: (1) Lisis y estabilización de los ácidos nucleicos con reactivo estabilizante; (2) Adición de partículas de sílice magnéticas (MGPs) a la muestra con reactivo estabilizante, tanto DNA como RNA se unen a las partículas durante el periodo de incubación; (3) Separación de las partículas magnéticas y eliminación mediante lavados del material que no se ha unido. (4) Elución de los ácidos nucleicos de las partículas magnéticas. (5): Captura del mRNA de los ácidos nucleicos totales con oligo(dT) unidos a biotina y partículas magnéticas cubiertas por estreptavidina (SMPs). (6) Separación de las SMP con separador magnético y eliminación por lavado del material no unido. (7) Elución del mRNA mediante lavado

4.2 Segundo ensayo: Dynabeads®.

Como método definitivo se ha utilizado el kit de Dynabeads® mRNA Direct de Invitrogen (Ref. 610.11), basado también en la formación de pares de bases A-T (Fig. 24).

Utiliza partículas magnéticas que llevan unidas covalentemente en su superficie Oligo (dT)₂₅. En condiciones adecuadas la cola poliA del mRNA se unirá a los oligo dT unidos a las partículas magnéticas. Este método utiliza como paso previo la adición de reactivo de lisis a la muestra de plasma, para inactivar las posibles RNAsas contenidas en la muestra, asegurando así el aislamiento del mRNA intacto.

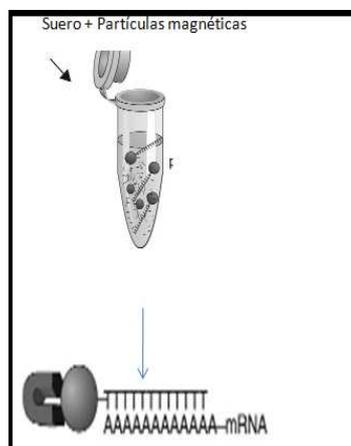


Figura 24: Esquema de la extracción del mRNA por el kit de Dynabeads

4.2.1 Extracción del mRNA plasmático: PROTOCOLO.

El protocolo utilizado para la EXTRACCIÓN DEL mRNA por el kit Dynabeads® mRNA Direct kit de, Invitrogen fue el siguiente:

Preparación de Dynabeads Oligo (dT)₂₅.

1. Resuspender las Dynabeads Oligo (dT)₂₅ en un *roller* o agitador rotatorio antes de su uso.
2. Poner en un separador magnético tantos tubos eppendorfs como muestras se tienen. Poner en cada eppendorf 100 µl de las Dynabeads resuspendidas.
3. Esperar 2 minutos para su separación. Eliminar el sobrenadante.
4. Añadir reactivo de lisis del kit (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM LiCl; 10 mM EDTA pH 8; 1% LiDS; 5 mM ditioneitol (DTT)) a cada tubo, lavar las partículas por resuspensión y mantener hasta su utilización.
5. Cuando la muestra está preparada para combinarla con las partículas magnéticas poner el tubo en el separador magnético y eliminar el sobrenadante.

Preparación de la muestra.

6. Descongelar las muestras 2 horas antes de su procesamiento a 2-8°C.
7. Añadir 3 ml de reactivo de lisis a cada ml de muestra.

Extracción de mRNA.

8. Eliminar el reactivo de lisis de las Dynabeads Oligo (dT)₂₅ lavadas.
9. Añadir las muestras con el reactivo de lisis.
10. Incubar con agitación continua en el agitador rotatorio o *roller* durante 10 minutos para permitir que las colas poliA del mRNA se unan a los oligo-dT de las partículas magnéticas.
11. Poner en separador magnético 2 minutos y eliminar completamente el sobrenadante. Hacerlo varias veces hasta separar toda la muestra.
12. Lavar 2 veces con 600 µl de solución de lavado A del kit (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M LiCl; 1 mM EDTA; 0.1% LiDS).
13. Lavar 3 veces con 300 µl solución de lavado B del kit (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M LiCl; 1 mM EDTA).
14. Resuspender el RNA procedente de un ml de muestra en 10 µl de agua DEPC (dietil-pirocarbonato). Poner rápidamente en hielo.

4.2.2 Modificaciones realizadas en el PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL mRNA (Dynabeads® mRNA Direct kit, Invitrogen).

Debido a que la cantidad de mRNA extraído era insuficiente para detectar posteriormente los genes de interés por PCR y para mejorar la calidad y cantidad del RNA extraído se utilizó el kit de Dynabeads® mRNA Direct (Invitrogen), realizando las siguientes modificaciones:

A cada ml de plasma se le añadieron 3 ml de Reactivo de Lisis y las muestras con las partículas magnéticas se incubaron 15 minutos con 200 µL de Dynabeads Oligo (dT) a temperatura ambiente en agitador “roller”; se realizaron 2 lavados con 600 µL de tampón de lavado A y 3 lavados con 300 µL de tampón de lavado B, al final de la extracción se eluyó el mRNA de las partículas con agua libre de RNAsas con una proporción del mRNA extraído en 2 ml de muestra inicial en 10 µL de agua DEPC.

5. RETROTRANSCRIPCIÓN A cDNA.

Se ha utilizado el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* de *Roche Diagnostics* (Ref. 04 896 866 001), con el enzima *Transcriptor reverse transcriptase* que presenta un amplio rango de detección, de un pequeño número a un elevado número de copias, de RNA transcrito *in vitro*. El enzima es capaz de generar largas cadenas de cDNA (hasta 14 kb) y puede usarse a temperaturas mayores de 65°C. Se utilizó el cebador *anchored oligo-(dT)₁₈* que se une al principio de la cola de poliA del mRNA, evitando que se produzcan uniones en lugares internos de la cola de poliA.

Para poder amplificar y cuantificar mediante PCR, el mRNA extraído es necesario su paso a cDNA ya que el mRNA es sensible a las temperaturas elevadas y no se puede hacer PCR directamente desde mRNA. Por ello antes de realizar la amplificación y cuantificación por PCR se realiza una transcripción reversa o retrotranscripción (RT) del RNA a DNA.

La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA), el cual es estable al calor y puede ser amplificado por la Taq polimerasa.

5.1. Puesta a punto de la técnica de Retrotranscripción.

El mRNA se retrotranscribió con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche Diagnostics) utilizando el Procedimiento B descrito en el kit: síntesis de cDNA con *primers anchored-oligodT* y random hexamer, y se desnaturalizó la mezcla 10 minutos a 65°C. A continuación se describe el protocolo utilizado:

5.1.1. Protocolo de transcripción reversa de mRNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit, Roche Diagnostics)

- En tubo estéril en hielo preparar la mezcla de muestra y cebador en el orden siguiente: 10 µl de muestra de mRNA (1-100 ng poly(A)⁺ RNA), 1 µl de cebador *Anchored-oligo(dT)₁₈* y 2 µl de cebador *Random Hexamer*.
- Desnaturalizar esta mezcla de *template-cebador* 10 minutos a 65°C en bloque térmico para desnaturalizar estructuras secundarias de RNA.
- Poner en hielo.
- Añadir los componentes de la RT mix: 4 µl de Buffer de reacción Transcriptor reverse transcriptasa, 0.5 µl de Inhibidor de RNAsas, 2 µl de Mix de Desoxinucleótidos y 0.5 µl de Transcriptasa reversa.
- Incubar la mezcla 10 minutos a 25°C, 30 minutos de incubación a 55°C.
- Inactivar la transcriptasa reversa a 85°C durante 5 minutos.
- Parar la reacción poniendo el tubo en hielo.
- Guardar la muestra a -15—25°C para su posterior uso.

6. PCR A TIEMPO REAL (real time PCR): EXPRESIÓN DE Sialiltransferasas

La Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase chain reaction* PCR), puesta a punto por K. B. Mullis (Mullis y Faloona, 1987) es una técnica capaz de generar grandes cantidades de un fragmento de DNA, a partir de cantidades mínimas del mismo. Es un método diseñado para producir la amplificación selectiva en una magnitud de 10⁶, de una determinada secuencia de DNA (DNA diana). La técnica requiere el uso de dos cebadores oligonucleotídicos (*primers*) complementarios a las secuencias situadas en

los extremos del fragmento de DNA que se desea amplificar. Se basa en el desarrollo de ciclos repetidos de desnaturalización de la doble hebra de DNA por calor, la hibridación de los dos cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de DNA por la acción de una DNA polimerasa. Un ciclo está formado por tres etapas: desnaturalización (*denaturation*), hibridación (*annealing*) y extensión. El inconveniente que presenta la PCR clásica es que no es una técnica cuantitativa.

En la PCR a tiempo real se puede detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de los ciclos. Se fundamenta en la utilización de un termociclador que incorpora un fluorímetro, que permite detectar la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al DNA. La monitorización de esta fluorescencia permite analizar la cinética de la PCR en cada ciclo (a más moléculas amplificadas más fluorescencia detectada) (Fig. 25). La importancia radica en que es una técnica cuantitativa.

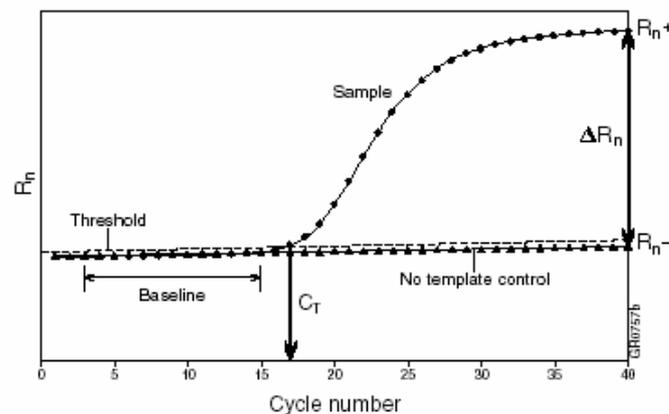


Figura 25: Curva de fluorescencia obtenida en una PCR a tiempo real en la que se representa el incremento de señal fluorescente frente al número de ciclos.

En la reacción de PCR a tiempo real se distinguen 3 fases: una fase inicial donde la señal corresponde al ruido de fondo (*background*), una fase de crecimiento exponencial (donde la fluorescencia es proporcional al logaritmo de la cantidad de producto) y una última fase denominada *plateau*.

La primera fase dura hasta que la señal del producto de la PCR aumenta por encima del ruido de fondo de la reacción.

La fase de crecimiento exponencial comienza cuando existe suficiente producto para ser detectado por encima del ruido de fondo y finaliza cuando la eficiencia de la reacción cae, comenzando la fase de saturación o *plateau*.

La información cuantitativa se obtiene de la fase exponencial. Así la fluorescencia es proporcional a la cantidad del producto de la amplificación.

Presenta una gran sensibilidad que permite la amplificación y cuantificación de secuencias específicas de DNA, cDNA o RNA mediante la determinación del primer ciclo de la PCR en la que se detecta producto amplificado. Esta es la principal diferencia con la PCR convencional donde la cuantificación del DNA diana resulta complicada ya que la eficacia va disminuyendo con el tiempo y la cantidad obtenida no suele guardar mucha relación con la concentración inicial de DNA en la muestra.

En los ciclos iniciales no existen cambios en la señal de fluorescencia y se define la línea de base (*baseline*) para la curva de amplificación. Cuando la fluorescencia empieza a aumentar sobre la línea de base, está indicando la detección del producto acumulado de la PCR, lo que permite fijar el umbral de detección de fluorescencia justo por encima de la línea base. El parámetro **Ct** (*threshold cycle*) se define como el ciclo de la PCR en el que la fluorescencia supera el umbral fijado y es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA diana presente en la muestra. En la PCR cuantitativa, a cada muestra amplificada se le asigna un Ct determinado (primer ciclo en el que se detecta fluorescencia) en función de la cantidad de DNA que contenga.

En la PCR a tiempo real la amplificación y detección por fluorescencia se realizan de manera simultánea. La medición de la cantidad de fluorescencia se realiza de forma continua, proporcionando información dinámica en tiempo real. Así se puede establecer el ciclo umbral Ct, es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que se haya fijado, lo que a su vez correlaciona con la cantidad de DNA de la secuencia diana.

Sondas de hibridación fluorescentes específicas.

Son sondas específicas para cada secuencia diana que se quiera amplificar. Están marcadas con dos tipos de fluorocromos, uno en cada extremo, un emisor (*reporter*) en el extremo 5' y un extintor (*quencher*) en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, en ausencia de la secuencia diana, la energía de excitación producida por el fluoróforo emisor es absorbida por el extintor impidiendo la generación de fluorescencia. Este sistema tiene una gran especificidad ya que para obtener señal de fluorescencia es necesario que exista hibridación específica entre la sonda y la secuencia diana a amplificar.

Las sondas más utilizadas fueron las sondas TaqMan®. Se basan en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante PCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan®, FAM™) que hibrida con la secuencia diana.

Durante la fase de anclaje (*annealing*) de la PCR, tanto la sonda como los cebadores hibridan sobre la cadena complementaria, si ésta se halla presente. La sonda está diseñada para unirse a una secuencia específica del DNA diana entre los cebadores *forward* y *reverse*. (Fig. 26)

A medida que se desarrolla la PCR y en la fase de extensión, la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa hidroliza la sonda, desplazando el fluorocromo *reporter* (Fig. 26). Al quedar lejos de la influencia del fluorocromo *quencher*, la fluorescencia emitida por el *reporter* se podrá detectar.

El proceso de degradación de la sonda se produce en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de la PCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción.

La *Taq polimerasa* no digiere la sonda libre, sólo la hibridada, y cuanto mayor es el número de moléculas mayor es la fluorescencia amplificada, más fluorocromo *reporter* se libera generando una mayor emisión. La cantidad de señal fluorescente emitida y de luz detectada son directamente proporcionales a la cantidad de DNA amplificado.

El incremento de la señal de fluorescencia se detecta exclusivamente si existe amplificación de la región complementaria a la sonda desplazada, es por tanto una detección ampliamente específica.

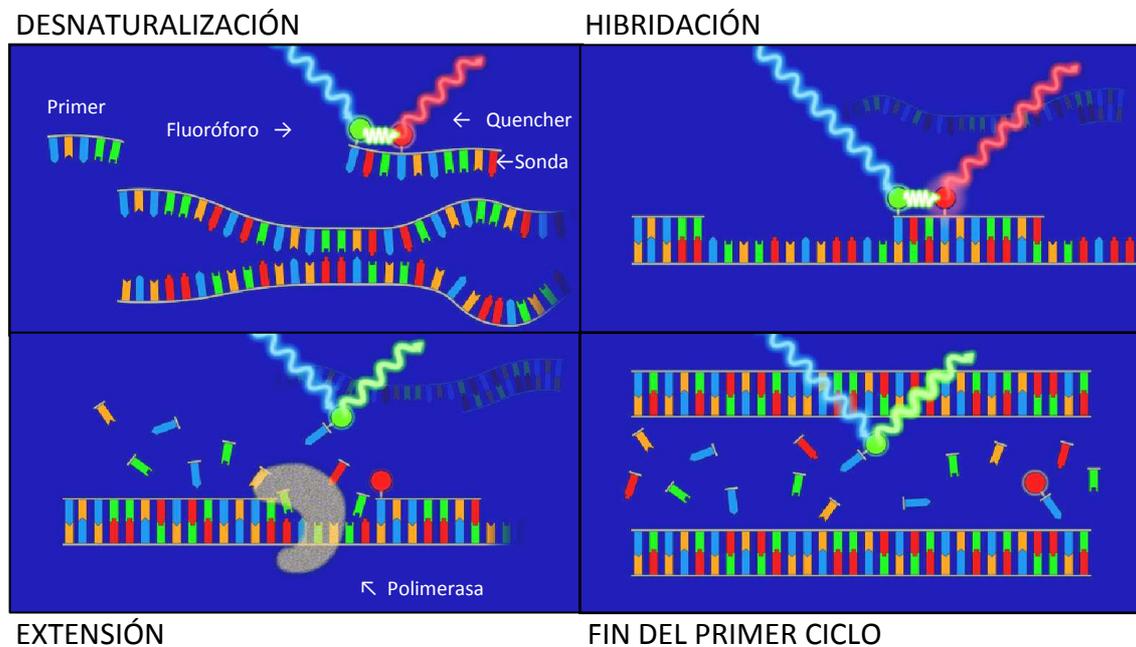


Figura 26: Esquema de las distintas fases de la PCR a tiempo real utilizando sondas Taqman.

6.1 Cuantificación mediante PCR a tiempo real.

Se puede cuantificar un gen de interés de manera absoluta o relativa. La cuantificación absoluta obtiene la cantidad absoluta del gen de interés o gen diana, expresada como número de copias y se utiliza cuando se dispone de muestra estándar.

En la relativa, la cantidad se expresa en relación con una muestra base.

En ambos tipos de cuantificación se amplifica también un gen de referencia o endógeno, un gen de expresión constitutiva (*housekeeping gene*), que permite normalizar la cantidad de muestra.

Cuantificación relativa.

En este trabajo como no se disponía de un estándar de concentración conocida, se ha realizado cuantificación relativa de las sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV. Para ello se determina la relación entre la cantidad del gen problema y la de un gen de

referencia que ha sido la β -actina, en cada una de las muestras problema. Se amplifican ambos genes para cada muestra y el valor normalizado se compara con el normalizado de una muestra estándar; se ha utilizado una muestra de un paciente con elevada concentración de mRNA libre en plasma como estándar.

Cuantificación relativa con eficiencias de amplificación diferentes.

Para realizar cuantificación relativa deben obtenerse curvas estándar tanto para el gen diana como para el gen de referencia.

Se realizan una serie de diluciones del cDNA de una muestra control, se lleva a cabo la PCR a tiempo real y se determinan los valores de Ct

Se construyen por separado las curvas estándar del gen diana y del gen de referencia, representando los valores de Ct (eje Y) y los del logaritmo de la muestra de partida o dilución (eje X). Así se obtiene la ecuación de la recta con el valor de la pendiente para cada curva.

Se determinan los valores de Ct para las muestras problema. Estos valores de Ct se sustituyen por la incógnita y en la ecuación de la recta correspondiente a cada gen. El valor obtenido (x) es la cantidad inicial de la muestra problema. Este cálculo se realiza para ambos genes utilizando la recta correspondiente a cada gen. Para obtener el valor normalizado, se divide la cantidad del gen diana por la del gen de referencia.

El **protocolo térmico estándar** utilizado fue para todas las PCRs: 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C de 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

Todos los datos fueron procesados y analizados con el Software 7300 SDS 1.3.1 (Applied Biosystems). Para cada dilución de muestra se obtuvo el incremento logarítmico de la señal fluorescente (+Rn). El +Rn threshold se situó a 0.02 para obtener los correspondientes valores de Ct (threshold cycle). La concentración relativa del gen diana y del gen de referencia fue calculada por interpolación en las correspondientes curvas estándar. El gen endógeno (housekeeping) β -actina se usó para normalizar los resultados. Para estimar la variabilidad intraensayo se realizaron 3 réplicas para cada muestra y gen. Los resultados se expresaron como la media \pm SD de la abundancia relativa de ST3Gal III y IV transcrito normalizada con la β -actina correspondiente.

6.2 Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real.

Las secuencias de cebadores y sondas para β -actina y ST3Gal III fueron de *Custom Taqman Gene Expression Assays*TM. Para ST3Gal IV (referencia Hs00920871_m1) se utilizaron sondas y cebadores de *Taqman Predesigned Gene expression Assays*TM de Applied Biosystems-Applera Hispania SA Spain. Los cebadores y sondas de ST3Gal III fueron diseñados específicamente en regiones altamente conservadas de humanos y rata (posición 318 o 330).

Todas las PCRs fueron realizadas en placas ópticas de 96 pocillos con el ABI PRISM 7300 Sequence detector System en un volumen total de 20 μ l conteniendo 9 μ l de cDNA diluido en agua libre de RNAsas, 10 μ l de Taqman[®] *Universal Master Mix No Amperase*[®] *UNG* y 1 μ l de del correspondiente Taqman Gene Expression Assays.

7. DETECCIÓN DE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS

Los parámetros que se indican a continuación relacionados con los procesos neoplásicos y procesos inflamatorios, han sido determinados en suero.

7.1. Antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9)

El antígeno carbohidrato CA 19.9 se ha determinado por el Inmunoensayo automatizado tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), (Ref. 11776193 122), en el Modular Analytics E170 de Roche Diagnostics.

El CA 19.9 es el único marcador tumoral que se utiliza actualmente en el seguimiento de las neoplasias de páncreas y monitorización del tratamiento. No presentan una sensibilidad y especificidad muy elevadas ya que también se eleva en otras patologías gastrointestinales tanto neoplásicas como no neoplásicas. El inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA), consiste en una técnica sándwich que utiliza un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-CA 19.9 y otro anticuerpo monoclonal específico anti CA 19.9 (Fig. 27), marcado con un quelato de rutenio formándose un complejo tipo sándwich, posteriormente se añaden micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. Finalmente por una reacción electroquimioluminiscente se determina la cantidad de CA 19.9 presente en la muestra.

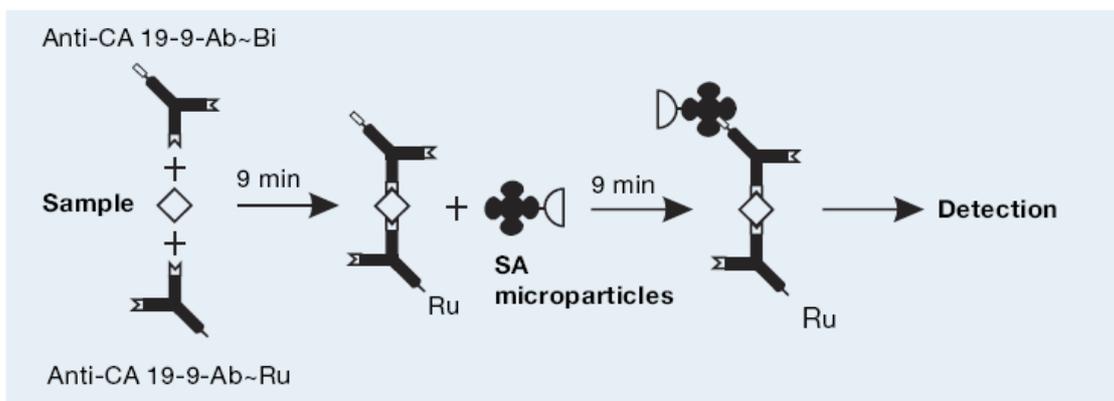


Figura 27: Ensayo electroquimioluminiscente tipo sándwich para la determinación del CA 19.9

Este método presenta una precisión con coeficientes de variación inferiores al 10 % y la sensibilidad del método es de 0.60 U/ml. Los valores de referencia son 0-37 U/ml

7.2 Antígeno carcinoembrionario (CEA)

Para la determinación del antígeno carcinoembrionario se ha utilizado un Inmunoensayo tipo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECLIA), (Ref.04491777 190), en el Modular Analytics E170 de Roche Diagnostics.

El inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA), consiste en una técnica sándwich que utiliza un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-CEA y otro anticuerpo monoclonal específico anti CEA marcado con un quelato de rutenio, formándose un complejo tipo sándwich. Posteriormente se añaden micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. Finalmente por una reacción electroquimioluminiscente se cuantifica la cantidad de CEA presente en la muestra.

Los valores de precisión de este método son inferiores al 5 % y la sensibilidad del método es de 0.20 ng/ml. Los valores de referencia son de 0.2-4.3 ng/ml.

7.3 ALBÚMINA

La determinación de la albúmina se ha realizado por el método colorimétrico del verde de bromocresol (Ref. 04995805 022) en el sistema automático Cobas 711 (Roche Diagnostics).

La albúmina se considera un marcador negativo de fase aguda (Kushner, 2011). La precisión del ensayo presenta coeficientes de variación inferiores a 1.5%, el límite de detección es de 0.6 g/dl. Los valores de referencia son de 3.5-5 g/dl.

7.4 PROTEÍNA C REACTIVA

La proteína C reactiva se ha determinado por un método inmunoturbidimétrico potenciado con partículas de látex (Ref.04932676 022) en el sistema automático Cobas 711 (Roche Diagnostics). La proteína C reactiva de la muestra se aglutina con las partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-proteína C. El precipitado se determina por turbidimetría. Las unidades con las que se expresan los resultados son mg/dl.

La PCR es una proteína de fase aguda. En el ensayo utilizado, la proteína C reactiva de la muestra se aglutina con las partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-proteína C. El precipitado se determina por turbidimetría. Las unidades con las que se expresan los resultados son mg/dl. La precisión del ensayo presenta coeficientes de variación inferiores a 2.5 y una sensibilidad de 0.1 ng/ml. Los valores de referencia son: 0.1-0.5 mg/dl.

7.5 ALFA 1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (A1G)

La determinación de la alfa 1 glicoproteína ácida se ha realizado por nefelometría en el Nefelómetro Image de Beckman Coulter con el reactivo Alpha1-Acid glycoprotein (Ref. 447780).

La alfa 1 glicoproteína ácida es una proteína altamente glicosilada, cada molécula presenta 5 sitios de glicosilación por lo que puede presentar distintas glicoformas con distinto número de ramificaciones glicosiladas y se eleva en distintos procesos inflamatorios. El aumento de una glicoforma u otra será en función de la patología. Es también una proteína de fase aguda. Los valores de referencia son: 51-117 mg/dl.

7.6 FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA 1 (IGF-I)

Para la determinación del factor de crecimiento insulinoide se ha utilizado el ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida del analizador automático Immulite 2000 (Fig. 28) (Ref. L2KGF2).

La medida de IGF-I en suero es compleja ya que circula unido a proteínas transportadoras y a ácidos lábiles. (Daughaday WH, Rotwein P, 1989; Baxter, 1989). Los ensayos para su cuantificación requieren un tratamiento previo con ácido que libere la molécula de IGF-I asegurando una cuantificación exacta. (Daughaday WH, Rotwein P, 1989). El método utilizado realiza el pretratamiento con ácido en la fase de dilución automática. Este ensayo presenta coeficientes de variación intra e interensayo inferiores al 10% y la sensibilidad analítica es de 20 ng/ml. Los valores de referencia en adultos según la edad se encuentran en la tabla 6.

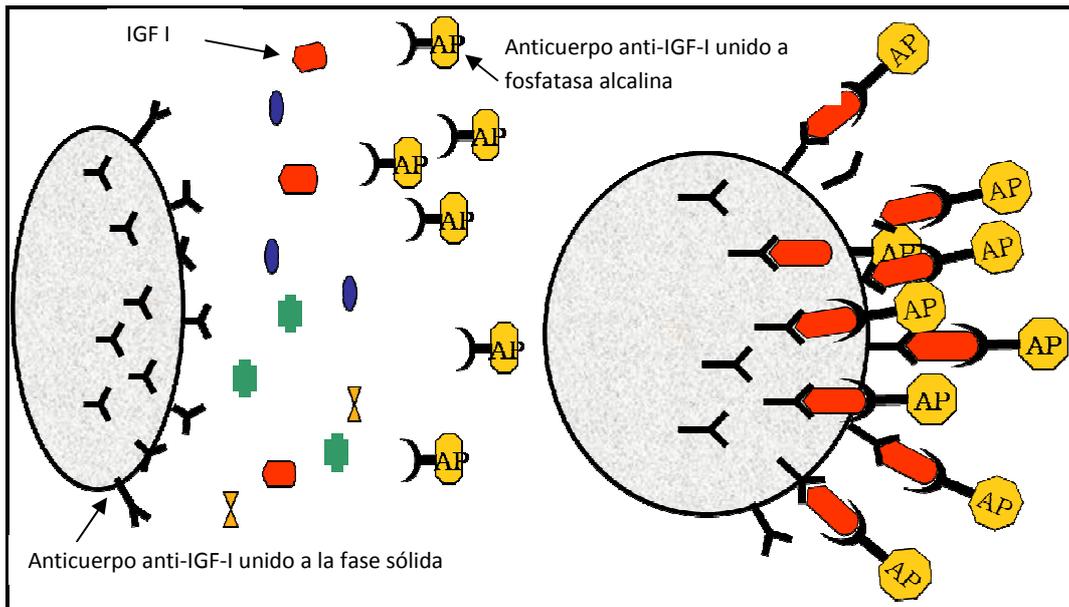


Figura 28: Ensayo quimioluminiscente Immulite 2000: En el reactivo existen bolas unidas a anticuerpos anti-IGF-I, se añaden al tubo de reacción, se añade la muestra problema también se añade otra parte del reactivo el IGF-I presente en la muestra se une a los anticuerpos unidos a la bola y los anticuerpos unidos a fosfatasa alcalina se une a otro epitopo de la molécula de IGF-I. Tras un lavado se elimina la fracción no unida, posteriormente se añade substrato quimioluminiscente, el cual por la acción de fosfatasa alcalina va a ser hidrolizado produciendo reacción luz, la cantidad de radiación lumínica será proporcional a la cantidad de IGF-I en la muestra.

Años	Mediana (ng/ml)	Rango Central 95% en ng/ml
21 – 25	203	116 – 358
26 – 30	196	117 – 329
31 – 35	188	115 – 307
36 – 40	176	109 – 284
41 – 45	164	101 – 267
46 – 50	154	94 – 225
51 – 55	144	87 – 238
56 – 60	135	81 – 225
61 – 65	126	75 – 212
66 – 70	118	69 – 200
71 – 75	110	64 – 188
76 – 80	102	59 – 177
81 - 85	95	55 - 166

Tabla 6: Rangos de referencia de IGF-1 en adultos con el ensayo Immulite 2000 (ng/ml)

7.7 PROTEÍNA TRANSPORTADORA 3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGFBP-3)

Para la determinación de la proteína transportadora del factor de crecimiento tipo insulina se ha utilizado el ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida marcado enzimáticamente del analizador automático Immulite 2000 (Fig. 28) (Ref. L2KGB2).

Este ensayo presenta coeficientes de variación intra e interensayo inferiores al 10% y la sensibilidad analítica es de 0.1 µg/ml.

Los márgenes de referencia en los distintos rangos de edad para el ensayo immulite se presentan en la tabla 7.

Años	Mediana (µg/ml)	Rango Central 95% en ng/ml
21 – 25	5.1	3.4-7.8
26 – 30	5.2	3.5-7.6
31 – 35	4.9	3.5-7.0
36 – 40	4.8	3.4-6.7
41 – 45	4.7	3.3-6.6
46 – 50	4.7	3.3-6.7
51 – 55	4.8	3.4-6.8
56 – 60	4.8	3.4-6.9
61 – 65	4.6	3.2-6.6
66 – 70	4.3	3.0-6.2
71 – 75	4.0	2.8-5.7
76 – 80	3.5	2.5-5.1
81 - 85	3.1	2.2-4.5

Tabla 7: Márgenes de referencia de IGFBP3 en adultos con el ensayo Immulite 2000 (µg/ml)

7.8 HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

La determinación de la hormona de crecimiento se ha realizado mediante el ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida del Immulite 2000 (Fig. 28) (Ref. L2KGRH2).

La fase sólida (bola) está recubierta con anticuerpo monoclonal de ratón anti-GH. La fase líquida consiste en fosfatasa alcalina (de intestino bovino) conjugada con anticuerpo monoclonal de conejo anti-GH. La muestra del paciente y el reactivo se incuban junto a la bola recubierta. Durante este tiempo, la GH de la muestra forma complejos tipo sándwich. El conjugado enzimático no unido se elimina mediante lavados por centrifugación. Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente al tubo de reacción que contiene la bola, generándose una señal proporcional a la enzima unida.

El ensayo presenta una sensibilidad analítica de 0.01 ng/ml, los coeficientes de variación intra e interensayo son inferiores al 7%.

Los valores de referencia de péptido C son 0-3 ng/ml en hombres y 0-8 ng/ml en mujeres.

7.9 PÉPTIDO C

El ensayo utilizado para la medida de péptido C ha sido un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida del Immulite 2000 (Fig. 28) (Ref. L2KPEP2)

La fase sólida está recubierta con anticuerpo monoclonal murino anti- Péptido-C. La fase líquida consiste en fosfatasa alcalina (de intestino bovino) conjugada con anticuerpo monoclonal murino anti-péptido-C en solución tampón. La muestra del paciente y el reactivo se incuban junto a la bola recubierta. Durante este tiempo, el péptido-C de la muestra forma complejos tipo sándwich con el anticuerpo monoclonal murino anti-péptido-C de la bola y el enzima conjugado con anticuerpo monoclonal murino anti-péptido-C del reactivo. Después, la muestra del paciente y el conjugado enzimático no unidos se eliminan mediante lavados por centrifugación. Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente al tubo de reacción que contiene la bola generándose una señal proporcional a la enzima unida.

El ensayo presenta una sensibilidad analítica de 0.08 ng/ml, los coeficientes de variación intra e interensayo son inferiores al 5%.

Los valores de referencia de péptido C son 0.9 – 7.1 ng/ml.

7.10 Glasgow Prognostic Score

El GPS se ha calculado como Forrest describió previamente (Forrest, 2003) utilizando una escala con valores de 0, 1 y 2. Pacientes con Proteína C Reactiva elevada (superior a 1 mg/dl) e hipoalbuminemia (inferior a 3.5 g/dl) se le asigna un valor de 2. Pacientes en los cuales sólo uno de estos parámetros este alterado se le asigna score de 1. Pacientes en los cuales ninguno de estos valores está alterado se le asigna valor de 0.

8. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

8.1. Estadística analítica

Para la comparación de variables cuantitativas en primer lugar se evaluó si presentaban una distribución normal. Al ser todas las variables cuantitativas del estudio no normales, se ha utilizado el test estadístico no paramétrico test U de Mann-Whitney para comparar medianas.

Se han utilizado diagramas de cajas para representar los niveles de las moléculas estudiadas. En estos diagramas se representa la mediana de los valores, la parte el percentil 75% y el percentil 25%. Los bigotes de las cajas van desde el extremo superior al valor máximo y desde el extremo inferior al valor mínimo, lo que indica el grado de dispersión de los valores.

En el caso de comparar dos variables cualitativas, se utilizó el test de Chi-Cuadrado. Cuando el valor esperado era menor de 5 en alguna de las casillas de la tabla de contingencia, fue necesario utilizar el test exacto de Fisher.

Se consideraron como significativos valores de $p < 0.05$.

También se han utilizado las curvas ROC para el cálculo de los parámetros de los posibles marcadores.

8.2. Procesos de datos

El proceso y análisis de datos se realizó con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows. Para el análisis de curvas ROC de los parámetros individuales y combinados se ha utilizado el paquete estadístico R versión 2.10.1 y para el análisis de curvas ROC

de marcadores individuales los valores del cut-off se han calculado con el programa SPSS.

Los valores de sensibilidad, especificidad de marcadores individuales se ha calculado con el programa SPSS mientras que cuando se combinaron distintos marcadores se utilizó el programa estadístico R.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: EXTRACCIÓN DE mRNA LIBRE EN PLASMA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SIALILTRANSFERASAS

I.1 Extracción de mRNA

Para determinar los niveles de mRNA de las enzimas sialiltransferasas en sangre es necesario realizar un paso previo de extracción del mRNA libre del plasma, el cual se encuentra en pequeñas cantidades. Por ello, al comienzo de este trabajo se evaluó qué técnica utilizar, ya que no existen kits comerciales específicos para tal propósito.

Primer ensayo evaluado

En primer lugar se evaluó la eficiencia del Kit, *mRNA Isolation for Blood/Bone Marrow de Roche Applied Science*, basado en la capacidad de los ácidos nucleicos de adsorberse de manera inespecífica a partículas de sílice. En un segundo paso se realizó una purificación mediante hibridación a oligo-dT marcados con biotina y captura mediante partículas magnéticas cubiertas con estreptavidina seguido de una separación magnética.

Se analizaron diversas muestras, después de la extracción de mRNA, éste se retrotranscribió a cDNA y finalmente se realizó PCR tradicional y un gel para detectar la amplificación del gen de interés (ST3 Gal III), pero sólo se obtuvo resultado para una muestra y el proceso no presentó reproducibilidad.

Se realizaron nuevas extracciones, y para amplificar y detectar el gen de interés se utilizó PCR a tiempo real. Se determinó la presencia de mRNA del gen constitutivo pero a valores de Ct demasiado elevados (superiores a 35) que indicaban una baja cantidad de mRNA plasmático. Ello puede ser debido a que dicho kit, utiliza gran proporción de reactivo estabilizante, ya que está ideado para extraer mRNA de muestras de sangre total y médula ósea que contienen niveles sensiblemente mayores de mRNA que el que se encuentra libre en plasma.

Segundo ensayo evaluado

Como con el método anterior no se obtuvo suficiente mRNA, se evaluó un segundo ensayo, el kit *Dynabeads® mRNA Direct* (Invitrogen), con el que se obtuvo suficiente mRNA y de calidad adecuada para poder cuantificar posteriormente por PCR a tiempo real. Los valores de Ct para el gen constitutivo eran del orden de 27-35, dependiendo de la muestra.

Estos Ct elevados probablemente eran debidos a la poca cantidad de mRNA extraído. Se evaluó que tipo de muestra proporcionaba mejores resultados: suero o plasma; los mejores resultados se obtuvieron con plasma EDTA, ya que la muestra se puede centrifugar y congelar rápidamente tras la extracción sanguínea, mientras que para la obtención del suero hay que esperar hasta la formación del coágulo antes de la centrifugación.

Para intentar mejorar el rendimiento, el método se optimizó y en la etapa final de la extracción, se resuspendió el mRNA obtenido de dos extracciones de 1 ml en 10 μ l, obteniendo así el mRNA doblemente concentrado que en la extracción inicial. De cada muestra realizamos extracción de 4 ml de plasma. Los valores de Ct para el gen constitutivo fueron del orden de 19-34.

Este método con la optimización posterior es el que se ha escogido para la obtención y cuantificación de los genes de interés.

I.2 Reproducibilidad de la determinación de los niveles de mRNA en plasma

Debido a que el proceso, desde la obtención de la muestra hasta la determinación de la expresión de los genes de interés por real-time PCR, consta de varias etapas: extracción de mRNA, retrotranscripción a cDNA, y cuantificación por real time-PCR, se determinó la variabilidad intra e inter ensayo, para valorar la reproducibilidad del método.

Para valorar la **variabilidad intraensayo** se analizaron las muestras por triplicado dentro de un mismo ensayo. Las tres replicas no presentaban en general variabilidades superiores al 10%, y el valor que se calculaba correspondía a la media de las tres. En el

caso que una de ellas presentase una variabilidad superior al 10% respecto a las otras dos se eliminaba del cálculo.

Para la valoración de la **variabilidad interensayo** se analizaron las muestras en dos experimentos independientes que comprenden las etapas de extracción del mRNA plasmático, retrotranscripción y real time PCR. La variabilidad oscila entre el 1-15% aproximadamente, siendo de valores entre el 0.3-1.5% para muestras con niveles mayores de mRNA (Cts de 25 a 30) y entre el 5-15% para muestras con niveles menores (Cts de 27-30). Se observa una variabilidad mayor en las muestras que presentan menor cantidad de mRNA de las sialiltransferasas.

I.3 Curvas de cuantificación relativa de la expresión de ST3GAL III, ST3GAL IV y β -ACTINA

Se obtuvieron curvas estándar de β -Actina (Fig. 29), ST3Gal III (Fig. 30) y ST3Gal IV (Fig. 31) a partir de la muestra de un paciente con elevados niveles de mRNA, para poder realizar la cuantificación relativa de los genes del estudio.

Se realizaron diluciones seriadas del cDNA de la muestra de dicho paciente, se efectuó la PCR a tiempo real y a partir de los valores de Ct obtenidos, se construyeron las curvas por separado, representando los valores de Ct (eje Y) y los del logaritmo de la muestra de partida o dilución (eje X). Así se obtuvo la ecuación de la recta con el valor de la pendiente para cada curva.

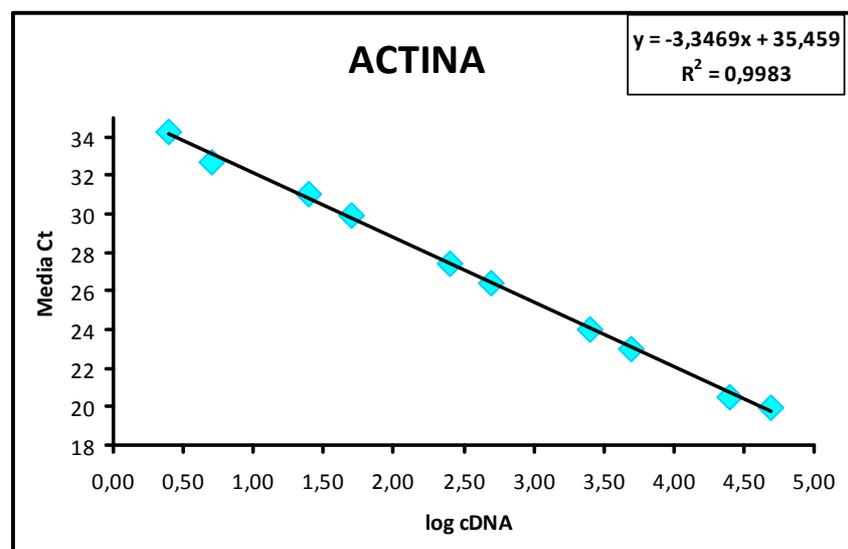


Figura 29: Curva estándar de β -Actina

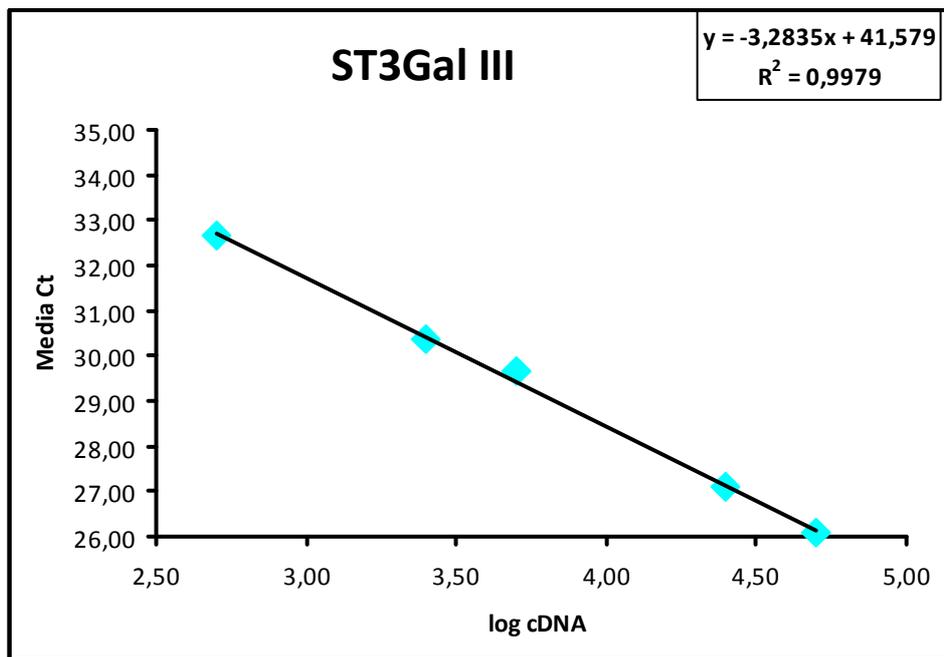


Figura 30: Curva estándar de ST3Gal III

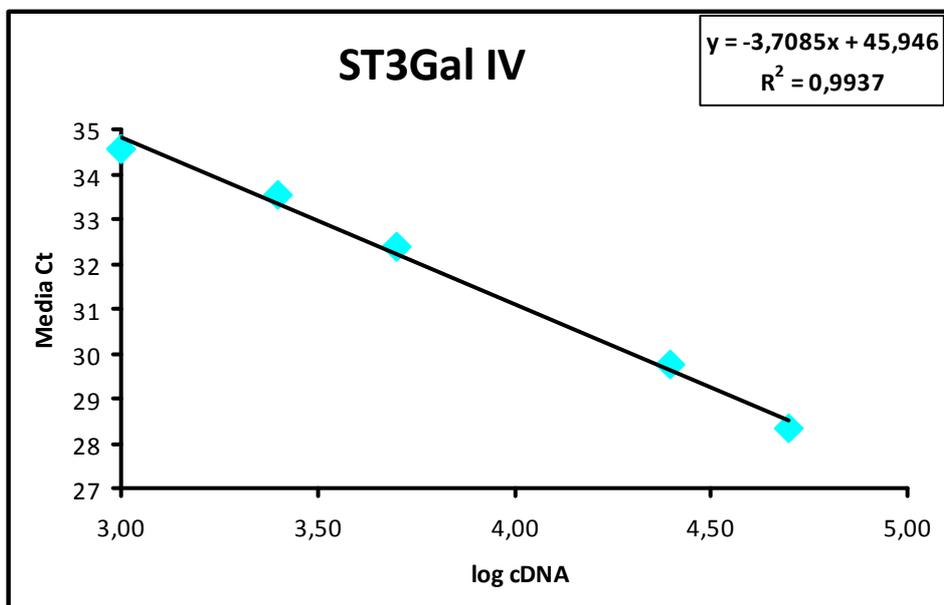


Figura 31: Curva estándar de ST3Gal IV

I.4 Determinación de expresión de ST3GAL III y ST3GAL IV en plasma

La determinación de los genes de las sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV, así como del gen constitutivo β -actina se realizó para los primeros 61 pacientes incorporados al primer grupo del estudio y que correspondieron a 7 pancreatitis agudas, 15 pancreatitis crónicas, 21 adenocarcinomas pancreáticos (PDAC), 9 neoplasias digestivas y 9 controles sanos. (Tabla 8)

De los **9 controles**, ninguno presentó niveles detectables de los genes de las sialiltransferasas. En seis se detectó el gen constitutivo (β -actina) pero no los genes ST3Gal III y ST3Gal IV, mientras que en tres no se detectó ninguno de los genes (Tabla 8).

De las **7 pancreatitis agudas**, en cuatro se detectó la expresión del gen constitutivo, β -actina, pero no los genes ST3Gal III y ST3Gal IV, en dos se detectó β -actina, ST3Gal III y ST3Gal IV, y una presentó expresión de β -actina y ST3Gal III pero no de ST3Gal IV. (Tabla 8).

De las **15 pancreatitis crónicas**, en nueve se detectó el gen constitutivo β -actina, pero no los genes ST3Gal III y ST3Gal IV, tres presentaron detección de β -actina, ST3Gal III y ST3Gal IV, y tres presentaron detección de β -actina y ST3Gal III pero no de ST3Gal IV (Tabla 8).

De los **21 adenocarcinomas pancreáticos (PDAC)**, tres presentaron mRNA libre en plasma del gen constitutivo β -actina pero no de los genes ST3Gal III y ST3Gal IV, trece presentaron mRNA libre en plasma detectable de β -actina, ST3Gal III y ST3Gal IV y cinco presentaron mRNA libre en plasma detectable de β -actina y ST3Gal III pero no de ST3Gal IV (Tabla 8).

De las **9 neoplasias digestivas** que no corresponden a adenocarcinomas pancreáticos, una presentó mRNA libre en plasma, del gen constitutivo β -actina pero no de los genes ST3Gal III y ST3Gal IV, siete presentaron mRNA libre en plasma detectable de β -actina, ST3Gal III y ST3Gal IV y una presentó mRNA libre en plasma detectable de β -actina y ST3Gal III pero no de ST3Gal IV (Tabla 8).

La presencia e integridad del RNA en plasma se confirma por la detección de genes constitutivos, por ello los casos en los cuales no se detectó mRNA del gen constitutivo fueron eliminados del estudio (3 controles). La detección de β -actina en el 66% de los controles corresponde a un porcentaje más bajo que los encontrados en la bibliografía donde el gen constitutivo se detectó entre el 84 y 100%, de los controles (Wong, 2004; Leelawat, 2006; García, 2006; García, 2008). En cambio en el resto de grupos de pacientes el gen constitutivo se detectó en el 100% de los casos, valor similar al descrito en otros estudios, donde el porcentaje es entre el 85-100% de los casos (Wong, 2004; Leelawat, 2006; García, 2006; García, 2008).

I.4.1 Expresión cualitativa de mRNA de sialiltransferasas (Presencia/Ausencia)

Los controles sanos presentan niveles menores de expresión de mRNA en plasma y en ningún caso se detectó la expresión de los genes de las sialiltransferasas. Estos genes se expresaron en la gran mayoría de pacientes con cáncer (62-89%), en mayor grado ST3Gal III (alrededor de un 90%) que ST3Gal IV (entre 62-78%). La expresión de estos genes en las pancreatitis, ya sean agudas o crónicas fue menor (20-40%), e igual que en el caso anterior ST3Gal IV se detectó en menor número de pacientes (20-30 %) respecto ST3Gal III (40%) (Tabla 8).

	mRNA β -actina detectable en plasma	mRNA ST3Gal III detectable en plasma	mRNA ST3Gal IV detectable en plasma
CONTROLES n=9	6/9 (66%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)
P. AGUDA n=7	7/7 (100%)	2/7 (28.6%)	2/7 (28.6%)
P. CRÓNICA n=15	15/15 (100%)	6/15 (40%)	3/15 (20%)
PDAC n=21	21/21 (100%)	18/21 (85.7%)	13/21 (61.9%)
OTRAS NEOS n=9	9/9 (100%)	8/9 (88.9%)	7/9 (77.8%)

Tabla 8: Resumen de la detección de mRNA libre en plasma de los distintos genes en los grupos de estudio

En lo que respecta a la expresión de mRNA en suero/plasma, hasta el momento no existen estudios que detecten mRNA de genes asociados al adenocarcinoma pancreático, pero sí en otros tipos de cáncer como melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, hepatocarcinoma, linfoma y cáncer de tiroides. Se han detectado diversos genes asociados a procesos tumorales como tirosinasa, telomerasa, mamaglobina, CEA, CK 19, hnRNP-Bi, β catenina, Bmi-1, LISCH7, VEGF-A, en proporciones que oscilan entre el 30-100 % de los pacientes con cáncer mientras que la expresión en controles sanos a pesar de oscilar entre el 4-84 % siempre se expresa en menor nivel que en los procesos tumorales.

En los grupos de pacientes del estudio como el mRNA de los genes de las sialiltransferasas no se detectó en el plasma de controles sanos, la expresión de ST3Gal III y ST3Gal IV se evaluó en primer lugar como presente o ausente, y en segundo lugar se cuantificó la expresión de estas enzimas en plasma. En aquellas muestras en las que se detecta el gen constitutivo pero no el mRNA de las sialiltransferasas, se les asignó un valor de expresión de cero (García, 2007).

Para evaluar si existen diferencias entre grupos a nivel de presencia o ausencia de ST3Gal III se utilizó el test estadístico de chi cuadrado (χ^2). Se obtuvieron diferencias significativas entre los controles y las distintas patologías malignas estudiadas: adenocarcinoma de páncreas ($p=0.000$; χ^2) y otras neoplasias del tracto gastrointestinal ($p=0.001$; estadístico exacto de Fisher), ya que en los controles no se detecta el gen estudiado, mientras que en las patologías malignas la presencia de estos genes es del 86-89%. También existen diferencias significativas entre pancreatitis crónica y las patologías malignas; adenocarcinoma de páncreas ($p=0.004$; χ^2), otras neoplasias del tracto gastrointestinal ($p=0.019$; χ^2). Entre los demás grupos no existen diferencias significativas.

En la Tabla 9 se describen las características clinicopatológicas de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas, edad, sexo; afectación de ganglios linfáticos regionales (LN), presencia o ausencia de metástasis y estadiaje de la neoplasia (TNM). Asimismo se muestran los valores de CA19.9 que se analizaron de dos maneras: clasificando los pacientes con un cut-off de 100 y con cut-off de 1000 (Molina y Filella, 2003) y los

valores de la albúmina, que se analizó clasificando los pacientes con un cut-off de 3.5 que corresponde al valor inferior de referencia en la metodología utilizada. Las características anatomopatológicas del tumor de páncreas no se disponen de los 21, no se obtuvo pieza quirúrgica en 7 casos: en 2 de ellos el tumor fue irreseccable, en uno de los casos no se pudo llevar a cabo la intervención por cardiopatía y en 4 pacientes por presencia de metástasis hepáticas.

Se analizó si la presencia de ST3Gal III y de ST3Gal IV se asociaba con las distintas variables clínico patológicas de los pacientes con adenocarcinoma pancreático y no se observó ninguna asociación significativa. Sólo se observa diferencias significativas cuando se comparan la presencia de ST3Gal III con el estadio tumoral si se agrupan los estadios iniciales (I+II) frente al cáncer metastásico (IV) ($p=0.032$; Prueba no paramétrica de Mann Whitney).

García ha publicado tres estudios en pacientes con cáncer de colon determinando la expresión de diferentes genes, en 2006 estudió la timidilato sintasa detectándola en el 47% de los casos cuyos niveles correlacionaron con la afectación de ganglios linfáticos regionales, en 2007 el estudio lo basó en la expresión del gen LISCH7 detectándolo en el 30% de los casos los cuales presentaban asociación con el estadio tumoral, la invasión de ganglios linfáticos y la invasión vascular del cáncer de colon y en 2008 el VEGF-A lo detectó en el 95.8 % de los pacientes pero no presentó asociación con ninguna característica clínico patológica del tumor. Los estudios en cáncer de pulmón también se han realizado en gran variedad de genes. En primer lugar Koprski en 2001 estudió el mRNA de 5T4 presente en el 43% de los pacientes. Sueoka en 2005 detectó hnRNP-B1 en 45.5% de pacientes pero no encontró correlación con los parámetros clínicos del cáncer de pulmón. Miura estudió en 2005 el mRNA de la telomerasa en el carcinoma hepatocelular, encontrando mayores niveles en hepatocarcinoma que en el resto de patologías hepáticas benignas y se obtuvo una correlación positiva con el tamaño del tumor. La gran variedad entre los diferentes estudios puede ser debida a la diferencia entre los marcadores utilizados y los métodos utilizados, sería importante el establecimiento de un método de referencia para la detección de ácidos nucleicos libres en plasma para que los estudios resultaran comparables y establecer que genes son los de mayor utilidad en cada tipo de cáncer.

	mRNA + (%)ST3Gal III	mRNA - (%)ST3Gal III		mRNA + (%)ST3Gal IV	mRNA - (%)ST3Gal IV
PACIENTES (n=21)			PACIENTES (n=20)		
EDAD			EDAD		
< 60 (8)	75	25	< 60 (7)	57.1	42.9
≥ 60 (13)	92.3	7.7	≥ 60 (13)	69.2	30.8
SEXO			SEXO		
HOMBRES (16)	81.2	18.8	HOMBRES(15)	30	40
MUJERES (5)	100	0	MUJERES (5)	100	0
LN			LN		
SÍ (16)	93.8	6.2	SÍ(15)	66.7	33.3
NO (3)	100	0	NO (3)	100	0
METASTASIS			METASTASIS		
SÍ (6)	100	0	SI (6)	83.3	16.7
NO (15)	80	20	NO (14)	57.1	42.9
TNM			TNM		
3 (1)	100	0	3 (1)	100	0
4 (11)	81.8	18.2	4 (10)	50	50
5 (3)	66.6	33.3	5 (3)	66.7	33.3
6 (6)	100	0	6 (6)	83.3	16.7
CA 19.9			CA 19.9		
< 100 (5)	80	20	< 100 (4)	25	75
≥ 100 (16)	93.8	6.2	≥100 (16)	75	25
CA 19.9			CA 19.9		
< 1000 (15)	93.3	6.7	< 1000 (14)	64.3	35.7
≥ 1000 (6)	83.3	16.7	≥ 1000 (6)	66.7	33.3
ALBUMINA			ALBUMINA		
< 3.5 (11)	81.8	18.2	< 3.5 (10)	70	30
≥3.5 (9)	88.9	11.1	≥ 3.5 (9)	55.6	44.4

Tabla 9: Asociación entre características clínico-patológicas en pacientes con adenocarcinoma pancreático y presencia de mRNAs de ST3Gal III i ST3Gal IV en plasma

I.5 Niveles de sialiltransferasas en los distintos grupos

I.5.1 Niveles de ST3Gal III

Uno de los objetivos de este estudio es la determinación de los niveles plasmáticos de mRNA de las sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV. En la Figura 32 están representados mediante un diagrama de cajas las medianas de ST3Gal III en las distintas patologías estudiadas normalizados respecto al gen constitutivo β -actina (ST3Gal III_ACTINA). En los análisis de expresión, cuando no se detectó mRNA de las sialiltransferasas pero sí mRNA del gen constitutivo (β -actina), lo que indica la presencia e integridad de mRNA en plasma, se asignó al nivel ST3Gal III un valor de 0.00. El valor de Ct de β -actina máximo admitido, fue de 32 que es el máximo valor de la recta patrón (Figura 29).

Los valores obtenidos en cada grupo han sido: controles (0); pancreatitis aguda: media 0.12 (rango: 0 - 0.45); pancreatitis crónica: media 0.28 (rango: 0 - 0.89); PDAC: media 0.64 (rango: 0 - 1.76) y otras neoplasias gastrointestinales: media 0.62 (rango: 0 - 1.08).

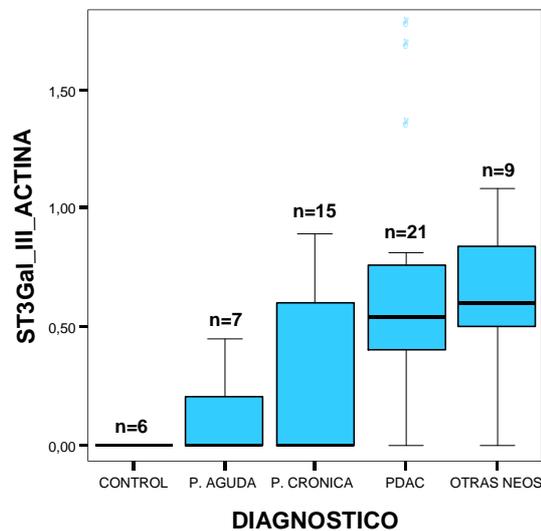


Figura 32: Niveles plasmáticos de ST3Gal III normalizado frente a β actina en distintas patologías y en pacientes sanos. En los adenocarcinomas están elevados de manera significativa cuando se compararan con controles sanos ($p=0.001$); con las pancreatitis crónica ($p=0.036$) y con las pancreatitis aguda ($p=0.003$); el grupo de otras neoplasias gastrointestinales también presentan diferencias significativas respecto a los controles sanos ($p=0.003$) y frente a las pancreatitis agudas ($p=0.003$) (Mann-Whitney U test).

Como la expresión de ST3Gal III_ACTINA no presenta una distribución normal, se utilizó el test estadístico U de Mann–Whitney y se compararon los distintos grupos dos a dos para evaluar si existen diferencias significativas entre ellos.

A pesar de que el número de muestras no es elevado, los datos obtenidos indican que existen diferencias significativas en los niveles de ST3Gal III entre los tumores y los controles (PDAC, $p=0.001$; otras neoplasias gastrointestinales, $p=0.003$; U de Mann-Whitney), básicamente debido a que en los controles no se detecta mRNA de ST3Gal III. También se observan diferencias significativas entre pancreatitis crónica y adenocarcinomas de páncreas ($p=0.036$; U de Mann-Whitney) pero no con el otro grupo de neoplasias gastrointestinales ($p=0.055$; U de Mann-Whitney). Así mismo existen diferencias significativas entre pancreatitis aguda y procesos neoplásicos (PDAC $p=0.003$; otras neoplasias gastrointestinales, $p=0.003$; U de Mann-Whitney).

En base al test estadístico no paramétrico U de Mann-Whitney, puede decirse que la presencia en plasma de ST3Gal III normalizado respecto a actina a valores superiores de 0.19 de cDNA de (cut off) se asocia con adenocarcinoma de páncreas con una sensibilidad del 85.7% y una especificidad del 53.3% (Tabla 10). Cuando se utilizaron las curvas ROC para valorar la posible utilidad de ST3Gal III como marcador para diferenciar los pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas del resto de grupos, se obtuvieron unos valores VPP 56.2%, VPN 84.2% y AUC 0.670, valores inferiores a los obtenidos con el CA 19.9 (Fig. 33). Si la diferenciación se hace dos a dos, entre los distintos grupos con los que es importante hacer diagnóstico diferencial, se obtienen los valores de sensibilidad y especificidad indicados en la tabla 10.

ST3Gal III	Sensibilidad	Especificidad	AUC
PDAC vs RESTO GRUPOS	85.7%	53.3	0.670
PDAC vs PC	85.7	60	0.708

Tabla 10: Utilidad diagnóstica de ST3Gal III cuando se comparan los distintos grupos de pacientes.

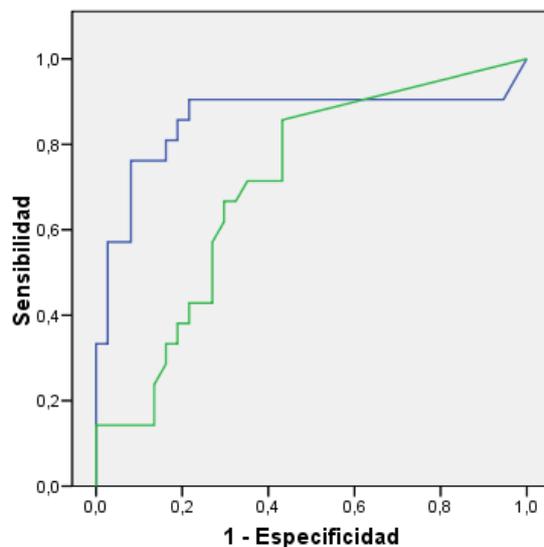


Figura 33: Curva ROC de CA 19.9 (azul) y ST3Gal III (verde).

Se evaluó también si los niveles de ST3Gal III podía diferenciar los distintos estadios de adenocarcinomas de páncreas [International Union Against Cancer (UICC)] (Fig. 34).

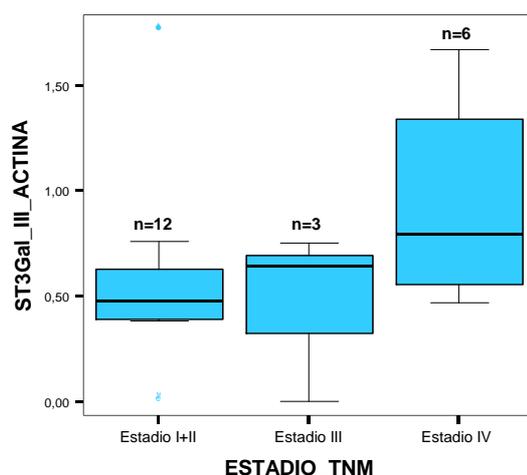


Figura 34: Niveles plasmáticos de ST3Gal III normalizado frente a β actina en distintos estadios del adenocarcinoma pancreático. Pacientes con adenocarcinoma pancreático metastásico (Estadio IV) presentan diferencias significativas con los pacientes que se encuentran en estadios iniciales del proceso neoplásico (Estadios I+II) ($p=0.032$; Mann-Whitney U test).

Se encontraron diferencias significativas cuando se compararon estadios iniciales de la enfermedad (I+II) con estadios más avanzados con metástasis (Estadio IV) ($p=0.032$ Mann-Whitney U test). Este resultado es importante, ya que en el momento del diagnóstico aproximadamente tan sólo un 20% de los pacientes con adenocarcinoma pancreático son considerados candidatos para cirugía, y de ellos sólo la mitad de los

casos se puede realizar resección con éxito. (Benson, 2007). Como en el 80% de los pacientes no se puede realizar estudio anatomopatológico del tumor para saber el estadio en el cual se encuentra el paciente, valores de ST3Gal III superiores a 0.785 podrían ser indicativos de estadios avanzados con una sensibilidad de 60.0% y especificidad de 100%, obteniendo información complementaria a los estudios de imagen; información que no proporciona en nuestro grupo de pacientes el CA19.9 (Figura 37).

I.5.2 Niveles de ST3Gal IV

En la Figura 35 están representados los niveles medios de ST3Gal IV en las distintas patologías estudiadas normalizados respecto a β -actina. Los valores medios obtenidos en cada grupo han sido: controles (0), pancreatitis aguda, media 0.10 (rango 0 - 0.53); pancreatitis crónica, media 0.24 (mínimo 0 - máximo 0.81); PDAC, media 0.71 (rango 0 - 3.15); otras neoplasias gastrointestinales, media 0.53 (rango 0 - 1.34).

Para realizar la comparación entre grupos, como la distribución de ST3Gal IV_ACTINA es no normal, se utilizó el test estadístico de Mann–Whitney y se compararon los distintos grupos dos a dos.

Igual que en el caso anterior, y con el número de muestras de que se dispone, se observa, que existen diferencias entre los controles y los procesos neoplásicos (adenocarcinoma pancreático, $p=0.016$ y otras neoplasias gastrointestinales $p=0.036$) ya que en los controles no se detecta mRNA de ST3Gal IV. También se observan diferencias significativas entre pancreatitis aguda y adenocarcinoma de páncreas, entre el resto de grupos no existen diferencias.

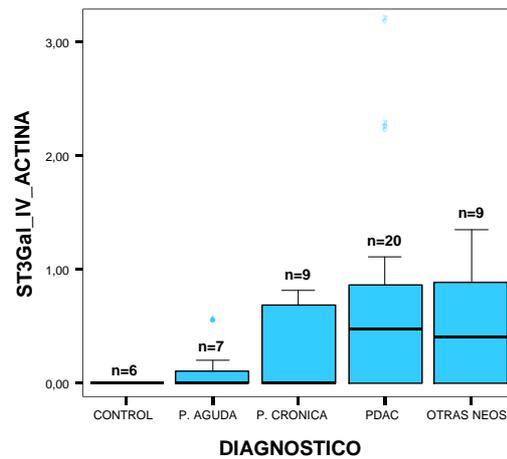


Figura 35: Niveles plasmáticos de ST3Gal IV normalizado frente a β actina (ST3Gal IV_ACTINA) en distintas patologías y en pacientes sanos. (Mann-Whitney U test).

El hecho que no se observen diferencias significativas entre pancreatitis crónica y neoplasias en los niveles de ST3Gal IV y que no se detecte en controles parece indicar que la sobreexpresión de ST3Gal IV podría estar asociada a inflamación sostenida, característica de ambas patologías.

Si se comparan pacientes con adenocarcinoma de páncreas con el resto de grupos, utilizando como marcador ST3Gal IV, mediante curvas ROC se obtienen valores de sensibilidad de 65%, especificidad del 62.5%, VPP 59.1%, VPN 68.2% y AUC 0.635.

1.6. Comparación de niveles de CA 19.9 en los diferentes grupos

El CA 19.9 es el único marcador tumoral que se utiliza actualmente en el seguimiento y monitorización del tratamiento de las neoplasias de páncreas. No presenta una sensibilidad y especificidad muy elevadas ya que también se eleva en otras patologías gastrointestinales, por ello la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) en sus guías para el uso de marcadores tumorales y el grupo europeo de marcadores tumorales, no recomiendan su utilización como test de screening para el adenocarcinoma pancreático de manera aislada (Duffy, 2010). Los valores de referencia de este marcador son de 0 a 37 U/ml.

Se decidió evaluar su utilidad para diferenciar entre los grupos de pacientes. Los análisis estadísticos muestran diferencias significativas cuando se compara el grupo de pancreatitis crónica y los procesos neoplásicos [adenocarcinoma de páncreas ($p=0.000$); otras neoplasias ($p=0.025$)] (Fig. 36). También existen diferencias entre controles sanos y pacientes con procesos neoplásicos adenocarcinoma pancreático ($p=0.002$); otras neoplasias ($p=0.036$)] entre adenocarcinoma pancreático y otras neoplasias ($p=0.022$). Estos datos indican que el CA 19.9 en los grupos de pacientes sí es útil para el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático, ya que diferencia los adenocarcinomas de páncreas de las pancreatitis crónicas, de los controles y de otras neoplasias gastrointestinales.

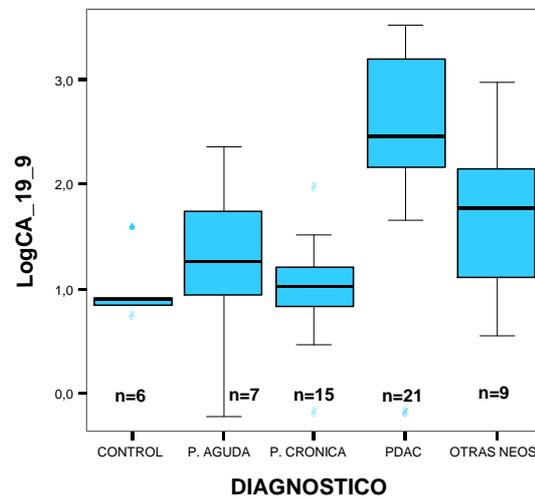


Figura 36: Logaritmo de los niveles séricos de CA 19.9 en los distintos grupos diagnósticos. Existen diferencias significativas entre las neoplasias de páncreas con controles, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda y otras neoplasias gastrointestinales. El grupo de otras neoplasias gastrointestinales presenta diferencias con los controles y con las pancreatitis crónicas. (Mann-Whitney U test).

A pesar que el CA19.9 discrimina entre el grupo de adenocarcinoma ductal de páncreas y el grupo de pancreatitis crónica, otras neoplasias y controles, los valores de sensibilidad (90.5%) y especificidad (80.0%) no son lo suficientemente elevados para su uso en el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático como test independiente y por ello sería interesante combinarlo con otros parámetros para poder aumentar su sensibilidad y especificidad.

No se observan diferencias significativas en los niveles séricos de CA 19.9 (Fig. 37) entre los diferentes estadios de adenocarcinoma de páncreas. No se encontró mejora en la sensibilidad diagnóstica en los pacientes en estadios más avanzados del adenocarcinoma pancreático, a diferencia de lo descrito en las revisiones de Steinberg 1990 y Goonetilleke 2007). Como en nuestro grupo de pacientes con adenocarcinoma pancreático hay dos (1 estadio III, 1 estadio IV) que no expresan CA 19.9 y probablemente se trate de pacientes con genotipo Lewis a - / b -, se eliminaron estos dos pacientes para ver si mejoraban los valores de sensibilidad y especificidad pero tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre estadios más iniciales y estadios avanzados.

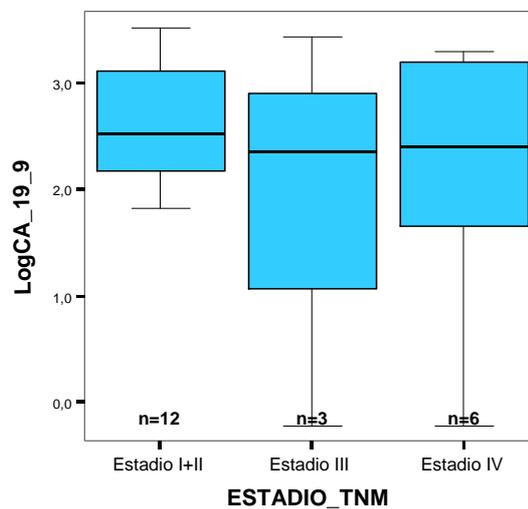


Figura 37: Logaritmo de los niveles séricos de CA 19.9 en los distintos estadios de adenocarcinoma pancreático. En nuestro grupo no se encuentran diferencias significativas en los niveles de CA 19.9 entre los distintos estadios del adenocarcinoma de páncreas. (Test estadístico Mann-Whitney U test)

CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE MARCADORES DE FASE AGUDA

II.1 Niveles séricos de marcadores de inflamación

II.1.1 Proteína C reactiva

La proteína C reactiva, proteína de fase aguda, es un indicador sensible pero no específico de daño agudo, infección bacteriana o inflamación. Se utiliza como marcador de inflamación y de daño tisular, tanto para la detección precoz como para la monitorización de los procesos inflamatorios. (Jacobs Laboratory Test Handbook; Pág. 523). Sus valores de referencia son de 0.1 a 0.5 mg/dl.

Como el desarrollo de cáncer está relacionado con la inflamación, se evaluaron los niveles séricos de proteína C reactiva y se compararon los distintos grupos de pacientes (Fig. 38). Los pacientes con pancreatitis aguda presentan los valores más elevados presentando diferencias significativas con el resto de patologías (adenocarcinoma ductal de páncreas: $p=0.000$; otras neoplasias gastrointestinales: $p=0.000$; pancreatitis crónica: $p=0.000$) y con los controles sanos ($p=0.001$) (Test U no paramétrico de Mann-Whitney), estos resultados eran previsibles ya que la proteína C reactiva es un marcador de fase aguda y en la pancreatitis aguda se produce una gran liberación de reactantes de fase aguda.

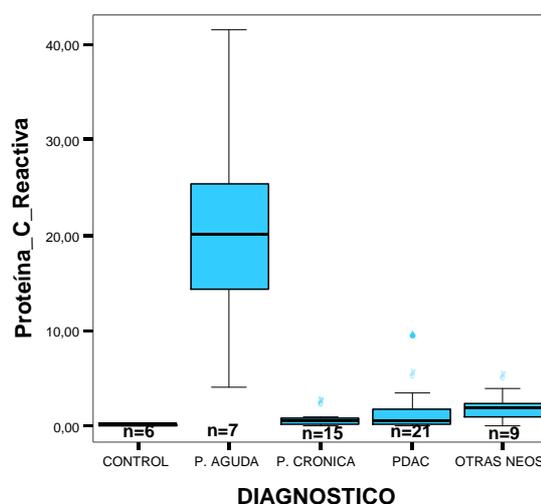


Figura 38: Valores de proteína C reactiva en los distintos grupos diagnósticos. Existen diferencias significativas entre pancreatitis aguda y el resto de grupos. (Mann-Whitney U test).

Existen diferencias entre controles y los procesos tumorales (PDAC: $p=0.015$; ONEOS: $p=0.005$). Este resultado también era esperado ya que en las neoplasias existe proceso inflamatorio sostenido que puede aumentar los reactantes relacionados con la inflamación. Los niveles de proteína C reactiva también diferencian entre pancreatitis crónica y otras neoplasias gastrointestinales ($p=0.010$). En procesos que cursan con inflamación sostenida también se encuentran niveles por encima del límite superior del intervalo de referencia, pero inferiores a los procesos agudos.

II.1.2 Alfa 1 Glicoproteína ácida

La alfa 1 glicoproteína ácida (A1G) también es una proteína de fase aguda que se eleva en distintos procesos inflamatorios.

Se determinaron los niveles de alfa 1 glicoproteína ácida para todos los pacientes (Fig. 39) y los datos obtenidos se analizaron para determinar si podían discriminar entre los grupos de estudio. Los análisis estadísticos correspondientes mostraron que existen diferencias entre pancreatitis aguda y el resto de procesos: pancreatitis crónica ($p=0.000$); adenocarcinoma pancreático ($p=0.000$); otras neoplasias ($p=0.000$) controles ($p=0.001$). Esto indica que la alfa-1-glicoproteína ácida es un marcador de procesos inflamatorios agudos y que no sirve para discriminar procesos inflamatorios sostenidos. Estos resultados muestran que sólo con la proteína C reactiva o la alfa 1 glicoproteína ácida, se pueden diferenciar procesos agudos y crónicos, por ello en las comparaciones posteriores entre grupos de pacientes ya no se incluye el grupo de pancreatitis aguda.

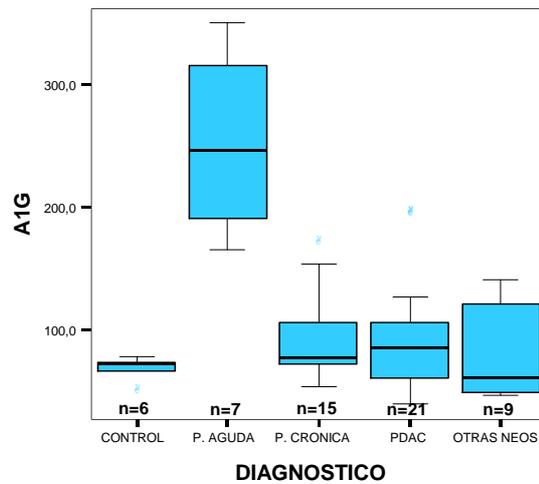


Figura 39: Valores de Alfa 1 Glicoproteína ácida en los distintos grupos diagnósticos. Existen diferencias significativas entre pancreatitis aguda y el resto de grupos. (Mann-Whitney U test).

II.1.3 Glasgow Prognostic Score

Como ya se ha comentado en el apartado 1.2.1 de la introducción, la presencia y magnitud de una respuesta inflamatoria sistémica es un factor pronóstico independiente en pacientes con cáncer avanzado. Para poder cuantificar esta respuesta se puede utilizar la escala del Glasgow Prognostic Score que combina dos marcadores de inflamación aguda: la proteína C reactiva (marcador positivo de fase aguda) y la albúmina (marcador negativo de fase aguda).

Para saber si es útil como ayuda en el diagnóstico de pacientes con adenocarcinoma pancreático el Glasgow Prognostic Score se calculó, como se ha indicado en el Capítulo III apartado 7.10, en los diferentes grupos de pacientes. Cuando se compararon los distintos grupos entre ellos (Fig. 40) se pudo diferenciar entre controles y procesos neoplásicos: adenocarcinoma pancreático ($p=0.012$); otras neoplasias gastrointestinales ($p=0.002$). También diferencia entre la pancreatitis crónica y los procesos neoplásicos [adenocarcinoma pancreático ($p=0.046$); otras neoplasias gastrointestinales ($p=0.000$)].

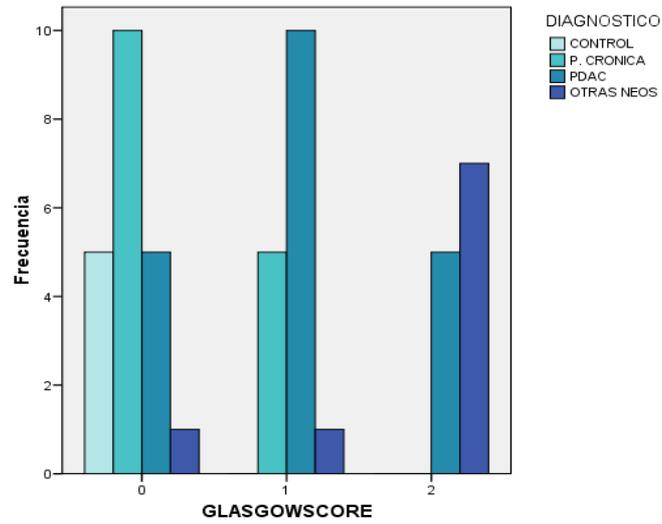


Figura 40: Distribución del Glasgow Prognostic Score (0, 1, 2) en los grupos diagnósticos: controles, pancreatitis crónica, adenocarcinoma ductal de páncreas y otras neoplasias gastrointestinales.

CAPÍTULO III: NIVELES DE IGF-I, IGFBP3, RATIO MOLAR IGF-I/IGFBP3, HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) Y PÉPTIDO C

Para la valoración de estos parámetros se escogió el segundo grupo de pacientes formado por 81 pacientes y engloba los grupos de adenocarcinoma pancreático, otros cánceres del tracto gastrointestinal, pancreatitis crónica y controles, del mismo rango de edad e índice de masa corporal, ya que los niveles de IGF-1 en adultos disminuyen con la edad, además sus niveles séricos dependen del estado nutricional (Thissen, 1994).

El grupo de pacientes diagnosticados de **adenocarcinoma pancreático** corresponden a **41 pacientes**, y según la clasificación tumor-nódulo-metástasis (TNM) uno presenta estadio IB; uno estadio IIA; veintiuno estadio IIB; siete estadio III y once estadio IV. Estos pacientes se compararon con **15 controles sanos** y con pacientes con patologías cuyo diagnóstico diferencial puede ser difícil ya que comparten ciertas características clínicas y forma de presentación, por ello se incluyeron **doce pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica** y **trece pacientes diagnosticados de otros tipos de neoplasias gastrointestinales**: once tumores periampulares y dos neoplasias de páncreas no ductales (una de células acinares y una medular).

Tanto IGF-I como IGFBP-3 son regulados por la hormona de crecimiento (GH), pero también son dependientes de la edad y estado nutricional, por ello se calculó la media de edad y el índice de masa corporal $[(\text{Peso (Kg)} / (\text{Altura m})^2)]$ entre los grupos de estudio y se evaluó que no existieran diferencias significativas entre ellos (Tabla 11), por lo que se pudo comparar los niveles de IGF-I y de su proteína transportadora 3 (IGFBP3).

	EDAD	IMC	SIGNIFICACIÓN (Respecto resto de grupos)
CONTROL (n=15)	60.87 (44-75)	25.26 (19.8-32)	NS
P. CRÓNICA (n=12)	59.83 (44-79)	24.17 (18.2-29.7)	NS
PDAC (n=41)	64.37 (47-79)	26.10(18.1-32.8)	NS
ONEOS (n=13)	63.69 (44-80)	26.5 (22-31.2)	NS

Tabla 11: Medias de edad e IMC, no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos (U test de Mann-Whitney).

III. 1 Análisis de los valores de IGF-1, IGFBP3, GH y ratio molar IGF-1/IGFBP3:

III.1.1 IGF-I

Los valores de IGF-1 en los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático presentan un valor medio de 79.3 ng/ml (mínimo de 25 y máximo de 202), en el grupo de pancreatitis crónica se obtiene una media de 152.2 ng/ml (rango 68.8-400), en el grupo de otras neoplasias gastrointestinales la media es de 87.9 ng/ml (rango 36.5-278) y en el grupo de controles sanos la media fue de 119.8 ng/ml (rango 62.6-193) (Fig. 41). En el grupo control el 87% de los valores de IGF-1 se encuentran dentro del rango de referencia, en el grupo de pancreatitis crónica un 75%, en el grupo de otras neoplasias un 64% y en los adenocarcinomas pancreáticos un 46.3%. Se observa que con la presencia de malignidad los valores de IGF-1 disminuyen.

Cuando se compararon los valores de IGF-1 entre los grupos diagnósticos aplicando el test estadístico no paramétrico de U de Mann-Whitney, se observaron diferencias significativas entre la pancreatitis crónica respecto a los procesos neoplásicos [adenocarcinoma de páncreas ($p=0.001$); Otras neoplasias ($p=0.005$)]. También existen diferencias significativas entre el grupo control y las neoplasias [adenocarcinoma de páncreas ($p=0.002$) y otras neoplasias ($p=0.029$)]. No se observan diferencias cuando se compararon los procesos neoplásicos entre ellos o los controles y pancreatitis crónica.

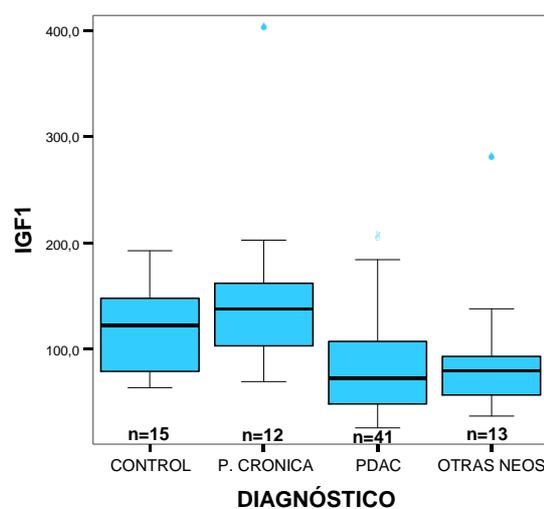


Figura 41: Valores de IGF-1 en controles, pancreatitis crónica, adenocarcinoma de páncreas y otras neoplasias gastrointestinales.

Sorprende encontrar niveles de IGF-1 más elevados en controles y pancreatitis crónica, ya que como se ha comentado en la introducción niveles elevados de IGF-1 se asocian a mayor riesgo de diversos tipos de cáncer (Pollak, 2004; Yu, 1999; Hankinson, 1998; Ma J, 1999; Chan, 1998; Douglas, 2010) aunque las conclusiones respecto al adenocarcinoma pancreático no han sido muy claras (Lin, 2004; Wolpin, 2007; Stolzenberg-Solomon RZ, 2004; Douglas 2010). De cualquier modo se están valorando estados diferentes, ya que en los pacientes de nuestro estudio, el adenocarcinoma pancreático ya está establecido y no se está determinando el riesgo sino las alteraciones de los niveles séricos de IGF-I en adenocarcinoma pancreático. En los escasos estudios previos que valoran IGF-I en adenocarcinoma pancreático ya establecido, se obtienen valores aumentados (Karna, 2002) o disminuidos pero sin diferencias significativas (Evans, 1997).

Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Evans que encuentra niveles séricos bajos de IGF-1 en pacientes con adenocarcinoma pancreático, pero en su estudio las diferencias entre controles y adenocarcinoma pancreático no fueron significativas, mientras que en nuestro grupo de pacientes se ha obtenido una significación de $p=0.002$ (test U de Mann-Whitney). Hay evidencia que en los tumores de páncreas aumenta la producción local de IGF-1 ejerciendo efectos autocrinos y paracrinos en el crecimiento celular. Aunque en condiciones normales la mayoría de IGF-I es producido por el hígado, cuando se produce la transformación neoplásica, las células tumorales adquieren la capacidad autocrina y paracrina para producir IGF-I y su producción a nivel tumoral puede no depender de los niveles circulantes. (Golan, 2011).

En estudios en los que determinan los niveles séricos de IGF-I en otras neoplasias, se observan resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio; Mazzoccoli en 1999 en pacientes con cáncer de pulmón encuentra niveles disminuidos, de manera significativa, en pacientes con cáncer en estadios avanzados respecto a controles (Mazzoccoli, 1999). En este mismo tipo de cáncer se han determinado los niveles en suero y lavado broncoalveolar de IGF-1 e IGFBP3 obteniendo valores inferiores en cáncer que en controles pero las diferencias no son significativas en suero, pero sí en lavado broncoalveolar. Los niveles de IGF-I son significativamente inferiores en cáncer metastásico quizás debido a la afectación hepática por las metástasis (Ünsal, 2004).

Mattera en 2003 estudió IGF-I, IGFBP3 y el ratio molar en pacientes con cirrosis, hepatocarcinoma más cirrosis y controles, obteniendo valores superiores de IGF-1 y IGFBP3 en controles mientras que no observan diferencias entre cirrosis y cirrosis más hepatocarcinoma. En cambio encuentran que el molar ratio es superior en hepatocarcinoma que en cirrosis y los niveles inferiores se encuentran en controles. Consideran que la malignidad puede ser un nuevo factor que afecta la actividad de IGF-I junto con otros factores como edad y estado del hígado y proponen que el aumento del ratio molar puede estar implicado en la progresión a hepatocarcinoma (Mattera, 2003); Su, también observa valores significativamente menores en hepatocarcinoma comparado con controles (Su, 2010).

La pérdida de peso en pacientes con cáncer, en ocasiones es un hecho infravalorado a pesar de que se produce en dos tercios de los pacientes con tumores malignos. Un importante mecanismo que interviene en la pérdida de peso es la activación de la respuesta de fase aguda que produce pérdida grasa y muscular. En pacientes con adenocarcinoma pancreático existe una alteración de la cascada de fase aguda, se acelera la pérdida de peso que lleva a acortamiento de la supervivencia (Bachmann, 2009). En el grupo de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas se observa correlación inversa entre IGF-I y la proteína C reactiva indicativa de inflamación (Coeficiente de correlación de Spearman $r = -0.509$, $p = 0.001$), esta correlación no se observa en el resto de grupos. La desnutrición asociada al adenocarcinoma pancreático también se asocia a la ictericia obstructiva que produce la masa tumoral por compresión de los conductos biliares. Debido a que los niveles plasmáticos de IGF-I también están ligados al estado nutricional (Bing, 2005), se determinó la prealbúmina como marcador nutricional de estos pacientes y su posible influencia en los bajos niveles de IGF-1 en pacientes con adenocarcinoma pancreático. La prealbúmina es un buen marcador del estado nutricional porque no sólo depende de una nutrición adecuada, sino que también depende de la síntesis hepática (Parra, 2007). Se han comparado los niveles de IGF-I y de prealbúmina en los distintos grupos diagnósticos (Fig. 42).

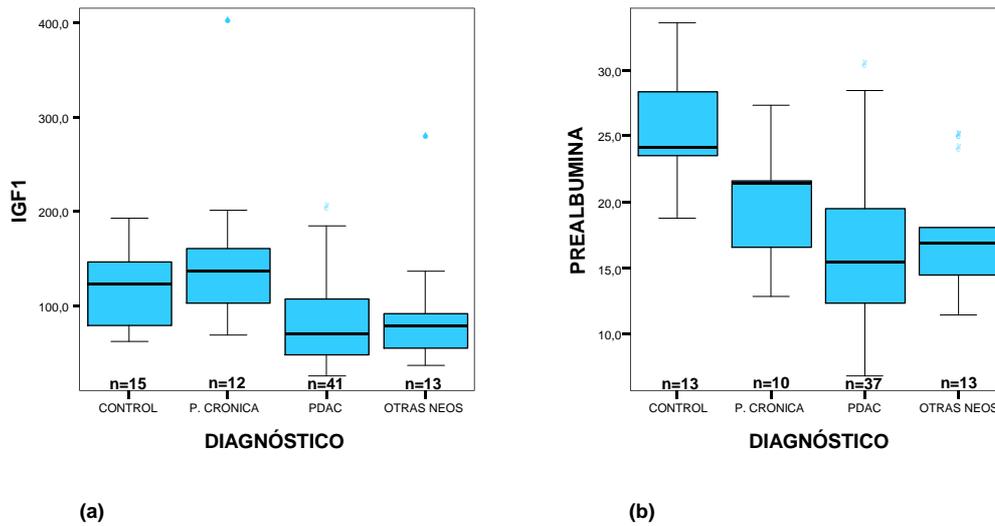


Figura 42: Valores de (a) IGF-1, (b) prealbúmina; en pancreatitis crónica, adenocarcinoma de páncreas y otras neoplasias gastrointestinales.

Se observó que, mientras que el IGF-I presenta diferencias significativas entre pancreatitis crónica y procesos neoplásicos, la prealbúmina no presenta diferencias significativas entre ellos, aunque se detecta una tendencia a la disminución de prealbúmina en procesos neoplásicos.

Los niveles de IGF-I y prealbúmina presentan correlación en el grupo de pacientes con adenocarcinoma de páncreas (Coeficiente de correlación de Spearman $r=0.454$, $p=0.005$), mientras que en el resto de grupos no se observa esta correlación, por lo que el estado de malnutrición podría explicar los menores niveles de IGF-I en PDAC.

Los niveles de prealbúmina son inferiores en procesos neoplásicos, y en este sentido el mal estado nutricional de los pacientes con cáncer podría explicar los bajos niveles de IGF-I. Sin embargo, en los pacientes con pancreatitis crónica, se observan valores bajos de prealbúmina, que en este caso no afecta a los niveles de IGF-I, por tanto, las diferencias en los niveles de IGF-I que se observan no son debidas únicamente al estado nutricional, también influyen otros factores. Es por ello que se planteó la determinación de hormona de crecimiento (GH).

III.1.2 HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

Se ha descrito que existen alteraciones hormonales aberrantes con excesiva producción de hormona de crecimiento (GH) y niveles circulantes bajos de IGF-I en pacientes con diferentes patologías no neoplásicas como sepsis, quemados, fallo renal, anorexia nerviosa; esta alteración del eje GH-IGF-I, denominada “resistencia adquirida a GH” (Fig. 43), se asocia a peor pronóstico. Se produce en condiciones de catabolismo severo y malnutrición en situaciones de sepsis, cirugía y enfermos críticos (Bentham, 1993; Ross, 1995). Recientemente se ha postulado la alteración del eje GH-IGF-I en pacientes con cáncer que afecta a estado general de estos pacientes, observando un peor estado con menores niveles de IGF-I y IGFBP3 probablemente debido a una resistencia adquirida a la acción de la GH sobre la síntesis hepática de IGF-I (Okamoto, 2010).

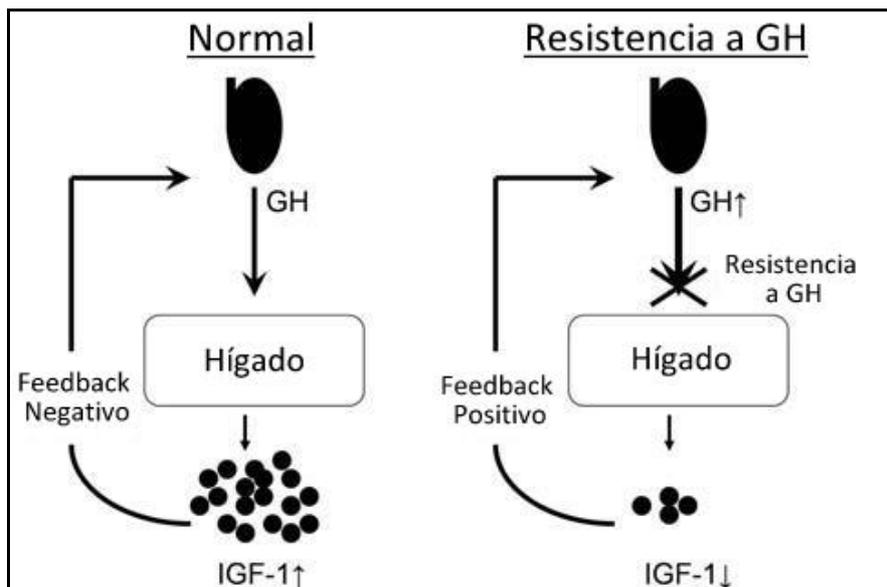


Figura 43: Diagrama del eje GH-IGF-I en personas sanas (Izquierda) y en personas con resistencia adquirida a GH. En condiciones normales, la GH secretada por la hipófisis estimula la producción hepática de IGF-I. IGF-I produce feedback negativo. En la resistencia adquirida a GH el primer defecto es una disminución de la concentración de IGF-I que lleva a un aumento de GH que no consiguen normalizar los niveles de IGF-I a pesar de los elevados o normales niveles de GH (Extraído de Okamoto, 2010).

El defecto primario en esta resistencia es una disminución de IGF-I, que posteriormente lleva a un aumento de GH, pero el mecanismo compensatorio no produce una normalización de los niveles de IGF-I. Es sabido que el estado nutricional afecta la función del eje GH-IGF-I. La malnutrición crónica lleva a niveles elevados de

GH y disminuidos de IGF-I. Huang detecta resistencia adquirida a GH en pacientes caquéticos con cáncer de colon pero no en pacientes caquéticos con cáncer gástrico, propone que la resistencia a GH no es debida a la malnutrición sino causada por el mismo tumor ya que se corrige tras la extirpación del tumor (Huang, 2005).

Se ha descrito en distintos tipos de cáncer como pulmón, gástrico y colorectal la alteración del eje Hormona de crecimiento GH-IGF-I, con presencia de niveles elevados de GH pero bajos del factor de crecimiento insulinoide que en condiciones normales aumenta al aumentar la hormona de crecimiento, ya que es su mediador (Okamoto, 2010). No existen estudios que relacionen los niveles de IGF-I en adenocarcinoma pancreático con la alteración de este eje GH-IGF-I.

Se ha determinado los niveles de GH en los grupos de pacientes (Fig. 44) y no se observan diferencias significativas entre los grupos, pero sí que se observa resistencia a la GH en 13% de los pacientes con PDAC y en el 7.7% de pacientes con otras neoplasias, mientras que en controles y pancreatitis crónica no se encuentra resistencia a GH en ningún paciente.

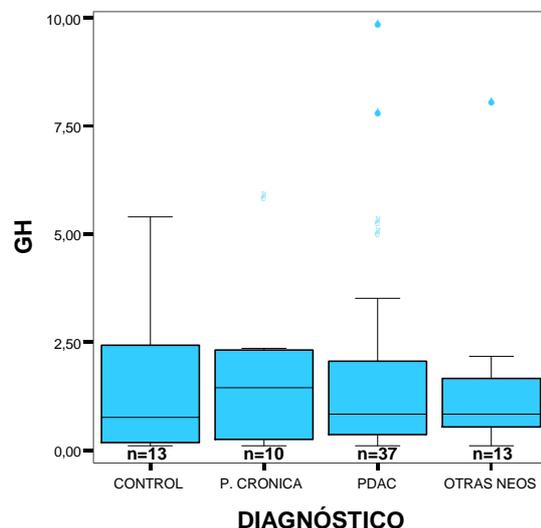


Figura 44: Valores de GH en controles, pancreatitis crónica, adenocarcinoma de páncreas y otras neoplasias gastrointestinales.

Estos resultados pueden ayudar a explicar parcialmente por qué los niveles de IGF-I el grupo de adenocarcinoma pancreático y de otras neoplasias son menores.

Como se observó que en procesos malignos los niveles séricos de IGF-1 eran menores y en otros tipos de cáncer, se han observado menores niveles en estadios avanzados, se evaluó si existían diferencias en los niveles de IGF-I en los distintos estadios tumorales en los pacientes con adenocarcinoma de páncreas pero no se encontraron diferencias significativas.

III.1.3. IGFBP3

Los niveles séricos de IGFBP-3 en los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma pancreático presentan un valor medio de 2.5 µg/ml (rango 0.5 - 4.8), en el grupo de otras neoplasias gastrointestinales la media es de 2.3 µg/ml (rango 1 - 3.8), en el grupo de pancreatitis crónica se obtiene una media de 3.4 µg/ml (rango 2 - 4.6) y en los controles la media fue 4.3 µg/ml (2.9 - 5.7).

Cuando se comparó el IGFBP3 en los cuatro grupos (Fig. 45) se encontraron diferencias significativas entre controles sanos y resto de grupos: pancreatitis crónica ($p=0.032$), adenocarcinoma pancreático ($p=0.000$), otras neoplasias ($p=0.000$) y entre pancreatitis crónica y procesos tumorales [adenocarcinoma pancreático ($p=0.007$); otras neoplasias ($p=0.007$)].

De manera similar a lo descrito para el IGF-I, los niveles de IGFBP3 y prealbúmina presentan correlación significativa en el grupo de pacientes con adenocarcinoma de páncreas (Coeficiente de correlación de Spearman $r=0.446$, $p=0.006$), mientras que en el resto de grupos diagnósticos no se observa esta correlación.

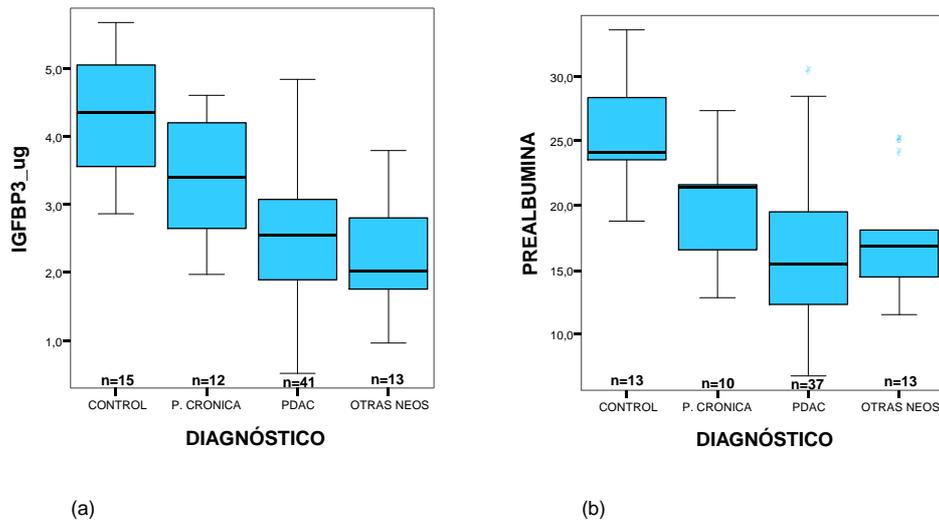


Figura 45: Valores de (a) IGFBP3 (b) prealbúmina; en pancreatitis crónica, adenocarcinoma de páncreas y otras neoplasias gastrointestinales.

Si se comparan los niveles de IGFBP3 separando los pacientes con o sin DM, en los pacientes con diabetes mellitus se observan diferencias significativas entre pancreatitis crónica y los procesos neoplásicos [adenocarcinoma pancreático ($p=0.047$); otras neoplasias gastrointestinales ($p=0.044$)] (Fig. 46a). En la comparación en los pacientes sin diabetes, se observan también diferencias significativas cuando se compara entre pancreatitis crónica y los procesos neoplásicos [adenocarcinoma pancreático ($p=0.031$); otras neoplasias gastrointestinales ($p=0.026$)]; también se observan diferencias entre controles y procesos neoplásicos [adenocarcinoma pancreático ($p=0.000$); otras neoplasias gastrointestinales ($p=0.000$)] (Fig. 46b). Por todo ello, se puede concluir que la DM no influye en los niveles de IGFBP3.

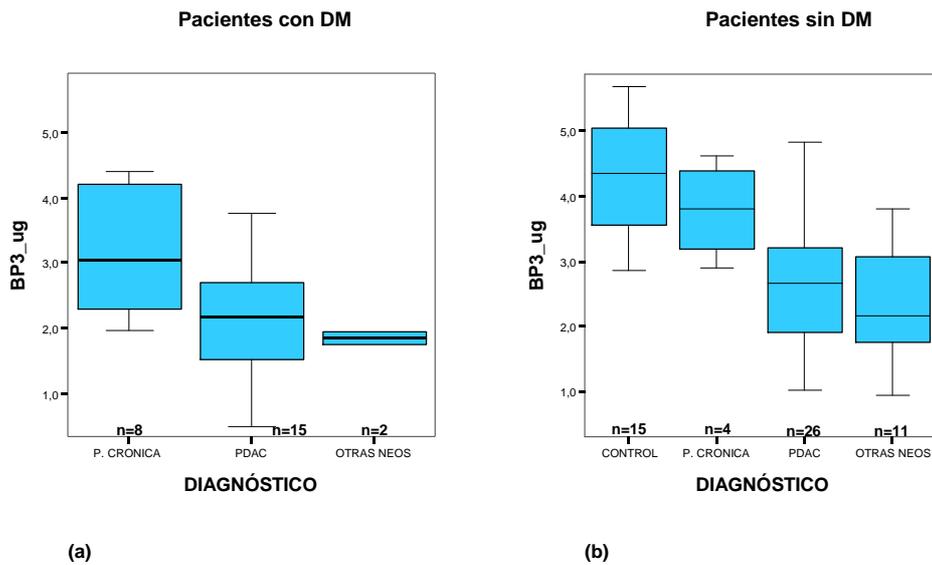


Figura 46: Valores de IGFBP3 en pancreatitis crónica, PDAC y otras neoplasias con DM (a) y sin DM (b).

III.1.4. Ratio molar IGF-I/IGFBP3

El ratio molar IGF-1/IGFBP3 nos indica IGF-I biológicamente activo (Arvat, 2000) y sus valores en los diferentes grupos de pacientes fueron: en pancreatitis crónica, valor medio de 0.17 (rango 0.09-0.37); en el grupo control, valor medio 0.10 (rango 0.07-0.12); en adenocarcinoma pancreático media de 0.12 (rango 0.05-0.24) y en el grupo de otras neoplasias gastrointestinales, valor medio de 0.14 (0.07-0.27) (Fig. 47).

Cuando se comparan los cuatro grupos sólo se observan diferencias entre pancreatitis crónica y adenocarcinoma pancreático ($p=0.035$), y entre controles y pancreatitis crónica ($p=0.007$; Test U no paramétrico de Mann-Whitney).

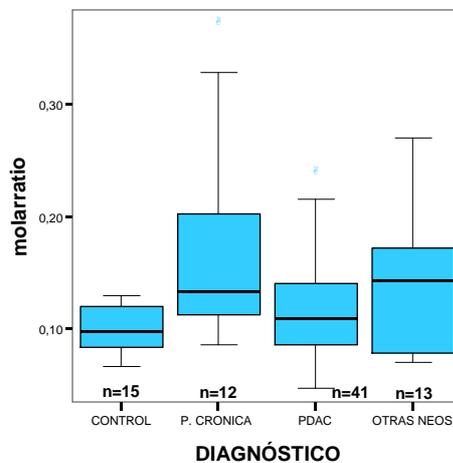


Figura 47: Valores de molar ratio en los grupos de pancreatitis crónica, adenocarcinoma de páncreas y otras neoplasias gastrointestinales.

Se observa que, aunque en adenocarcinoma pancreático los niveles de IGF-I están disminuidos, el molar ratio que nos indica el IGF biológicamente activo, es similar en adenocarcinoma pancreático y en controles.

Cuando se compara el molar ratio en pacientes con diabetes o sin DM no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos, ni tampoco al comparar el molar ratio en los distintos estadios del adenocarcinoma pancreático.

III. 2 Análisis de los niveles de péptido C

El péptido C nos da una medida de la secreción de insulina, por ello se determinó en los grupos de estudio: en el grupo control la media es de 2.51 ng/ml (1.12-4.12); en pancreatitis crónica 1.35 ng/ml (0.28-2.94), en adenocarcinoma de páncreas 1.59 ng/ml (0.01-4.75) y en el grupo de otras neoplasias 2.17 ng/ml (0.74-4.59).

Cuando se compararon los niveles de péptido C, se obtuvieron diferencias entre controles y pancreatitis crónica ($p=0.001$) y entre controles y PDAC ($p=0.002$), (Fig. 48), debido a que, tanto en pancreatitis crónica como en PDAC está afectado el páncreas donde se sintetiza el péptido C, y por ello sus valores están disminuidos.

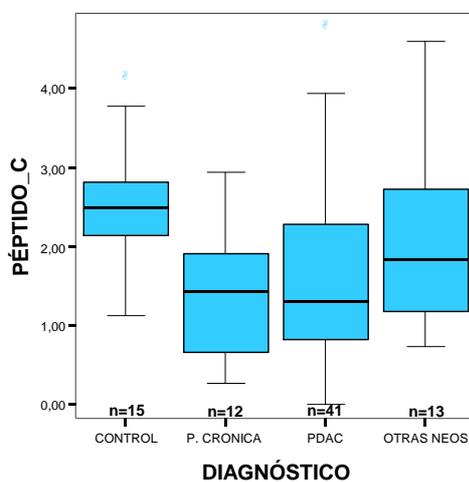


Figura 48: Valores de péptido C en los distintos grupos diagnósticos.

Si se compara el péptido C sólo en pacientes con DM (no hay controles ya que todos los controles del estudio son sanos no tienen DM), no existen diferencias entre grupos. Si se compara el péptido C en pacientes sin DM hay diferencia entre control y PC (0.027) y control y PDAC (0.009). En ambas patologías la afectación del páncreas sería responsable de los bajos niveles de insulina y péptido C.

CAPÍTULO IV: COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS PARÁMETROS EVALUADOS Y COMBINACIÓN DE LOS MISMOS PARA MEJORAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DEL ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO.

IV.1 Utilidad de los niveles de ST3Gal III y ST3Gal IV como marcadores tumorales

Uno de los objetivos de este estudio es el posible uso de sialiltransferasas en sangre periférica como marcadores tumorales. Para ello se ha calculado mediante curvas ROC: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y área bajo la curva (AUC), que nos indicaran si se está ante un buen candidato para su uso como marcador tumoral para el diagnóstico y/o pronóstico del adenocarcinoma pancreático (Tabla 12). Estos mismos parámetros se calcularon para el CA 19.9, que es el marcador que actualmente se utiliza en la práctica clínica para el seguimiento del adenocarcinoma pancreático. También se calculó el CEA, que se combina con el CA 19.9 como ayuda en el diagnóstico de adenocarcinoma de páncreas. Los cálculos se han realizado con el primer grupo de pacientes, en los que se llevó a cabo la determinación de la expresión de sialiltransferasas.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	AUC
CA 19.9	90.5	80	76	92.3	0.862
CEA	61.9	73.3	61.9	73.3	0.667
CEA + CA 19.9	81.0	90.0	85.0	87.1	0.889
ST3Gal III	85.7	53.3	56.2	84.2	0.670
ST3Gal IV	65.0	62.5	59.1	68.2	0.635

Tabla 12: Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de CA 19.9, ST3Gal III y ST3Gal IV cuando se comparó el grupo PDAC (n=21) con el resto de grupos del estudio (controles (n=9), pancreatitis crónica (n=15) y otras neoplasias gastrointestinales (n=9)) en el primer grupo de pacientes del estudio. Cálculos realizados con el programa "R".

De estos resultados se puede concluir que no se puede utilizar ni ST3Gal III ni ST3Gal IV como marcadores únicos en el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático.

Si se comparan los valores de ST3Gal III, ST3Gal IV y de CA 19.9 en los pacientes con adenocarcinoma de páncreas, según los estadios se obtienen las medias indicadas en la tabla 13.

Estadio UICC	ST3Gal III	CA 19.9 (U/ml)	ST3Gal IV
Estadio I+II			
Media	0.5	823	0.5
Rango	0-1.76	65.5-3245	0-2.21
Estadio III			
Media	0.5	985.4	1
Rango	0-0.75	0.6-2729	0-2.24
Estadio IV			
Media	0.9	682.1	0.9
Rango	0.47-1.67	0.6-1945	0-3.15

Tabla 13: Valores séricos medios de ST3Gal III, ST3Gal IV y CA 19.9 en los distintos estadios de adenocarcinoma de páncreas

En nuestros grupos de pacientes, el CA 19.9 presenta una sensibilidad de 90.5% que se encuentra dentro del rango de valores obtenido por Steinberg que es del 81% (69-93%) y con Goonnetilleke, que en una revisión más reciente de 22 estudios encontró una sensibilidad del 79% (70-90%). Los valores de sensibilidad varían dependiendo del estadio del tumor en el momento que se determina el CA 19.9, cuanto más avanzada esté la enfermedad en el momento del diagnóstico, mayor sensibilidad. Lo mismo ocurre con la especificidad, en nuestro grupo se obtuvo un valor de 80%, Steinberg encontró un valor medio de 90% (76-99%) y Goonnetilleke de 82% (68-91%).

Los valores de sensibilidad obtenidos para la ST3Gal III (85.7%), están dentro del intervalo de Steinberg para el CA 19.9, pero la especificidad es muy baja (53.3%), inferior a los obtenidos por Steinberg y por Goonnetilleke para el CA 19.9. Por ello no se puede utilizar como marcador tumoral único en el adenocarcinoma pancreático. Valores con menor sensibilidad (65 %) y especificidad un poco superior a ST3Gal III (62.5%), se observan para la ST3Gal IV.

IV.2 Combinación con sialiltransferasas

Como los resultados obtenidos con la determinación de ST3Gal III y ST3Gal IV para su utilización como marcadores tumorales independientes no cumplen los requisitos de

un buen marcador por presentar sensibilidad y especificidad muy bajas, se planteó su posible utilidad como marcador combinándolos con otros parámetros del paciente (Koopman, 2006). Se ha utilizado el paquete estadístico R versión 2.10.1 para combinar las distintas variables que se disponen de los pacientes y evaluar su utilidad para la diferenciación de los pacientes con PDAC del resto de grupos.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	AUC
CA 19.9	90.5	80.0	76.0	92.3	0.862
CEA + CA 19.9	81.0	90.0	85.0	87.1	0.889
CA19.9 + CEA+ ST3Gal III	100	66.7	67.7	100	0.906
CA 19.9+ CEA + ST3Gal III + Glasgow score	95.2	79.2	80	95	0.921
CA19.9 + CEA + ST3Gal IV	90.0	87.5	85.7	91.3	0.908
CA 19.9+ CEA + ST3Gal IV + Glasgow score	90.0	86.4	85.7	90.5	0.932
CA 19.9+ CEA + Glasgow score	90.5	79.2	79.2	90.5	0.871

Tabla 14: Características como marcador para el diagnóstico de pacientes con adenocarcinoma de páncreas del resto de grupos cuando se utilizan las sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV combinada con otros parámetros comparado con el CA 19.9 y CA 19.9+CEA.

No existe ninguna combinación de los distintos parámetros con valores tanto de sensibilidad como de especificidad del 100%.

Cuando se combinan los dos marcadores utilizados actualmente en el diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas en la práctica clínica (CEA y CA 19.9), con los niveles de expresión en plasma de ST3Gal III (Tabla 14), se obtiene una mejora en la sensibilidad con valores 100% pero la especificidad no es idónea, ya que no alcanza el 70% (66.7%), inferior a la especificidad del CA 19.9 cuando se utiliza como marcador único (80%) (Fig. 49). En este caso se obtiene un valor predictivo negativo del 100%, por lo que esta combinación de marcadores podría ser útil para descartar adenocarcinoma de páncreas en pacientes con sospecha clínica. A esta combinación cuando se le añade el Glasgow score disminuye la sensibilidad a 95.2% pero aumenta la especificidad a 79.2% y mejora la precisión diagnóstica AUC 0.921 frente a 0.862 del CA 19.9 (Fig. 49).

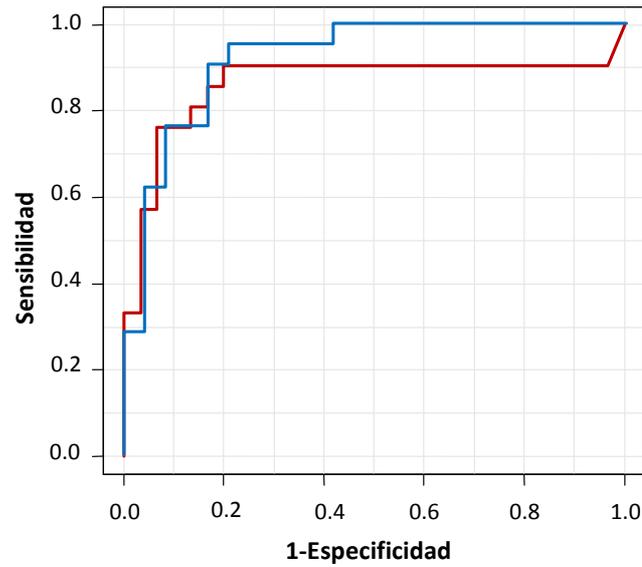


Figura 49: Curvas ROC. CA 19.9 (Rojo) comparado con la combinación de los parámetros (CA 19.9+CEA+ST3Gal III+ Glasgow Prognostic Score (Azul) cuando se compara PDAC con el resto de grupos.

En cambio, cuando la combinación utilizada es de la ST3Gal IV con CA 19.9 y CEA (Tabla 14) se obtiene una mejora en los valores de especificidad 87.5%, pero la sensibilidad es igual al CA 19.9 utilizado como marcador único. Es destacable la mejora de la precisión diagnóstica, ya que el AUC es de 0.932 (Fig. 50), mientras con el CA 19.9 de manera aislada el AUC es de 0.862.

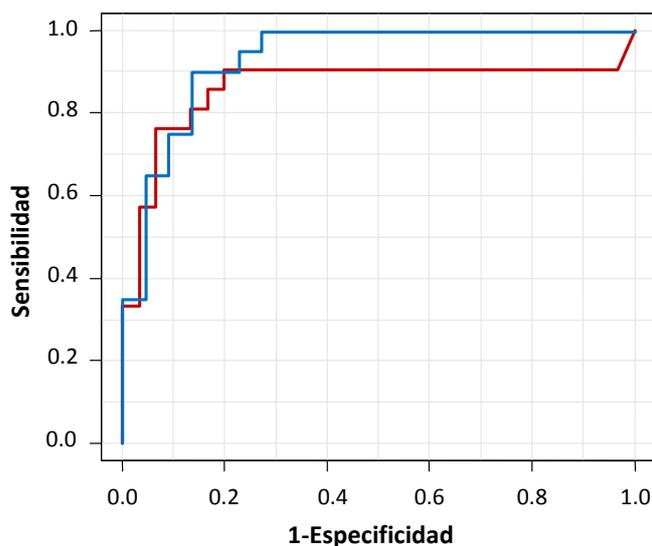


Figura 50: Curvas ROC. CA 19.9 (Rojo) comparado con la combinación de los parámetros (CA 19.9+CEA+ST3Gal IV+ Glasgow Prognostic Score (Azul) cuando se compara PDAC con el resto de grupos.

Lo que se observa en ambos casos es que cuando se incluye el Glasgow score en la combinación de parámetros, se obtiene una mejora en la precisión diagnóstica (AUC) (Tabla 14).

El único inconveniente es que la metodología utilizada para la determinación de niveles de expresión de sialiltransferasas es muy laboriosa y hay que tener mucha precaución en la recogida y mantenimiento de la muestra ya que el mRNA es muy lábil por la presencia de RNAsas del plasma y el método utilizado para su determinación no está estandarizado.

Sería bueno encontrar un método automático de obtención de mRNA de sialiltransferasas en plasma para poder mejorar el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático de manera rutinaria en los laboratorios asistenciales.

Debido a la complejidad de la obtención de mRNA en plasma, se planteó la posibilidad de obtener mejora diagnóstica si a la combinación con CEA, CA 19.9 se le añade el Glasgow score (Tabla 14), pero los valores obtenidos no mejoraron a la combinación CA 19.9 y CEA.

IV.3 Combinación con IGF-I e IGFBP3

Como se ha comentado en el Capítulo III se observan valores de IGF-1 e IGFBP3 disminuidos de manera significativa en adenocarcinoma pancreático y en tumores de la zona periampular respecto a controles y pancreatitis crónica. Por ello se planteó utilizar como herramienta diagnóstica los valores de IGF-1, péptido C, IGFBP3 combinados con el marcador utilizado actualmente para el seguimiento, el CA 19-9. Para ello se ha utilizado el grupo de pacientes de la segunda parte del estudio (n=81).

La comparación de los niveles de IGF-I y IGFBP3 entre PDAC y el resto de grupos muestra diferencias significativas ($p=0.001$). También existen diferencias entre pancreatitis crónica y adenocarcinoma ductal de páncreas ($p=0.000$). Para valorar la utilidad de estos tests se determinó el AUC como medida de la precisión diagnóstica.

Cuando se combinó CA19.9, IGF1 e IGFBP3 de diversas maneras, para diferenciar adenocarcinoma pancreático y el resto de grupos, los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad fueron bajos, ya que en el grupo de otras neoplasias de la zona

periampular los valores de IGF-I y IGFBP3 disminuyen al igual que en adenocarcinoma de páncreas. Sin embargo como se muestra en la Tabla 15 realizando las combinaciones de CA19.9; CEA e IGF1 se puede mejorar el diagnóstico diferencial entre pancreatitis crónica y adenocarcinoma pancreático.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	AUC
CA 19.9	87.8	91.7	97.3	68.8	0.884
CEA + CA 19.9	90.2	91.7	97.4	73.3	0.923
CA19.9 + IGF-I	85.4	100	100	66.7	0.943
CA19.9 + IGF-I + CEA	87.8	100	100	70.6	0.959
CA19.9 + IGFBP3	82.9	100	100	63.2	0.941
CA19.9 + IGFBP3 + CEA	85.4	100	100	66.7	0.951

Tabla 15: Características como marcador para el diagnóstico de pacientes con adenocarcinoma de páncreas respecto pancreatitis crónica cuando se combina con IGF-I y IGFBP3 con otros parámetros y comparado con CA 19.9 y CA 19.9+CEA.

En particular, los mejores valores para diferenciar entre adenocarcinoma pancreático y pancreatitis crónica se obtienen para la combinación CA 19.9 +CEA+IGF-I: sensibilidad del 87.8% vs. CA 19.9+CEA que es del 90.2, una especificidad del 100% vs. CA 19.9+CEA que es de 91.7 y en cuanto a la precisión diagnóstica AUC 0.959 (CA 19.9+CEA= 0.923) (Figura 51).

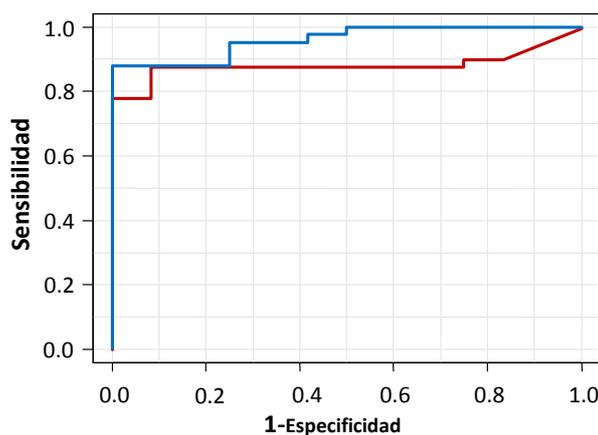


Figura 51: Curvas ROC. CA 19.9 (Rojo) comparado con la combinación de los parámetros (CA 19.9 + CEA + IGF-I) (Azul) cuando se compara PDAC con PC.

Mediante el paquete informático R con el cual se realizaron los cálculos de curvas ROC se estimó un modelo lineal generalizado (GLM), con respuesta binomial, que nos diferencia entre pancreatitis crónica y cáncer de páncreas. En este modelo se han incluido los pacientes PC y PDAC del segundo grupo del estudio. En particular, a partir del modelo se estimaron los siguientes cut-offs: IGF-1 127 ng/ml; CA 19.9 65.5 U/ml y CEA 2.4 ng/ml. A partir de ellos se puede calcular la probabilidad para nuevos pacientes de ser diagnosticados de PC o PDAC. Si la probabilidad es mayor o igual a 81.9 (punto en el que se obtenía la máxima sensibilidad y la máxima especificidad) el paciente se clasifica como PDAC con una sensibilidad de 87.8%, en cambio si la probabilidad es inferior a 81.9% se clasifica como PC con un 100% de especificidad.

V.DISCUSIÓN FINAL

mRNAs en plasma: alfa2,3-sialiltransferasas

Existen estudios que demuestran la presencia de ácidos nucleicos libres detectables en plasma y que estos ácidos nucleicos se encuentran en mayor concentración en pacientes con enfermedades malignas que en controles sanos (ver introducción apart. 4). Estudios que se basan en la determinación de DNA, en la detección de mRNA o en la detección de microRNAs. Este prometedor campo de la oncología ha ido creciendo desde 1994, cuando se detectaron fragmentos mutados del gen RAS en sangre de pacientes con cáncer, hasta la actualidad, pudiéndose encontrar en numerosos tipos de cáncer (Schwarzenbach 2011).

Cuando se revisa la bibliografía relacionada con la presencia de ácidos nucleicos libres en plasma de pacientes oncológicos, se observa que el adenocarcinoma pancreático es el tipo de cáncer que aparece en un menor número de estudios. Este hecho puede sorprender, ya que debido a la baja tasa de supervivencia y su mal pronóstico, es necesario obtener un marcador específico que sirva para el *screening* de esta patología maligna.

Estudios existentes relacionados con el adenocarcinoma pancreático detectan DNA libre en plasma determinando: la integridad (Umetani, 2006); las mutaciones (Castells, 1999) o la metilación (Melnikov, 2009; Liggett, 2010) del mismo, pero no existen estudios que determinen la expresión de genes en plasma.

A pesar de los conocimientos previos que muestran que la glicosilación alterada está asociada al cáncer, y que la expresión de mRNA de las enzimas responsables de la glicosilación está alterada en cáncer (Dube y Bertozzi, 2005), no se ha encontrado ningún estudio que evalúe la expresión de glicosiltransferasas en plasma de pacientes con adenocarcinoma pancreático. Por ello, en esta Tesis se planteó determinar la expresión de los genes de las alfa2,3-sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV en plasma.

En la serie de 54 pacientes de la primera parte del estudio, cuando se valoró la expresión de las alfa 2,3-sialittransferasas (como presente o ausente), no se detectó la presencia de mRNA de ninguna de estas sialiltransferasas en plasma de controles sanos, observándose diferencias significativas entre controles y adenocarcinomas pancreáticos, al igual que ocurre con los respectivos genes y cánceres analizados en los

estudios de Kopeski 1999, Chen 2000, Fleishhaker 2001, Novakovic 2004, Leelawat 2006, García 2007; García 2009. En otros estudios en cambio, los genes estudiados sí se detectan en controles sanos, pero se expresan en menor proporción que en cáncer, por ejemplo la β -Catenina en cáncer de colon se expresa en el 84% de los controles (Wong 2004); el Bmi-1 en el 55 % de los controles y en el 43.2% de los pacientes (Silva 2007); en cáncer de colon se expresa el VEGF-A en el 45% de los controles sanos (García 2008).

Los resultados obtenidos indican que la ausencia de mRNA de sialiltransferasas descartaría un proceso maligno con alta probabilidad, tanto de PDAC como de otros cánceres gastrointestinales.

Es interesante además destacar las diferencias significativas que se obtienen entre los grupos que realmente nos interesan como diagnóstico diferencial: pancreatitis crónica y adenocarcinoma pancreático ($p=0.004$), cuando se valora presencia o ausencia de ST3Gal III, ya que el 6% de pacientes que son intervenidos quirúrgicamente por sospecha de adenocarcinoma pancreático presentan lesiones focales de pancreatitis crónica (Liggett 2010; van Gulik 1999), que no se pueden diferenciar por técnicas de imagen. La diferenciación entre patologías malignas y benignas en otros tipos de cáncer gastrointestinal, también se ha descrito mediante el análisis de los niveles de expresión de telomerasa (mRNA en suero); en particular Leelawat en 2006 en colangiocarcinoma frente a enfermedades benignas del tracto biliar, Chen en el 2000 en cáncer de mama vs. controles y patologías benignas de la mama y Miura en 2005 en hepatocarcinoma vs. patologías hepáticas crónicas.

Aunque es necesario estudiar las características de sensibilidad y especificidad de los niveles de ST3Gal III y ampliar el estudio con mayor número de pacientes, los niveles de ST3Gal III también diferencian de manera significativa entre pancreatitis crónica y adenocarcinoma de páncreas ($p=0.036$). La presencia en plasma de ST3Gal III normalizado respecto a actina a valores superiores de 0.19 de cDNA se asocia a adenocarcinoma de páncreas con una sensibilidad del 85.7% y una especificidad del 53.3%, aunque son valores que no permiten que pueda ser utilizado como marcador diagnóstico único del adenocarcinoma de páncreas.

En cuanto a la asociación de los niveles de los genes estudiados con los parámetros clínicos del grupo de pacientes con adenocarcinoma pancreático, sólo se encontraron diferencias entre los niveles de mRNA de ST3Gal III en estadios iniciales de la enfermedad (I+II) versus a estadios más avanzados con metástasis (Estadio IV). Este resultado es importante, ya que en el momento del diagnóstico aproximadamente tan sólo un 20% de los pacientes con adenocarcinoma pancreático son considerados candidatos para cirugía, y de ellos sólo a la mitad de los casos se les puede realizar resección con éxito (Benson, 2007). Como en el 80% de los pacientes no se puede realizar estudio anatomopatológico del tumor para saber el estadio en el cuál se encuentra el paciente, valores de ST3Gal III superiores a 0.785 podrían ser indicativos de estadios avanzados con una sensibilidad de 60.0% y especificidad de 100%, obteniendo información complementaria a los estudios de imagen. No obstante sería necesario ampliar el estudio con mayor número de pacientes.

La determinación de los niveles de ST3Gal III se podría utilizar en combinación con los marcadores que actualmente se utilizan en el seguimiento de pacientes con adenocarcinoma pancreático como el CA 19.9. Ello podría mejorar la capacidad como marcador del CA19.9, ya que éste también aumenta sus niveles en patologías inflamatorias benignas, fundamentalmente pancreatitis crónica, lo que limita su utilidad como marcador independiente. En este sentido, en los 54 pacientes de la primera parte del estudio, la combinación de CA19.9, CEA y ST3Gal III supuso un aumento de la precisión diagnóstica para discriminar el grupo de PDAC del resto (AUC de 0.906), así como también la combinación de CA19.9, CEA y ST3Gal IV (AUC 0.908), frente a la combinación de CA19.9+ CEA (AUC de 0.889). Así mismo, la determinación de otros parámetros relacionados con la inflamación permitió una mejora diagnóstica cuando a las agrupaciones anteriores (CA19.9, CEA y ST3Gal III, y CA19.9, CEA y ST3Gal IV) se les añadió el *Glasgow prognostic score*. Se mejoró la precisión diagnóstica AUC que pasó a 0.921 y 0.932 respectivamente. Estos resultados son mejores a los obtenidos por Koopman en 2004 cuando combinó CA 19.9 y MIC-1 en los que obtuvo una AUC de 0.87 (Koopman, 2004), aunque en este estudio el número de pacientes fue mayor.

Cuando se compara el grupo de pancreatitis crónica (n=15) y el de adenocarcinoma pancreático (n=21), que son las patologías que presentan dificultades para realizar un diagnóstico diferencial, los mejores resultados se obtienen cuando se combinan CA 19.9, CEA, ST3 Gal III y *Glasgow prognostic score* con una sensibilidad de 90.5%, especificidad de 100% y AUC 0.983; resultados que mejoran los obtenidos por Koopman en 2006 cuando compara estas patologías, utilizando el marcador MIC-1 con los que obtuvo sensibilidad de 90% especificidad de 44% y AUC 0.81 (Koopman, 2006), aunque en este estudio la cohorte de pacientes fue también mayor.

Como el cáncer es un proceso multifactorial, las mejoras arriba descritas pueden ser debidas a que con la combinación de estos parámetros se valoran distintas características asociadas a las neoplasias como la inflamación (*Glasgow score*), glicosilación alterada (genes de sialiltransferasas) y marcadores tumorales clásicos.

El único inconveniente que presenta la metodología utilizada para la determinación de niveles de expresión de sialiltransferasas, es su complejidad—siendo necesaria mucha precaución en la recogida y mantenimiento de la muestra, ya que el mRNA es muy lábil. Sería bueno encontrar un método automático para la obtención de mRNA de sialiltransferasas en plasma, para poder mejorar el diagnóstico de adenocarcinoma pancreático de manera rutinaria en los laboratorios asistenciales.

IGF-1 e IGFBP3

La determinación de los niveles séricos del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) y su proteína de unión en suero IGFBP3, mostró en el grupo de 81 pacientes de la segunda parte del estudio, que los pacientes de neoplasias, tanto de páncreas (n=41) como otras neoplasias gastrointestinales (n=13), presentaban valores de IGF-1 e IGFBP3 significativamente inferiores a los de los controles (n=15) y a los de las pancreatitis crónicas (n=12). Los niveles disminuidos de IGF-I en adenocarcinoma de páncreas podrían explicarse por el bajo estado nutricional de estos pacientes (Bing, 2005), como se observó al detectar niveles inferiores de prealbúmina. También se describió correlación entre IGF-1 y la proteína C-reactiva, ya que la activación de la fase aguda está relacionada con el mecanismo que interviene en la pérdida de peso,

producida en los estados catabólicos como el cáncer (Bachmann, 2009). En cambio, el molar ratio que nos informa del IGF-I biológicamente activo, es similar en adenocarcinoma pancreático respecto a controles sanos, lo que indica que, a pesar del estado catabólico del adenocarcinoma pancreático con concentración plasmática disminuida de IGF-I, un elevado porcentaje del IGF-I es biológicamente activo.

El estudio de la utilización de IGF-I e IGFBP3 en combinación con CA 19.9 y CEA para mejorar la precisión diagnóstica en la diferenciación de pancreatitis crónica y adenocarcinoma ductal de páncreas, mostró que la combinación CA 19.9, CEA, IGF-I proporciona un AUC de 0.959, sensibilidad de 87.8, especificidad del 100%, valores superiores al CA 19.9 (AUC 0.884, sensibilidad de 87,8, especificidad del 91,7%).

A partir del modelo lineal generalizado (GLM) que se obtuvo de la curva ROC combinando CA 19.9, CEA, IGF-I y que permite clasificar los pacientes según el valor de probabilidad calculado por el modelo: por encima de 81.9 como PDAC, con una sensibilidad de 87.8%, y por debajo de 81.9 como PC, con un 100% de especificidad; éste se aplicó a nuevos pacientes incorporados recientemente al estudio. En particular, de 7 pacientes de los cuales tres eran PC y cuatro PDAC, el GLM calculó unas probabilidades de 72.5, 40.4 y 20.8 para las PC, con lo que se clasificaron correctamente, y probabilidades de 100, 100, 100, 100, para los cuatro PDAC, con lo que también se clasificaron correctamente. Ello muestra que este modelo facilita el diagnóstico diferencial entre PDAC y PC.

La combinatoria de marcadores utilizados de rutina en clínica, como son el IGF-1, CEA y CA19.9, abre una vía para mejorar el diagnóstico diferencial entre el adenocarcinoma pancreático y la pancreatitis crónica, aunque el número limitado de pacientes requiere una mayor cohorte para validar los resultados obtenidos y para verificar su utilidad clínica.

VI. CONCLUSIONES

1. La expresión en plasma de las α 2,3 sialiltransferasas ST3Gal III y ST3Gal IV se detectó en pacientes con cáncer pero no en controles, por lo que éstas determinaciones podrían ser útiles para la diferenciación de estos dos grupos. En cambio, no se pueden utilizar como marcadores independientes de diagnóstico de adenocarcinoma pancreático, ya que también se detectó mRNA de estas enzimas en pacientes con pancreatitis crónica y otras neoplasias del tracto gastrointestinal.
2. Los marcadores de fase aguda están aumentados en pancreatitis aguda, debido a que en esta patología la inflamación es más pronunciada que en el resto de grupos en los que se observó inflamación sostenida. Sin embargo, cuando se valoró la respuesta inflamatoria sistémica mediante el Prognostic Glasgow score, se encontraron diferencias entre PDAC y el resto de grupos: controles, pancreatitis crónica y otras neoplasias gastrointestinales.
3. La combinatoria de los niveles de las α 2,3 sialiltransferasas, Glasgow Pronostic score, CA19.9 y CEA supuso una mejora en la precisión diagnóstica del PDAC frente a los niveles de CA19.9, sólo o combinado con CEA. Sin embargo la dificultad metodológica para aplicar la determinación de las α 2,3 sialiltransferasas de rutina en un laboratorio clínico dificulta el posible uso de esta combinación de marcadores.
4. En la determinación en suero de marcadores relacionados con la insulina y el eje GH-IGF se observaron niveles más bajos de IGF-I y IGFBP3 en pacientes con cáncer debido probablemente a un proceso multifactorial como: resistencia a la GH asociada a procesos catabólicos, pérdida de peso asociada a la respuesta de fase aguda sistémica, y al inicio de desnutrición de estos pacientes asociado a la ictericia obstructiva.
5. La mejor combinación de marcadores para mejorar el diagnóstico del adenocarcinoma pancreático *versus* pancreatitis crónica se obtuvo al combinar el CA 19.9, el IGF-I y el CEA, logrando una especificidad del 100% y sensibilidad del 87,8%, lo que permitió clasificar correctamente el 100% de las muestras de pancreatitis crónicas analizadas.

VII. ANEXO

ANEXO 1

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS IMPLICADOS EN PROCESOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CARCINOMAS HUMANOS.

HOSPITAL UNIVERSITARI Dr. JOSEP TRUETA DE GIRONA

NOMBRE DEL INVESTIGADOR: M^a JOSÉ FERRI IGLESIAS

TELÉFONO DE CONTACTO: 972-940228 (Laboratorio Hospital Dr. Josep Trueta)

Estimado Sr.,

Su Doctor le ha solicitado participar en un estudio de un nuevo marcador para el adenocarcinoma pancreático que serviría para mejorar el diagnóstico de ese tipo de tumor.

El siguiente formulario le informará de los procedimientos a seguir, si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con su Doctor.

Antecedentes

Actualmente existe un marcador para los cánceres de origen gastrointestinal llamado antígeno carbohidratado 19.9 o CA 19.9 que es fácilmente detectable en suero. Sin embargo dicho marcador no es suficientemente específico ni sensible para el adenocarcinoma pancreático y no se detecta en etapas iniciales de la enfermedad (Warshaw y Fernández Del Castillo, 1992), lo que motiva la búsqueda de nuevas sustancias que puedan ser útiles en el diagnóstico del adenocarcinoma pancreático

El objetivo de este estudio es mejorar el diagnóstico del adenocarcinoma pancreático, poder detectarlo de manera precoz para poder aplicar el tratamiento adecuado lo antes posible. Para ello se quiere detectar un nuevo marcador del adenocarcinoma pancreático.

Se necesita suero de pacientes con adenocarcinoma de páncreas, de pacientes con pancreatitis crónica y suero de pacientes control. Se compararan los resultados obtenidos del marcador en los 3 grupos de pacientes.

A todos los pacientes que participen en el estudio se les realizará una extracción de sangre para evaluar el nuevo marcador.

Si usted es seleccionado para participar en el estudio y decide participar, ayudará a comprobar si el nuevo marcador en estudio puede ser efectivo, sensible y específico para un diagnóstico precoz y poder distinguir de manera más segura y fácil una patología benigna de una maligna

Usted podrá ser seleccionado si cumple los criterios de inclusión, que dependerán de la evaluación que su doctor efectuará de su historial clínico y de su propia decisión de participar.

Riesgos y efectos secundarios:

No existe ningún riesgo para usted ni ningún efecto secundario, ya que sólo se le extraerá sangre para poder realizar las analíticas correspondientes y validar la utilidad del marcador tumoral.

Posibles beneficios de su participación en el estudio:

Usted no obtendrá beneficios del estudio, pero en cualquier caso usted no se verá perjudicado por participar. Su participación podrá servir para desarrollar un nuevo método diagnóstico y en un futuro muchos otros pacientes podrían beneficiarse de los resultados.

Participación voluntaria

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Usted puede decidir no participar sin ninguna penalización ni pérdida de beneficio al que tendría derecho en este centro. Si retira su consentimiento de participación en el estudio antes de que el investigador haya finalizado el estudio, no se procesarán sus muestras.

Tratamiento de la muestra:

Las muestras de sangre se guardaran a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Las muestras se identificarán con un número, que se irá añadiendo secuencialmente manteniendo el anonimato del paciente. Sólo se conocerá a qué grupo pertenece.

Se guardaran hasta la finalización del presente estudio, en el Laboratori Clínic????no sé si lleva acento del Hospital Universitari Dr. Josep Trueta.

Si en cualquier momento usted decide que no quiere continuar participando en el estudio, se podrá poner en contacto con la investigadora principal del estudio, Sra Ferri, y se procederá a la inmediata eliminación de las muestras.

Confidencialidad

Toda la información médica utilizada durante el estudio será tratada con extrema confidencialidad, sin desvelar en ningún momento su nombre y apellidos.

Sus datos serán objeto de tratamiento disociado, de modo que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o identificable. Durante la realización del estudio, se le garantiza el estricto cumplimiento de la Ley 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos Personales. El investigador, cuando procese y trate sus datos, tomará las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados. A usted sólo se le identificará con un código y con el número del estudio. Su nombre o identidad no aparecerá en ningún informe, resultado o publicación relacionada con el estudio.

Retirada del estudio

Usted puede anular su participación en el estudio en cualquier momento, a través de una notificación por escrito al investigador principal. Si usted anula su consentimiento, su muestra de sangre sin procesar será eliminada por el investigador principal. Sin embargo, la anulación del consentimiento no afectará a los usos ni divulgaciones previas y su información médica previa, no será eliminada de los registros del estudio.

El presente protocolo de estudio ha sido revisado por el Comité Ético del Hospital Universitario Dr. J. Trueta de Girona.

Esperamos que después de leer este formulario, Usted estará suficientemente informado sobre los procedimientos del estudio. Su médico le contestará a cualquier pregunta o duda relacionada con este proyecto de investigación.

Muchas gracias.

Firma del médico

Fecha.

ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS IMPLICADOS EN PROCESOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CARCINOMAS HUMANOS.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Don/Doña....., manifiesta que ha sido informado sobre los beneficios que podría suponer la extracción de un volumen adicional de mi sangre para cubrir los objetivos del proyecto: **ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS IMPLICADOS EN PROCESOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CARCINOMAS HUMANOS.** Para así poder mejorar el diagnóstico de enfermedades del páncreas.

He sido informado de los posibles efectos adversos que la extracción de sangre puede tener sobre mi salud y bienestar.

He sido informado que mis datos personales serán protegidos de acuerdo con la Ley Orgánica Reguladora de esta materia y no serán usados sin mi consentimiento previo.

Comprendo que podré retirar libremente mi consentimiento en cualquier momento, a través de una notificación por escrito al investigador principal.

Comprendo que si anulo mi consentimiento, mi muestra de sangre sin procesar será eliminada por el investigador principal. Sin embargo, la anulación del consentimiento no afectará a los usos ni divulgaciones previas y su información médica previano será eliminada de los registros del estudio.

Tomando esto en consideración, Otorgo mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en este proyecto.

Presto libremente mi conformidad a participar en el estudio.

Girona, dede 20..

Firma del participante

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Perucho M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes. *Cell* 53(4):549-54.
- Anderson KE, Mack T, Silverman D. (2006). Cancer of the pancreas. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds Cancer epidemiology and prevention. 3rd Ed. New York Oxford: Oxford University Press.
- Anderson KE, Potter JD, Mack TM. Pancreatic cancer. (1996). In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds Cancer epidemiology and prevention. Oxford: Oxford University Press: 725-771.
- Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ. (1997). K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 112(4):1114-20.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. (1999). Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 18(1):65-73.
- Anker P, Mulcahy H, Stroun M. (2003). Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? *Int J Cancer* 103(2):149-52.
- Arvat E, Broglio F, Chigo E. (2000) Insulin-like growth factor I: implications in aging. *Drugs Aging* 16: 29-40
- Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM. (2004). Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 50(9):1668-70.
- Aubert M, Panicot L, Crotte C, Gibier P, Lombardo D, Sadoulet MO, Mas E. (2000). Restoration of α (1,2) fucosyltransferase activity decreases adhesive and metastatic properties of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 60(5):1149-56.
- Aubert M, Panicot-Dubois L, Crotte C, Sbarra V, Lombardo D, Sadoulet MO, Mas E. (2000). Peritoneal colonization by human pancreatic cells is inhibited by antisense FUT3 sequence. *Int J Cancer* 88(4):558-65.
- Bachmann J, Ketterer K, Marsch C, Fechtner K, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME. (2009). Pancreatic cancer-related cachexia: influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. *BMC Cancer* 9: 255.

- Balkau B, Barret-Connor E, Eschwege E, Richard JL, Claude JR, Ducimetiere P. (1993). Diabetes and pancreatic carcinoma. *Diabetes Metab* 19(5):458-462.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. (2001). *Lancet* 357(9255):539-45.
- Baxter RC, Martin JL, Beniac VA. (1989). High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J Biol Chem* 264 (20):11843-8.
- Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF. (2007). Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol* 52(6):1601-9.
- Benson AB. (2007). Adjuvant therapy for pancreatic cancer, one small step forward. *JAMA* 297(3): 311-313.
- Bentham J, Rodríguez-Arno J, Ross RJM. (1993). Acquired growth hormone resistance in patients with hypercatabolism. *Horm Res* 40(1-3):87-91.
- Bergmann U, Funatomi H, Yokoyama M, Beger HG, Korc M. (1995). Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* 55(10):2007-11.
- Bing C. (2005). Insight into the growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in cancer cachexia. *Br J Nutr* 93(6):761-3.
- Bipat S, Phoa SS, van Delden OM, Bossuyt PM, Gouma DJ, Laméris JS, Stoker J. (2005). Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic carcinoma: a meta-analysis. (2005). *J Comput Assist Tomogr* 29(4):438-445.
- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004. (2005). *Annals Oncol* 16(3):481-8.
- Brockhausen I, Schulzbach J, Kuhns W. (1998). Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat* 161(1-4):36-78.
- Burroughs KD, Dunn SE, Barrett JC, Taylor JA. (1999). Insulin-like growth factor-I: a key regulator of human cancer risk?. *J Natl Cancer Inst* 91(7):579-81.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. (2008). Tietz. Fundamentals of clinical chemistry. Sixth edition. Ed. Saunders Elsevier. ISBN: 978—0-7216-3865-2.

- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8(1):27-32.
- Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. (1994). Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 54(13):3568-73.
- Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Solé M, Capellà G, Lluís F, Fernández-Cruz L, Navarro S, Farré A. (1999). K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 17(2):578-84.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonal IC. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2(8):563-72.
- Chan JM, Stamfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M. (1998). Plasma Insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279(5350):563-6.
- Chan KCA, Lo YMD (2007). Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Br J Cancer* 96(5):681-85.
- Chen B, Liu S, Xu W, Wang X, Zhao W, Wu J. (2009). IGF-I and IGF-BP-3 and the risk of lung cancer: A meta-analysis based on nested case-control studies. *J Exp Clin Cancer Res* Jun 24;28:89.
- Chen C, Lewis SK, Voigt L, Fitzpatrick A, Plymate SR, Weiss NS. (2005). Prostate carcinoma incidence in relation to prediagnostic circulating levels of insulin-like growth factor I, Insulin-like Growth factor binding protein 3, and insulin. *Cancer* 103(1):76-84.
- Chen X, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy E, Meyer P, Stroun M, Anker P. (2000). Telomerase RNA as a Detection Marker in the serum of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 6(10):3823-6.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. (1996). Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 2(9):1033-5.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovanni A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30(7):1073-81.

- Comisión de Marcadores biológicos del Cáncer de la Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular (Comité científico). Marcadores tumorales serológicos. *Química clínica* (2007). 26(2):77-85.
- Dall'Olio F, Chiricolo M. (2001). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J*. 18:841-850.
- Dasí F, Lledó S, García-Granero E, Ripoli R, Marugán M, Tormo M, García-Conde E, Aliño SF. (2001). Real-time Quantification in Plasma of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) mRNA: A simple Blood Test to Monitor Disease in Cancer Patients. *Lab Invest* 81(5):767-9.
- Daughaday WH, Rotwein P. (1989). Insulin like growth factors I and II. Peptide, Messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10(1):68-91.
- Diamantopoulos N, Boutis A, Andreadis C, Galaktidou G, Zavos C, Papazisis K, Lalla E, Mouratidou D, Kortsaris. (2008). IGF-1 and IGFBP-3 in testicular germ cell tumors. *Cancer Therapy* 6:759-764.
- Douglas JB, Silverman DT, Pollak MN, Tao Y, Soliman AS, Stolzerberg-Solomon RZ. (2010). Serum IGF-I, IGF-II, IGFBP3 and IGF-I/IGFBP3 molar ratio and risks of pancreatic cancer in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19 (9):2298-2306.
- Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz C, Haglund VL, Holubec R, Klapdor A, Nicolini A, Topolcan O, Heinemann V. (2010). Tumor markers in pancreatic cancer: A European Group on tumor markers (EGTM) status report. *Ann Oncol* 21(3):441-7.
- Duffy MJ. (1996). The biochemistry of metastasis. *Adv Clin Chem* 32:135-66.
- Dvorak HF. Tumors; wounds that do not heal. (1986). Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315(26):1650-9.
- El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood J.M, Luketich JD, Godfrey TE. (2004). Characterization of amplifiable circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 50 (3):564-73.
- Engelken FJ, Bettschart V, Rahman MQ, Parks RW, Garden OJ. (2003). Prognostic factors in the palliation of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 29(4):368-73.
- Evans JD, Eggo MC, Donovan IA, Bramhall SR, Neoptolemos JP. (1997). Serum levels of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and their binding protein (IGFBP3) are not elevated in pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 22(2):95-100.

- Falconer JS, Fearon KC, Ross JA, Elton R, Wignore SJ, Garden OJ, Carter DC. (1995). Acute phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer* 75(8):2077-82.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. (2010). *Eur J Cancer* 46(4):765-81.
- Fidler IJ. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3(6):453-8.
- Firth SM, Baxter RC. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23(6):824-854.
- Fisher WE. (2001). Diabetes: risk factors for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg* 25(4):503-8.
- Fleischhacker M, Beinert T, Ermitsch M, Seferi D, Possinger K, Engelmann C, Jandrig B. (2001). Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 945:179-88.
- Fleischhacker M, Schmidt B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer- A survey. *Biochim Biophys Acta* 1775(1):181-232.
- Forrest LM, Mc Millan DC, Mc Ardle CS, Argerson WJ, Dunlop DJ. (2003) Evaluation of cumulative prognostic scores based on systemic inflammatory response in patients with inoperable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 89(6):1028-30.
- Fournié GJ, Martres F, Pourrat JP, Alary C, Rumeau M. (1993). Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology*. 39(4):215-21.
- Freire T, Robello C, Casaravilla C, Alvarez Errico D, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. (2002). Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parasites. *Actas de Fisiología* 8:89-107.
- Fukuda M. (1996). Possible roles of tumor associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* 56(10):2237-44.
- Fuster M, Esko. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *J Nat Res* 5(7):526-42.
- Gal S, Fidler C, Lo D, Chin K, Moore J, Harris AL, Wainscoat JS. (2001). Detection of Mammaglobin mRNA in the plasma of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 945:192-4.

- García JM, Peña C, García V, Domínguez G, Muñoz C, Silva J, Millán I, Díaz R, Lorenzo Y, Rodríguez R, Bonilla F. (2007). Prognostic Value of *LISCH7* mRNA in Plasma and Tumor of Colon Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 13(21):6351-58.
- García V, García JM, Peña C, Silva J, Domínguez G, Hurtado A, Alonso I, Rodríguez R, Provencio M, Bonilla F. (2006). Thymidylate Synthase Messenger RNA Expression in Plasma from Patients with Colon Cancer: Prognostic Potential. *Clin Cancer Res* 12 (7):2095-100.
- García V, García JM, Silva J, Peña C, Domínguez G, Lorenzo Y, Díaz R, Alonso I, Colas A, Hurtado A, Sánchez A, Bonilla F. (2008). Levels of VEGF-A mRNA in plasma from patients with colorectal carcinoma as possible surrogate marker of angiogenesis. *J Cancer Res. Clin Oncol* 134(11):1165-71.
- Giovannucci E. (2003). Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Horm Metab Res* 35(11-12):694-704.
- Glen P, Jamieson NB, McMillan D, Carter R, Imrie CW, McKay CJ. (2006). Evaluation of an inflammation-based prognostic score in patients with inoperable pancreatic cancer. *Pancreatology* 6(5):450-3.
- Goebel G, Zitt M, Zitt M, Müller HM. (2005). Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patient with solid neoplasias. *Dis Markers* 21(3):105-20.
- Golan T, Javle M. (2011). Targeting the insulin growth factor pathway in gastrointestinal cancers. *Oncology* 25(6):518-26.
- Gold DV, Modrak D, Ying Z, Cardillo TM, Goldenberg DM. (2006). New MUC1 serum immunoassay differentiates pancreatic cancer from pancreatitis. *J Clin Oncol* 24(2):252-8.
- Greenberg D, Earle C, Fang CH, Eldar-Lissai A, Neumann PJ. (2010). When is cancer care cost-effective? A systematic overview of cost-utility analyses in oncology. *J Natl Cancer Inst* 102(2):82-88.
- Grenacher L, Klauss M, Dukic L, Delorme S, Knaebel HP, Dux M, Kauczor HU, Büchler MW, Kauffmann GW, Richter GM. (2004). Diagnosis and staging of pancreatic carcinoma: MRI versus multislice-CT, a prospective study. *Rofo* 176(11):1624-33.
- Haglund C, Lindgren J, Roberts PJ, Nordling S. (1986). Gastrointestinal cancer-associated CA 19.9 in histological specimens of pancreatic tumours and pancreatitis. *Br J Cancer* 53(2):189-95.

- Hahn SA, Kern SE. (1995). Molecular genetics of exocrine pancreatic neoplasms. *Surg Clin North Am* 75(5):857-69.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Hruban RH, Kern SE. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at 18q21.1. *Science* 271(5247):350-3.
- Hakomori S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and shingo-(glycol)-lipid metabolism. *Cancer Res* 56(23):5309-18.
- Hakomori S. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(16):10231-3.
- Hall K, Enberg G, Ritzen M, Svan M, Fryklund L, Takano K. (1980). Somatomedin A levels in serum from healthy children and from children with hormone deficiency or delayed puberty. *Acta endocrinol (Copenh)* 94(2):155-65.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: The new generation. *Cell* 144(5):646-74.
- Hankinson SE, Willet WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M. Circulating concentrations of Insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. (1998). *Lancet* 351(9113):1393-6.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi M-A, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83(8):727-37.
- Hasselmann DO, Rappl G, Rössler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. (2001). Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep* 8(1):115-8.
- Hidalgo M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362(17):1605-17.
- Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. (2005). Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1725(1):128-35.
- Howes N, Neoptolemos JP. (2002). Risk of pancreatic ductal adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 51(6):765-66.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6(8):2969-72.

- Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. (2005). Type II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 92(11):2076-83.
- Ichikawa T, Erturk SM, Sou H, Nakajima H, Tsukamoto T, Motosugi U, Araki T. (2006). MDCT of pancreatic adenocarcinoma: optimal imaging phases and multiplanar reformatted imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 187(6):1513-20.
- Iwao T, Hiyama E, Yokoyama T, Tsuchida A, Hiyama K, Murakami Y, Shimamoto F, Shay J.W, Kajiyama G. (1997). Telomerase activity for the preoperative diagnosis of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 89(21):1621-23.
- Jacobs DS, DeMott W.R, Oxley, D.K. Laboratory test handbook. Ed Lexi-comp. 5th Ed. 2001.
- Jain KK. (2007). Cancer biomarkers: current issues and future directions. *Curr Opin Mol Ther* 9(6):563-71.
- Jiang JT, Wu CP, Deng HF, Lu MY, Wu J, Zhang HY, Sun WH, Ji M. (2004). Serum level of TSGF, CA 242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 10(11):1675-7.
- Jiang N, Pisetsky DS. (2005). The effect of inflammation on the generation of plasma DNA from dead and dying cells in the peritoneum. *J Leukoc Biol* 77(3):296-302.
- Johnson PJ, Lo YM. (2002). Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 48(8):1186-93.
- Jones L, Ghaneh P, Humphreys M, Neoptolemos JP. (1999). The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Ann NY Acad Sci* 30;880:288-307.
- Kaaks R, Lukanova A. (2001). Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc Nutr Soc* 60(1):91-106.
- Kamm RC, Smith A.G. (1972). Nucleic concentrations in Normal Human Plasma. *Clin Chem* 18(6):519-22.
- Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* 95(5):377-84.
- Kannagi R. (1997). Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in haematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* 14(5):577-84.

- Kannagi R. (2007). Carbohydrate antigen sialyl Lewis a – Its Pathophysiological significance and Induction mechanism in Cancer progression. *Chang Gung Med J* 30(3):189-209.
- Karna E, Surazynski A, Orlowski K, Laszkiewicz J, Puchlski Z, Nawrat P, Palka J. (2002). Serum and tissue level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding proteins as an index of pancreatitis and pancreatic cancer. *Int J Exp Path.* 83(5):239-45.
- Kazakoff K, Cardesa T, Liu J, Adrian TE, Bagachi M, Birt DF, Pour PM. Effects of voluntary physical exercise on high-fat diet- promoted pancreatic carcinogenesis in the hamster model. (1996). *Nutr Cancer* 26(3):265-79.
- Kessel D, Allen J. (1975). Elevated plasma sialyltransferase in the cancer patients. *Cancer Res* 35(3):670-2.
- Kim YJ, Varki A. (1997). Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* 14(5):569-76.
- Kim YS, Itzkowitz SH, Yuang M, Chung Y, Satake K, Umeyama J, Hakimori SH. (1988). Le^x and Le^y antigen expression in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 48(2):475-82.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. (1973). The occurrence of single stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* 52(1):198-204.
- Koopmann J, Rosenzweig CN, Zhang Z, Canto MI, Brown DA, Hunter M, Yeo C, Chan DW, Breit SN, Goggins M. (2006). Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA 19.9. *Clin Cancer Res* 12(2):442-6.
- Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. (2001). Circulating RNA as a tumor marker. Detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann NY Acad Sci* 945:172-8.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. (1999). Detection of Tumor Messenger RNA in the serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res* 5(8):1961-5.
- Korc M. (1998). Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 7(1):25-41.

- Kushner I. Acute phase reactants. Upto date 19.2 (Rev Mayo 2011). <http://www.uptodate.com/contents/acute-phase-reactants>
- Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Sumarokov SV, Kolomiets SA, Sevostianova NV, Vlassov VV. (2004). Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23(6-7):879-83.
- Lamerz R. (1999). Role of tumor markers, Cytogenetics. Review. *Ann Oncol Suppl.* 4:145-9.
- Larsson O, Girnita A, Girnita L. (2005). Role of insulin-like growth factor I receptor signalling in cancer. *Br J Cancer* 92(12):2097-101.
- Lee PD, Rosenfeld RG. (1987). Clinical utility of insulin growth factor assays. *Pediatrician* 14(3):154-61.
- Leelawat K, Leelawat S, Ratanachu-Ek T, Trubwongchareon S, Wannaprasert J, Tripongkaruna S, Chantawibul S, Tepaksorn P. (2006). Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 12(26):4195-8.
- Lees SW, Lee SY, Lee SR, Ju W, Kim SC. (2010). Plasma levels of insulin-like growth factor-1 and insulin growth factor binding protein-3 in women with cervical neoplasia. *J Gynecol Oncol* 21(3):174-80.
- Lehmann KJ, Diehl SJ, Lachmann R, Georgi M. (1998). Value of dual-phase-helical CT in the preoperative diagnosis of pancreatic cancer: a prospective study. *Rofo.* 168:211-6.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1976). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of the therapy. *Cancer Res* 37(3): 646-50.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. (2004). Pancreatic Cancer. *Lancet.* 363(9414): 1049-57.
- Liggett T, Melnikov A, Yi QL, Replogle C, Brand R, Kaul K, Talamonti M, Abrams RA, Levenson V. (2010). Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer* 116(7):1674-80.
- Lillemoe KD, Yeo CJ, Canerib JL. (2000). Pancreatic cancer: state of the art care. *CA Cancer J Clin.* 50(4):241-68.

- Lin Y, Tamakoshi A, Kikuchi S, Yagyu K, Obata Y, Ishibashi T, Kawamura T, Inaba Y, Kurosawa M, Motohashi Y, Ohno Y. (2004). Serum Insuline-like growth factor-I, Insuline-like growth factor binding protein-3 and the risk of pancreatic cancer death. *Int J Cancer* 110(4):584-88.
- Lledó S, García-Granero E, Dasí F, Ripoli R, García SA, Cervantes A, Aliño SF. (2004). Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis* 6:236-42.
- Lo D, Chan L, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan A, Lee J, Hjelm M, Jonson PJ, Huang DP. (1999). Quantitative Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus DNA in Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res* 59(6):1188-91.
- Lo KW, Lo D, Leung SF, Tsang YS, Chan L, Jonson PJ, Hjelm M, Lee J, Huang DP. (1999). Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus Associated RNA in the plasma of patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Clin Chem* 45(8):1292-4.
- Lo YM, Rainer T.H, Chan L.Y, Hjelm N.M, Cocks R.A. (2000). Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 46(3):319-23.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. (2006). Update of ASCO recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 24(33):5313-27.
- López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez Gómez B. Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Información disponible a diciembre 2003. <http://193.146.50.13Q/cancer/salud-cancer-2003.pdf>.
- López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez Gómez B. La situación del cáncer en España. Madrid, Spain: Ministerio Sanidad y Consumo de España 2005. <http://www.isciii.es/htdocs/pdf/cancer-msc.pdf>.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Amman RW, Lankisch JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 328(20):1433-7.
- Lu DSK, Vedantham S, Krasny RM, Kadell B, Berger WL, Reber HA. (1996). Two-phase helical CT for pancreatic tumors: pancreatic versus hepatic phase enhancement of tumor, pancreas, and vascular structures. *Radiology* 199(3):697-701.
- Luo J, Guo P, Matsuda K, Truong N, Lee A, Chun C, Cheng SY, Korc M. (2001). Pancreatic cancer cell-derived vascular endothelial growth factors is biologically active in vitro and enhances tumorigenicity in vivo. *Int. J. Cancer* 92(3):361-9.

- Lygidakis NJ, Sundeep Jain MS, Sacchi M, Vrachnos P. (2005). Adenocarcinoma of the Páncreas – Past, Present and Future. *Hepatogastroenterology* 52(64):1281-92.
- Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ. (1999). Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 91(23):620-5.
- Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. (1992). *Br J Cancer* 65(3):311-20
- Magnani JL. (2004). The discovery, Biology and drug development of sialyl Le^a and sialyl Le^x. *Arch Biochem Biophys* 426(2):122-31.
- Maitra A, Hruban RH. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3:157-88.
- Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Rusziewski P. (2002). *Gut* 51:849-852.
- Maltoni M, Caraceni A, Brunelli C, Broeckaert B, Christakis N, Eychmueller S, Glare P, Nabal M, Vigano A, Larkin P, De Conno F, Hanks G, Kaasa S. (2005). Prognostic factors in advanced cancer patients: evidence-based clinical recommendations – a study by the Steering Committee of the European Association for Palliative Care. *J. Clin Oncol* 23(25):6240-8.
- Malumbres M, Barbacid M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1:222-31.
- Marx J. (2004). Cancer Research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 306(5698):966-8.
- Mas E, Pasqualini E, Caillol N, El Battari A, Crotte C, Lombardo D, Sadoulet MO. (1998). Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: Comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. *Glycobiology* 8(6):605-13.
- Mattera D, Capuano G, Colao A, Pivonello R, Manguso F, Puzziello A, D'Agostino L. (2003). Increased IGF-I/IGFBP-3 ratio in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Endocrinol* 59(6):699-706.
- Max JB, Limburg PJ, Ogunseitan A, Stolzenbbert-Solomon RZ, Vierkant RA, Pollak MJ, Sellers TA, Virtamo J, Cerhan JR, Albanes D. (2008). IGF-I, IGF-BP-3, and IGF-I/IGF-BP-3 Ratio: No association with incident colorectal cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Cancer Epidemiol Biomarker* 17 (7):1832-4.

- Mazzoccoli G, Giuliani A, Bianco G, De Cata A, Balzanelli M, Carella AM, La Viola M, Tarquini R. (1999). Decreased serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I in patients with lung cancer at different stages of disease: temporal relationship to the surges of growth hormone (GH). *Anticancer Res* 19(2B):1397-9.
- McCarty MF. (2001). Insulin secretion as a determinant of pancreatic cancer risk. *Med Hypotheses* 57(2):146-50.
- Mckenna S, Eatock M. (2003). The medical management of pancreatic cancer. *Oncologist*. 8(2):149-60.
- McMillan DC, Canna K, McArdle CS. (2003). Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 90(2):215-9.
- Meezan E, Wu H, Black PH, Robbins PW. (1969). Comparative studies on carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* 8(6):2518-24.
- Meggiato T, Plebani M, Basso D, Panozzo MP, Del Favero G. (1999). Serum Growth factors in Patients with pancreatic cancer. *Tumour Biol* 20(2):65-71.
- Meisterfeld R, Ehehalt F, Saeger HD, Solimena M. (2008). Pancreatic disorders and Diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116 Suppl. 1:S7-S12.
- Melnikov AA, Scholtens D, Talamonti MS, Bentrem DJ, Levenson VV. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 99(2):119-22.
- Miura N, Maeda Y, Kanbe T, Yazama H, Takeda Y, Sato R, Tsukamoto T, Sato E, Marumoto A, Harada T, Sano A, Kishimoto Y, Hirooka Y, Murawaki Y, Hasegawa J, Shiota G. (2005). Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 11(9):3205-9.
- Miura N, Shiota G, Nakagawa T, Maeda Y, Sano A, Marumoto A, Kishimoto Y, Murawaki Y, Hasegawa J. (2003). Sensitive Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase mRNA in the Serum of Patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 64(4):4304.
- Molina R, Filella X, Augé JM, Escudero JM. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Estado actual y perspectivas de futuro III. Roche Diagnostics Ed. 2011.

- Molina R, Filella X, Ballesta AM. (1994). Marcadores tumorales, teoría o realidad. *Med Clin*. 102(5):189-95.
- Molina R, Filella X, Ballesta AM. (1998). Los marcadores tumorales. *Med Integral*. 31:80-90.
- Moschos SJ, Mantzoros CS. (2002). The role of IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63(4):317-32.
- Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, Chen X, Anker P, Alstead E.M, Ballinger A, Farthing M.J, Stroun M. (1998). A prospective study of *K-ras* mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 4(2):271-5.
- Mullis KB, Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50.
- Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, Van Heerden JA. Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*. 44(5):304-18.
- Nakamori S, Nishihara S, Ikehara Y, Nagano H, Dono K, Sakon M, Narimatsu H, Monden M. (1999). Molecular mechanism involved in increased expression of sialyl Lewis antigens in ductal carcinoma of the pancreas. (1999). *J Exp Clin Cancer Res* 18(3):425-32.
- Nan B, Shao D, Chen H, Huang Y, Gu J, Zhang Y, Wu Z. (1998). Alteration of N-acetylglucosaminyltransferases in pancreatic carcinoma. *Glycoconj* 15(10):1033-7
- Navarro S, Pérez-Mateo M, Guarner L. Tratado de páncreas exocrino. Ediciones médicas. S.L. 2002.
- Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. (1996). Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 2:1035-7.
- Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. (2002). Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and Healthy individuals. *Clin Chem* 48(8):1212-7.
- Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, Wang CF, Wang J, Tian YT, Liu Q, Xu DK, Zhao P. (2005). The clinical value of serum CEA, CA 19-9 and CA 242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *EJSO* 31(2):164-9.
- Novakovic S, Hocevar M, Zgajnar J, Besic N, Stegel V. (2004). Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer. *Oncol Rep* 11(1):245-52.

- O'Driscoll. (2007). L. Extracellular Nucleic Acids and their Potential as Diagnostic, Prognostic and Predictive Biomarkers. *Anticancer Res* 27(3A):1257-66.
- O'Gorman P, McMillan DC, McArdle CS. (2000). Prognostic factors in advanced gastrointestinal cancer patients with weight loss. *Nutr Cancer* 37(1):36-40.
- Ohmura E, Okada M, Onoda N, Kamiya Y, Murakami H, Tsushima T, Shizume K. (1990). Insulin-like growth factor I and transforming growth factor α as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res* 50(1):103-7.
- Okamoto I, Munakata M, Miyazaki M, Satoh T, Takahata T, Takamatsu Y, Muto Osamu, Koike K, Ishitani K, Mukaiyama T, Sakata Y, Nakagawa K, Tamura K. (2010). Disturbance of the growth hormone – insulin-like growth factor-1 axis associated with poor performance status in patients with solid tumors. *Jpn J Clin Oncol* 40(3):222-6
- Okarvi SM. (2008). Peptide-based radiopharmaceutical and cytotoxic conjugates: Potential tools against cancer. *Cancer Treat Rev* 34(1):13-26.
- Oliver SE, Holly J, Peters TJ, Donovan J, Persad R, Gillat D, Pearce A, Hamdy FC, Neal DE, Gunell D. (2004). Measurement of insulin-like growth factor axis does not enhance specificity of PSA-based prostate cancer screening. *Urology* 64(2):317-22.
- Orntoft TF, Greenwell P, Clausen H, Watkins WM. (1991). Regulation of the oncodevelopmental expression of type 1 chain ABH and Lewis (b) blood group antigens in human colon by alpha-2-L-fucosylation. *Gut* 32(3):287-93.
- Orntoft TF, Vestergaard EM. (1999). Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 20(2):362-371.
- Orozco AF, Lewis DE. (2010). Flow cytometric analysis of circulating micro-particles in plasma. *Cytometry* 77(6):502-514.
- Papadopoulou E, Davilas E, Sotiriou V, Koliopoulos A, Aggelakis K, Dardoufas K, Agnanti NJ, Karydas G, Nasioulas G. (2004). Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate cancer. *Oncol Res* 14(9):439-45.
- Parra MD, Olmedilla B, Deulofeu R. Valoración del estado nutricional por el laboratorio. (2007). Cap 10. Ed. Comité de publicaciones de la Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular.
- Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd P, de Llorens R. (2008). Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Mark* 25(4-5):207-18.

- Peracaula R, Tabares G, Lopez-Ferrer A, Brossmer R, Bolos de C, Llorens de R. (2005). Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumor cells. *Glycoconj J* 22(3):132-42.
- Pérez-Garay M, Arteta B, Pagès L, de Llorens R, de Bolòs C, Vidal-Vanaclocha F, Peracaula R. (2010). alpha2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances its metastatic potential in vivo. *PLoS One* 5(9) pii:e12524
- Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. (2006). The blood peptidoma: A higher dimension of information content for marker biomarker discovery. *Nat Rev Cancer* 6(12):961-7.
- Phillips TJ, Salman SM, Bhawan J, Rogers GS. (1998). Burn scar carcinoma. Diagnosis and management. *Dermatol Surg* 24 (5):561-5.
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson E. (2004). Insuline-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev* 4(7):505-18.
- Ramsey S, Lamb GW, Aithchison M, Graham J, Mc Millan D. (2006). Evaluation of an inflammation-based Prognostic Score in Patients with metastatic renal cancer. *Cancer* 109(15):205-12.
- Reddi KK, Holland JF. (1976). Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Scci* 73(7):2308-10.
- Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. (2004). Insuline-like growth factor (IGF)-I binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363(9418):1346-53.
- Rösch T, Hofrichter K, Frimberger E, Meining A, Born P, Weigert N, Allescher HD, Classen M, Barbur M, Schenck U, Werner M. ERCP or EUS for tissue diagnosis of biliary structures? A prospective comparative study. (2004). *Gastrointest Endosc* 60(3):390-6.
- Ross RJM, Chef SL. (1995). Acquired growth hormone resistance. *Eur J Endocrinol* 132(6):655-60.
- Rumore M, Steinman CR. (1990). Plasma Endogenous circulating DNA in systemic lupus erytematous, ocurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 86(1):69-74.
- Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Takagi H, Matsumoto T, Itoh H, Nagakawa T, Miyakawa H, Muraoka S, Fujinaga A, Suga T, Satoh M, Itoh F, Imai K. (2003).

- Differential roles of alterations of p53, p16 and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Oncol Rep* 10(1):21-25.
- Satomura Y, Sawabu N, Takemori Y, Ohta H, Watanabe H, Okai T, Watanabe K, Matsuno H, Konishi F. (1991). Expression of various sialylated carbohydrate antigens in malignant and non-malignant pancreatic tissues. *Pancreas* 6(4):448-58.
- Schueller G, Schima W, Schueller-Weidekamm C, Weber M, Stift A, Gnant M, Prokesch R. Multidetector row CT of the pancreas: effects of contrast material flow rates and individualized scan delay on enhancement of the pancreas and tumor contrast. (2006). *Radiology* 241(2):441-8.
- Schutte M, Hubran RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57(15):3126-30.
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11(6):426-437.
- Scott HR, McMillan DC, Forrest LM, Brown DJF, McArdle CS, Milroy R. (2002). The systemic inflammatory response, weight loss, performance status and survival in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 87(3):264-7.
- Seki K, Suda T, Aoyagi Y, Sugawara S, Natsui M, Motoyama H, Shirai Y, Sekine T, Kawai H, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M, Asakura H. (2001). Diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma by detection of Human telomerase Reverse transcriptase Messenger RNA in pancreatic juice with sample quantification. *Clin Cancer Res* 7(7):1976-81.
- Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Nguyen M. (2001). p53 mutations in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 7(8):2222-7.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. (1983). Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51(11):2116-20.
- Shi C, Daniels JA, Hruban RH. (2008). Molecular characterization of pancreatic neoplasms. *Adv Anat Pathol* 15(4):185-95.
- Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li XC, Xie K. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of

- vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. (2001). *Cancer Res* 61(10):4143-54.
- Shimoda M, Katoh M, Kita J, Sawada T, Kubota K. (2010). The Glasgow Prognostic Score is a good predictor of treatment outcome in patients with unresectable pancreatic cancer. *Chemotherapy* 56(6):501-506.
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. (2011). Cancer statistics 2011. The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 61(4):212-36.
- Silva J, Rodríguez R, García JM, Muñoz C, Silva J, Domínguez G, Provencio M, España P, Bonilla F. (2002). Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut* 50(4):530-4.
- Silva J, Silva JM, García V, García J.M, Domínguez G, Bonilla F. (2002). RNA is more sensitive than DNA in identification of breast cancer patients bearing tumor nucleic acids in plasma. *Genes Chromosomes Cancer* 35(4):375-6.
- Silva J.M, Domínguez G, García JM, González R, Villanueva MJ, Navarro F, Provencio M, San Martín S, España P, Bonilla F. (1999). Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicpathological correlations. *Cancer Res* 59(13):3251-6.
- Silva JM, Domínguez G, Silva J, García JM, Sanchez A, Rodríguez O, Provencio M, España P, Bonilla F. (2001). Detection of epithelial Messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognostic tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 7(9):2821-5.
- Silva JM, García V, García JM, Peña C, Domínguez G, Diaz R, Lorenzo Y, Hurtado A, Sánchez A, Bonilla F. (2007). Circulating *Bmi-1* mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 9(4):R55.
- Silva JM, González R, Domínguez G, García JM, España P, Bonilla F. (1999). TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Gene Chromosomes Cancer* 24(2):160-1.
- Silva JM, Rodriguez R, García JM, Muñoz C, Silva J, Domínguez G, Provencio M, España P, Bonilla F. (2002). Detection of epithelial tumor RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advances stages and circulating tumor cells. *Gut* 50(4):530-4.

- Silva JM, Silva J, Sánchez A, García JM, Domínguez G, Provencio M, Sanfrutos L, Jareño E, Colas A, España P. (2002). Tumor DNA at plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor for disease –free survival. *Clin Cancer Res* 8(12):3761-6.
- Simeone DM, Ji B, Banerjee M, Arumugam T, Li D, Anderson MA, Bamberger AM, Greenson J, Brand RE, Ramachandran V, Logsdon CD. (2007). CEACAM1 a novel serum biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas* 34(4):436-43.
- Sinn HP, Brown SA, Oberle E, Thompson JS. (1992). Analysis of the Lewis x epitope in human pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 11(2):125-35.
- Sohn TA, Yeo CJ. (2000). The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: a review. *Surg Oncol* 9(3):92-101.
- Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD. (2000). Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 4(6): 567-79.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:67-71.
- Soto JL, Barbera VM, Saceda M, Carrato A. (2006). Molecular biology of exocrine pancreatic cancer. *Clin Transl Oncol* 8(5):306-12.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. (2003). Quantification of Free circulating DNA as a Diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 21(21): 3902-8.
- Steinberg W. (1990). The clinical utility of the CA 19.9 tumor associated antigen. *Am J Gastroenterol* 85(4):350-5.
- Steinman CR. (1975). Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest.* 56(2):512-5.
- Stolzenberg-Solomon R.Z, Limburg P, Pollak M, Taylor P.R, Virtamo J, Albanes D. (2004). Insuline-like growth factor (IGF)-1, IGF-binding protein-3, and pancreatic cancer in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(3):438-44.
- Stolzenberg-Solomon RZ, Graubard BI, Chari S, Limburg P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. (2005). Insulin, Glucosa, Insulin Resistance and Pancreatic Cancer in male smokers. *Jama* 294(22):2872-8.

- Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. (1987). Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23(6):707-12.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46(5):318-22.
- Su WW, Lee KT, Yeh YT, Soon MS, Wang CL, Yu ML, Wang SN. (2010). Association of circulating insulin-like growth factor 1 with hepatocellular carcinoma: one cross-sectional correlation study. *J Clin Lab Anal* 24(3):195-200.
- Suehara N, Mizumoto K, Kusumoto M, Niiyama H, Ogawa T, Yamaguchi K, Yokohata K, Tanaka M. (1998). Telomerase activity detected in pancreatic juice 19 months before a tumor is detected in a patient with pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 93(10):1967-71.
- Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K, Sato A, Suga K, Hayashi S, Nagasawa K, Nakachi K. (2005). Detection of plasma *hnRNP B1* mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung cancer* 48:77-83.
- Taback B, Fujiwara Y, Wang HJ, Foshag LJ, Morton DL, Hoon DS. (2001). Prognosis significance of circulating microsatellite markers in the plasma of melanoma patients. *Cancer Res* 61(15):5723-6.
- Takashima S, Tachida Y, Nakagawa T, Hamamoto T, Tsuji S. (1999). Quantitative analysis of expression of mouse sialyltransferase gene by competitive PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 260(1):23-7.
- Takashima S, Tsuji S, Tsujimoto M. (2002). Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6sialyltransferase (ST6GalIII), which sialylates Gal beta1,4GInAc structures on oligosaccharides preferentially. *J Biol Chem* 277(48):45719-28.
- Takayama R, Nakagawa H, Sawaki A, Mizuno N, Kawai H, Tajika M, Yatabe Y, Matsuo K, Uehara R, Ono K, Nakamura Y, Yamao K. (2010). Serum tumor antigen REG4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 45(1):52-9.
- Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, Di Francesco V, Vaona B, Bovo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G. (1999). Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol* 94(5):1253-60.

- Tan E.M, Schur PH, Carr RI, Kunlel HG. (1966). Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* 45(11):1732-1740.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15(1):80-101.
- TNM classification of malignant tumours. UICC (International Union Against Cancer). 7^a Edition. Ed Willey-Blackwell.
- Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M, Yoshida T. (2010). Insulin-like growth factor-I receptor in proliferation and motility of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 16(15):1854-8.
- Travis JC. 1. Clinical Radioimmunoassay - State of the Art. Anaheim: Scientific Newsletters, Inc. Radioassay-Ligand Assay, Publishers, 1980: 89-92.
- Ueno H, Okada S, Okusaka T, Ikeda M. (2000). Prognostic factors in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma receiving systemic chemotherapy. *Oncology* 59(4):296-301.
- Ünsal E, Köksal D, Yurdakul AS, Atilcan S, Cinaz P. (2005). Analysis of insulin like growth factor 1 and insulin like growth factor binding protein 3 levels in bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with lung cancer. *Respir Med* 99(5):559-65.
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, Hoon DSB. (2006). Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal cancer or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 52(6):1062-9.
- Van den Steen, P, Rudd P, Dwek R, Opdenakker G. (1998) Concepts and principles of Olinked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33(3):151-208.
- Van Gulik TM, Moojen TM, van Geenen R, Rauws EA, Obertop H, Gouma DJ. (1999). Differential diagnosis of focal pancreatitis and pancreatic cancer. *Ann Oncol* 10 (suppl4):85-88.
- Varki NM, Varki A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab. Invest* 87(9):851-7.
- Varki, A, Kannagi R Toole B. (2008). Glycosylation Changes in Cancer. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart G, Etzler M. New York, Cold Spring Harbour Laboratory press.

- Varki A and Sharon N. (2008). Historical Background and Overview. Essentials of Glycobiology. 2nd ed. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart G and Etzler M. New York, Cold Spring Harbour Laboratory press.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. (1994) Point mutations of de N-ras gene in the blood plasma of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 86:774-9.
- Vonlaufen A, Wilson JS, Apte MV. (2008). Molecular mechanisms of pancreatitis: Current opinion. *J Gastroenterol Hepatol* 23(9):1339-48.
- Wang F, Herrington M, Larsson J, Permert J. (2003). The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Mol Cancer* Jan 6; 2:4
- Wang P-H. (2005). Altered glycosylation in cancer: Sialic acids and sialyltransferases. *J Cancer Mol* 1(2):73-81.
- Weiser MM, Wilson JR. (1981). Serum levels of glycosyltransferases and related glycoproteins as indicators of cancer: biological and clinical implications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 14(3):189-239.
- Whitcomb DC. (2004). Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(2):G315-9.
- Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Aragani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. (2000). Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60(7):2002-6.
- Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. (2007). Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 132(4):1557-73.
- Wolpin BM, Michaud DS, Giovannucci EI, Schernhammer ES, Stampfer MJ, Manson JE, Cochrane BB, Rohan TE, Ma J, Pollak MN, Fuchs CS. (2007). Circulating Insuline-like growth factor binding protein-1 and the risk of pancreatic cancer. *Cancer Res* 67(16):7923-8.
- Wolpin BM, Michaud DS, Giovannucci EI, Schernhammer ES, Stampfer MJ, Manson JE, Cochrane BB, Rohan TE, Ma J, Pollak MN, Fuchs CS. (2007). Circulating Insuline-like growth factor axis and the risk of pancreatic cancer in four prospective cohorts. *Br J Cancer* 97(1):98-104.

- Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, Lee KC, Lo YM. (2004). Quantification of plasma beta-catenin in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* 10(5):1613-7.
- Woodson K, Tangrea JA, Pollak M, Copeland TD, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. (2003). Serum insulin-like growth factor I: Tumor marker or etiologic factor?. A prospective study of prostate cancer among finnish men. *Cancer Res* 63(15):3991-4.
- Wu Y, Yahar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D. (2002). Circulating insulin-like growth factor-1 levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 62(4):1030-5.
- Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Auki T, Higaki N, Sugimoto K, Akagi K, Fujiwara Y, Nishisho I, Sakon M, Gotoh M, Monden M. (1998). Detection of *K-ras* Gene Mutations in Plasma DNA of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: Correlation with Clinicopathological Features. *Clin Cancer Res* 4(6):1527-32.
- Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X. (1999). Plasma levels of Insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* 91(2):151-6.
- Zweig MH, Campbell G. (1993). Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39(4):561-577.