



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
CÁNCER

“ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE ESTROMA DESMOPLÁSICO Y DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA CON LA SOBREVIVENCIA DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
BIÓL.DAMIÁN SÁNCHEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS. UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN
ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA INSTITUTO
NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
DR. MARCO VELASCO VELÁZQUEZ. DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. MARCO TEÓRICO.....	15
3.1 Adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC).....	15
3.1.1 Descripción de la enfermedad: Epidemiología	15
3.1.2 Descripción de la enfermedad: Histología y carcinogénesis.....	16
3.1.3 Patología de la enfermedad: Signos, síntomas y causas.....	18
3.1.4 Diagnóstico y terapia.....	23
3.2 ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SOBREVIDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON PDAC.....	27
3.2.1 Estadio clínico.....	27
3.2.2 Grado histológico de diferenciación	28
3.3 CÉLULAS ESTROMALES Y SU FUNCIÓN EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL DE PÁNCREAS.	31
3.3.1 Desmoplasia	31
3.3.2 Células estromales que ocasionan la desmoplasia	33
Células estelares pancreáticas (PSC's)	34
Fibroblastos provenientes de la médula ósea	37
Fibroblastos residentes del páncreas.....	37
Células Troncales Mesenquimales	38
3.3.3 Matriz extracelular: factores secretados por los fibroblastos asociados a cáncer y las células tumorales y su papel en el desarrollo del tumor	40
3.4 MARCADORES DE ESTROMA DESMOPLÁSICO Y DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA (TEM) EN PDAC	47
3.4.1 α -SMA, fibronectina y vimentina como marcadores de estroma desmoplásico y su asociación clínica con PDAC	47
3.4.2 EpCAM, Pancitoqueratina y vimentina como marcadores de TEM y su asociación clínica con PDAC.....	50
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	55
5. JUSTIFICACIÓN.....	56

6. HIPÓTESIS	56
7. OBJETIVOS	57
Objetivo General:	57
Objetivos particulares:	57
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
8.1 Pacientes y muestras.....	58
8.2 Diseño del microarreglo de tejidos (TMA) para PDAC.	60
8.3 Detección de los marcadores α -SMA, fibronectina, vimentina, EpCAM y pancitoqueratina en los TMAs de PDAC por inmunohistoquímica (IHC).....	62
8.4 Procedimiento de Evaluación de Inmunohistoquímica	64
8.5 Análisis estadísticos.....	65
9. RESULTADOS	67
9.1 Hallazgos histopatológicos	67
9.3 Variables clínico-patológicas y su asociación con los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM	74
9.4 La expresión alta de marcadores de estroma desmoplásico y TEM se asocian con una menor sobrevida por estadio clínico y grado de diferenciación.	78
10.DISCUSIÓN.....	88
11. CONCLUSIÓN.....	97
12. PERSPECTIVAS	98
13. BIBLIOGRAFÍA.....	99

AGRADECIMIENTOS.

- Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por el financiamiento de este proyecto bajo el No. De protocolo R-2016-3602-37.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (99097191). Coordinación de Unidades Médicas de Alta Especialidad y a la Coordinación de Investigación en Salud. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Oncología. Dirección de Educación e Investigación en Salud y al Fondo de Investigación en Salud por el apoyo brindado durante mi proyecto de doctorado.
- Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas UIMEO, Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Donde realicé el proyecto. Dra. Patricia Piña Sánchez, Dr. Héctor Mayani Viveros investigadores en esta unidad que participaron con colaboraciones importantes en sus laboratorios para realizar este trabajo, a la bióloga Ana Karen Martínez Lara por su aportación en la búsqueda de datos para la realización de este proyecto, así como al candidato a Dr. Galo Abad Méndez Matías y los histotecnólogos Daniel Enrique Ramírez, Miguel Ángel Sandoval Hernández, Alam Palma Guzmán por su apoyo como profesionales en el uso de equipos de procesamiento de tejidos, inmunohistoquímica y análisis de imagen.

- Servicio de Patología, UMAE Hospital de Oncología. Al Dr. Fernando Aureliano Candanedo González por la revisión del material biológico, la concepción, y el asesoramiento en la idea original del proyecto. A la Dra Jazmín de Anda González por su aportación en la recopilación y selección del material biológico utilizado en el proyecto.
- Laboratorio de Nicho y Microambiente Hematopoyético. A la Dra. Eugenia Flores Figueroa por sentar las bases del proyecto y quien me asesoró en la entrevista para el ingreso al programa de Doctorado Directo en Ciencias Biomédicas, por parte de la Facultad de Medicina UNAM. A mis compañeros y amigos de trabajo, quienes enriquecieron con sus opiniones académicas el inicio de mi proyecto de investigación. Gracias por su compañía y amistad Alicia, Berenice, Ian, Dania, Víctor y Mónica les conservo en mi memoria con cariño.
- Departamento de sarcomas, UMAE Hospital de Oncología. Al Dr. Rafael Medrano Guzmán y al médico Luis Enrique García Rios por permitirme participar de primera mano en los seminarios y juntas matutinas de su grupo médico de alta especialidad en la evaluación de casos diagnosticados como cáncer de páncreas.
- Laboratorio de Centro de instrumentos, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Al Dr. Vadim Pérez Koldenkova por su asesoramiento y apoyo para utilizar el equipo de escaneo y análisis de imagen que nos permitió obtener los datos para nuestra evaluación estadística.
- Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Juan Badiano. A la Dra. Sara Rodríguez Enríquez por su asesoramiento académico en la realización del proyecto, así como por involucrarme en los seminarios de su grupo de investigación que aportaron a mi formación

profesional las herramientas necesarias para el análisis de información y presentación de datos. A la Dra. Silvia Cecilia Pacheco Velázquez por su asesoramiento clave en el desarrollo de las pruebas estadísticas que fungieron como la base del enfoque del proyecto.

- Departamento de Farmacología y Unidad Periférica de Investigación en Biomedicina Traslacional (CMN 20 de noviembre, ISSSTE), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Al Dr. Marco Velasco Velázquez por su asesoramiento académico en la realización del proyecto, así como en sus sugerencias a lo largo de mi trayectoria como estudiante de doctorado.
- Unidad de Investigación Médica en Enfermedades infecciosas y parasitarias, Hospital de pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Al Dr. Alejandro Gómez Delgado por su asesoramiento en la modificación de la base estadística del proyecto para su optimización al realizar las pruebas estadísticas utilizadas.
- Laboratorio de Células Troncales Mesenquimales. A todos los miembros de este equipo de trabajo, a quienes agradezco su apoyo durante mi estancia, en los seminarios semanales de investigación donde tuve la oportunidad de presentar mis avances del proyecto de doctorado, por su amistad dentro del laboratorio y fuera de él. En especial agradezco al Dr. Juan José Montesinos Montesinos por su experiencia profesional como tutor, su asesoramiento en el enfoque del proyecto fue clave para el desarrollo de este, además de integrarme como parte de su equipo de trabajo en su laboratorio y apoyarme antes de y después de la candidatura, paso importante en mi formación académica.

- A mi esposa Rosa María Sánchez Sandoval, porque llegaste en el momento indicado a mi vida. Has sido crucial como apoyo desde que nos conocimos hasta el día de hoy, por impulsarme, por confiar en mí, por tu paciencia y amor incondicional hacia mi persona, este paso en nuestro matrimonio no lo doy solo, lo doy a lado tuyo. Te amo Rose, que vengan muchas más alegrías a nuestras vidas en lo profesional y en lo familiar.
- A mis padres Leopoldo Fermín Sánchez Arenas y Laura Ramírez Almanza quienes siempre depositaron su confianza en mi persona, porque me dieron la dicha de vivir, por todas las enseñanzas que aún hoy en día me hacen crecer, los amo con todo mi corazón.
- A mis suegros Armando Sánchez Trejo y Laura Sandoval Reyes por todo el apoyo brindado durante esta etapa, por su cariño, consejo y confianza en mi persona. A mi cuñada Laurita por recordarme que la tenacidad logra frutos.
- Al Señor Alfredo Sánchez Trejo por todo el apoyo brindado hacia mi familia.
- A Miguel Ángel Báez Calderón por todo su cariño y apoyo a la familia.
- A mis padrinos Mauricio Ramírez Almanza, Maria de la Luz Sánchez Arenas.
- A Daniel Sánchez Arenas, Emilia Ávila Cervantes, Marcela de los Ángeles Sánchez Arenas, Beatriz Ramírez Almanza, Osmani Montesinos Estrada, Luis Francisco Sánchez Arenas y Leonardo Roberto Sánchez Pérez por su cariño, amor y apoyo en mi camino profesional.

- A mi familia Sánchez Ramírez y Sánchez Sandoval por el cariño, afecto y apoyo incondicional hacia mi esposa y mi persona.
- A mis amigos y compañeros de la UIMEO, gracias por tantos años, por las alegrías que disfrutamos y por todo su cariño.
- A Sonia Daniela Sánchez Ávila, gracias por todo tu cariño, amor y apoyo en nuestra etapa juntos, y en nuestro crecimiento profesional.
- A Verónica Alejandra Mayorga Ramírez, porque siempre estas al pendiente de mí, gracias por todo tu cariño y amor.
- A mis amigos incondicionales en mi vida y durante mi proceso de doctorado, Hugo, Mayte, Armando, Aketzali, Ana Montero, Scarlett, Margarita, Aline, Mely, Itzayana, Felipe Aragón, Elizabeth Sánchez, Raúl Rodríguez y familia, Jorge Vergara, Lupita, Carlos Valencia, Michel Cruz, Johnatan Martínez, Yael, Marco Pineda, Jesús Vergara, Mariana, Carmelo, Mitzi, Vaniamin, Oswaldo, Rafael, Jake, Roberto, Abi, Galo, Omar, Rubí, Rafita, Marianita, Patty, Sandy, Luz, Juan Carlos, Jussara, Dalia, Gilberto, Miguel, Jonathan Garcia, Jannet, Anna Karen, Bere, Alicia, Ian, Cindy, Diana, Anita, Paco, Eder, Sil y Fernando Candanedo.
- En especial a Pablo Eduardo Martínez Velasco, Maria Antonieta Guadalupe Sánchez Perez, Carlos Sánchez Gonzalez, Raúl García Vanegas, Elvira Arenas Almazán, Leopoldo Sánchez Benítez, Concepción Almanza Saucedo, Elías Ramírez López, Nazareth Ríos Armenta, Fernando Colorado Rios, Rogelio Orlando Monroy Castillo “Roy” y al profesor Luis Samuel Campos Lince por los momentos compartidos que quedaran intactos en la memoria y el corazón. Para ustedes con cariño.

"He vuelto a enamorarme de las cosas sencillas, vivir es abarcar al sol "

(Laura Ramírez Almanza, 1994)

Tears in heaven.

Would you know my name

If I saw you in heaven?

Would it be the same

If I saw you in heaven?

I must be strong

And carry on

'Cause I know, I don't belong

Here in heaven

Would you hold my hand

If I saw you in heaven?

Would you help me stand

If I saw you in heaven?

I'll find my way

Through night and day

'Cause I know, I just can't stay

Here in heaven

Time can bring you down

Time can bend your knees

Time can break your heart

Have you begging please

Begging please

Beyond the door

There's peace, I'm sure

And I know there'll be no more

Tears in heaven.

Eric Clapton.

Para todas aquellas personas especiales en nuestra vida que nos han dejado, con cariño y amor.

1. RESUMEN

El adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC, por sus siglas en inglés *pancreatic ductal adenocarcinoma*) es el tumor maligno con el mayor índice de letalidad a nivel mundial. Si bien este tipo de cáncer no es el más frecuente en cuanto a incidencia se refiere, es una enfermedad silenciosa que se detecta mayormente en estadios clínicos avanzados, de rápida progresión, resistente al tratamiento convencional (quimioterapia y radioterapia). En la mayoría de los casos el tumor es irreseccable, aún pacientes que son candidatos a cirugía (menos del 20%), tienen una supervivencia de 20% a 5 años. Todas estas características en conjunto hacen del PDAC un tumor intratable, con un pronóstico desfavorable.

Sin embargo, a pesar de que el 80% de los casos de PDAC tienen una supervivencia menor del 9%, se desconoce porque dentro de la población diagnosticada con esta enfermedad existen pacientes que pueden sobrevivir hasta 5 años incluyendo casos en estadios clínicos tempranos (I y II) y estadios clínicos avanzados (III y IV). A pesar de que la TNM (tumor, nódulos linfáticos y metástasis) y el grado de diferenciación son dos criterios clínicos utilizados para determinar la progresión de la enfermedad por la AJCC (del inglés *American Joint Committee on Cancer*), hoy en día no se ha logrado resolver porque existe variabilidad en la supervivencia de los pacientes diagnosticados con PDAC dentro de cada estadio clínico y grado de diferenciación.

El PDAC se caracteriza por la generación de tejido conectivo fibrótico, proteínas de matriz extracelular alrededor del tejido tumoral, este proceso biológico es llamado desmoplasia. Los fibroblastos asociados a cáncer son los responsables de la generación del estroma desmoplásico y favorecen el desarrollo de tumores más agresivos en PDAC. Como resultado de esta interacción celular se induce en la célula tumoral el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM), lo cual dentro del microambiente tumoral genera un fenotipo celular invasivo y con mayor capacidad de generar metástasis. Dado que estudios previos han reportado que la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de TEM de forma individual

se han asociado con un menor tiempo de sobrevida y un peor pronóstico, en este trabajo evaluamos la expresión conjunta de marcadores de ambas características y su asociación con variables clínicas en pacientes diagnosticados con PDAC, además de su relevancia pronóstica en la variación de la sobrevida dentro de cada etapa clínica y grado de diferenciación del tumor.

Nosotros examinamos individualmente la expresión de los marcadores de estroma desmoplásico α -SMA (actina de músculo liso alfa), fibronectina y vimentina, así como los marcadores de TEM EpCAM, pancitoqueratina y vimentina, por inmunohistoquímica, utilizando un microarreglo de tejidos en bloque de parafina de una cohorte retrospectiva de 25 pacientes diagnosticados con PDAC. Los resultados fueron examinados para asociarlos con las características clínicas, sobrevida, estadio clínico, grado de diferenciación y resecabilidad. Para la asociación con la sobrevida por estadio clínico (II y III/IV) y por grado de diferenciación tumoral (grados moderados y pobres) se asoció la expresión de los marcadores de estroma desmoplásico y TEM.

La expresión alta de los marcadores vimentina ($p = 0.041$) α -SMA ($p = 0.033$) en el core tumoral, EpCAM ($p = 0.030$) y pancitoqueratina ($p = 0.050$) en tejido tumoral se asociaron con estadios clínicos avanzados y una menor sobrevida, respectivamente. La expresión alta de α -SMA ($p = 0.035$) en tejido estromal se asoció con grados de diferenciación pobres. Finalmente, la expresión baja de fibronectina ($p = 0.026$) en el core tumoral se asoció con resecabilidad positiva en nuestra cohorte de 25 pacientes respectivamente.

La expresión alta de los marcadores de estroma desmoplásico α -SMA, fibronectina y vimentina se asoció con una disminución de la sobrevida en estadios clínicos intermedios y avanzados ($p = 0,006-0,03$), así como con grados de diferenciación del tumor pobre y moderadamente diferenciados ($p=0,01-0,02$). Interesantemente, el mismo patrón se observó para los marcadores de transición epitelio mesénquima, EpCAM, pancitoqueratina y vimentina ($p = 0,00008-0,03$). La expresión alta de los marcadores de estroma desmoplásico y TEM dentro de cada etapa clínica y el grado de diferenciación tumoral se asociaron con una menor

sobrevivencia en pacientes diagnosticados con esta enfermedad. La evaluación de estos marcadores puede tener un impacto pronóstico en la variación del tiempo de supervivencia en pacientes con PDAC.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de páncreas es uno de los tumores más agresivos que existen, a pesar de su baja frecuencia en cuanto a incidencia de casos registrados. La tasa de mortalidad que presenta este tumor es la más elevada.^{1,2} Este tipo de cáncer ocupa la primer posición en letalidad a nivel nacional e internacional (figura 1) incluso por delante de tumores como hígado, esófago, cerebro, pulmón y estómago.^{1,2}

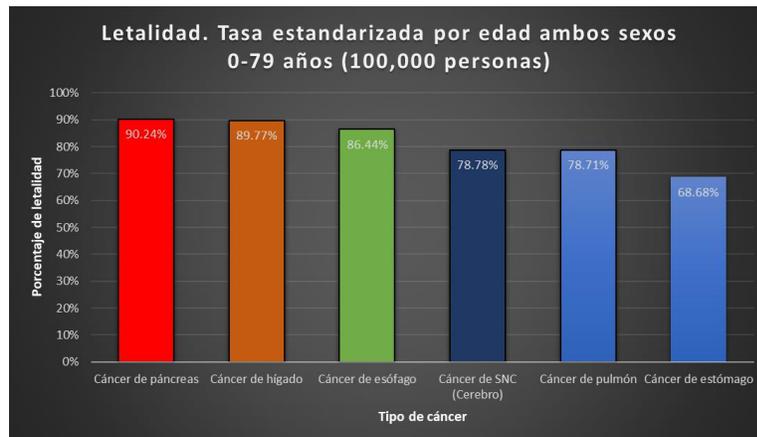


Figura 1. Letalidad, relación entre la incidencia de casos registrados por cáncer y su mortalidad. Tasa estandarizada por edad, ambos sexos 0-79 años (100,000 personas). Tomado de Sung et al, 2021, (2).

El cáncer de páncreas se divide principalmente en tres tipos: Adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), el más común (85% de los casos) el cual se origina de las glándulas que pertenecen al tejido epitelial exocrino del páncreas (células ductales que revisten los conductos pancreáticos y permiten el flujo de macronutrientes al duodeno para la generación de energía).³

Los tumores neuroendocrinos pancreáticos (Pan-NET) los cuales son menos comunes (menos del 5%) y se desarrollan en el tejido epitelial endócrino del páncreas (células epiteliales endócrinas que tienen como función la regulación de las hormonas glucagón e insulina).³

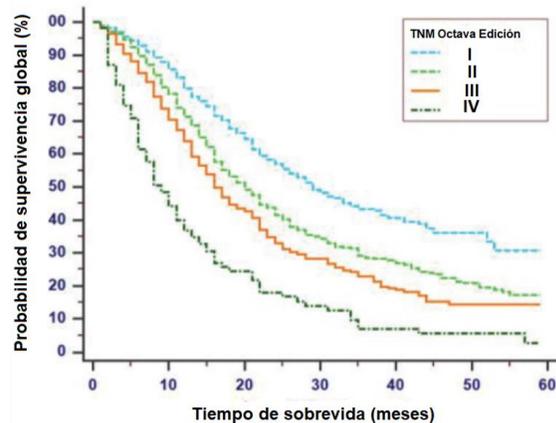
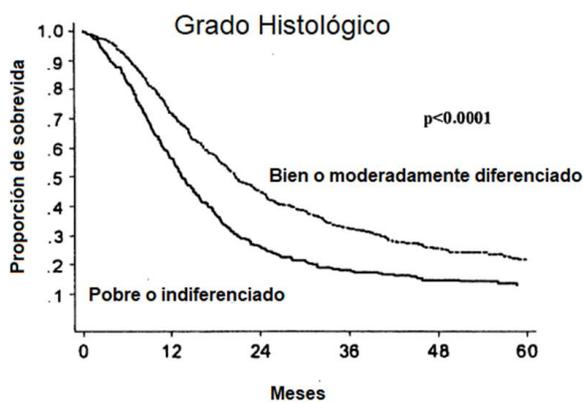
El resto (10%) corresponde a carcinomas acinares poco comunes que se originan del tejido epitelial exocrino acinar⁴ (células epiteliales acinares que se encargan de sintetizar gránulos de zimógeno que degradan macromoléculas provenientes de los nutrientes de los alimentos, a esta secreción se le conoce como jugo pancreático).⁵

El PDAC es principalmente el tumor que causa los altos índices de mortalidad registrados por cáncer en este órgano. La naturaleza silente del tumor, y asintomática, le confieren una clara ventaja, lo que favorece no poder detectar el desarrollo del tumor en fases tempranas. Por lo tanto, el diagnóstico es tardío, esto sumado al hecho de que se genera invasión y metástasis temprana, así como resistencia a fármacos, lo que hace del PDAC una enfermedad mortal.^{3,6}

American Joint Committee on Cancer (AJCC, por sus siglas en inglés) utiliza el sistema de estadificación TNM como la herramienta diagnóstica estándar por la cual se determina el proceso de la enfermedad^{7,8} y las recomendaciones de tratamiento.⁹ Más aún, la AJCC ha incorporado el grado de diferenciación (G) como otro criterio que junto al TNM se ha observado determina el pronóstico de los pacientes.⁹

El criterio G categoriza al tumor en bien diferenciado (de bajo grado) a indiferenciado (de alto grado); en cuanto más indiferenciado sea el tumor más agresivo su comportamiento biológico. En el caso de los PDAC el grado histológico se basa en la extensión de la diferenciación glandular, categorizando los tumores en grados de diferenciación de bajo grado (bien diferenciados y moderadamente diferenciados) y de alto grado (pobrementemente diferenciados e indiferenciados).⁹ Existen análisis multivariados que han mostrado que el grado de diferenciación en cáncer de páncreas es un importante indicador pronóstico

después de la resección tumoral¹⁰⁻¹³, sin embargo, ambos criterios de la AJCC no han logrado resolver la incógnita del porqué de la variabilidad en la sobrevida de los pacientes con PDAC. Así, el 80% de los pacientes con PDAC son diagnosticados en estadios clínicos avanzados y con peor pronóstico^{3,14}, siendo la tasa de supervivencia general a 5 años del 9%.^{3,14} Más aún, aunque la mediana de sobrevida para todos los estadios clínicos es de 8 meses¹⁵, se desconoce por que existen pacientes que pueden sobrevivir hasta 5 años⁷ independientemente del estadio clínico y grado de diferenciación con que se diagnostiquen (figura 2).^{7,13,15,16}



Característica	N= 2374	Pacientes Número/ (%)	Tasa de supervivencia global (%)			P
			1 año	2 años	3 años	
TNM Octava Edición		I 598 (25.2)	79.7	56.9	43.4	< 0.001
		II 976 (41.1)	71.3	41.6	29.2	
		III 681 (28.7)	63.8	32.9	22.8	
		IV 119 (5.0)	36.8	16.7	7	

Figura 2. Variabilidad en la sobrevida de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) por Grado Histológico (Izquierda) y estadio clínico (derecho). Modificado de Winter et al. 2006 (13) y He et al. 2018 (16).

El PDAC se caracteriza por un estroma desmoplásico prominente definido por tejido fibrótico con abundante matriz extracelular alrededor del tejido tumoral.¹⁷⁻¹⁹ Las células que favorecen el desarrollo del estroma desmoplásico son los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs).²⁰ En la inflamación y la carcinogénesis, los CAFs se activan adquiriendo una morfología tipo miofibroblasto y expresan

proteínas como α -SMA, fibronectina y vimentina^{21,22}, además de un exceso de moléculas de matriz extracelular, citocinas y factores de crecimiento.^{19–21,23–30}

Un estroma desmoplásico contribuye en la formación de tumores más agresivos, con mayor capacidad de proliferación, invasión y metástasis, así como a la resistencia a quimioterapia y radioterapia.^{20,31} Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las células tumorales de PDAC estimulan la proliferación, migración, activación y secreción de proteínas de la matriz extracelular de los CAFs^{18,23,32} y a su vez, los CAFs estimulan la proliferación, evasión de apoptosis, migración, invasión y metástasis de las células tumorales de PDAC.^{17,23,26,33}

Resultado de esta interacción celular entre el estroma desmoplásico y el tumor, se ha observado que dentro del microambiente tumoral, se induce el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM) de la célula neoplásica.^{22,24,25,34} En la TEM se pierden gradualmente marcadores epiteliales de la célula neoplásica como la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM)³⁵ y citoqueratinas³⁴, así como también se expresan marcadores mesenquimales como vimentina.^{34,36} La expresión de los marcadores mesenquimales favorece el desarrollo de un fenotipo invasivo, donde la célula tumoral incrementa su migración²³ tanto en modelos *in vitro*^{24,25} como en modelos *in vivo*.^{23,33} Por lo tanto, la dinámica del microambiente promueve el crecimiento tumoral y la invasión.

La estratificación pronóstica actual en PDAC basada en los criterios TNM y G no discrimina eficientemente a los pacientes de diferentes estadios clínicos que pueden sobrevivir un tiempo superior a la media, incluyendo a los de los estadios clínicos III y IV.^{9,16} Por lo que es necesario la inclusión de nuevos parámetros que ayuden a discriminar eficientemente la supervivencia de los pacientes de PDAC dentro de cada estadio clínico y grado de diferenciación del tumor.

Dado que el PDAC se caracteriza por un estroma desmoplásico abundante y la presencia de TEM, biomarcadores de ambas características biológicas podrían asociarse con la agresividad y el mal pronóstico de pacientes con PDAC. Estudios previos han asociado la expresión incrementada de marcadores de estroma

desmoplásico como α -SMA^{37,38}, fibronectina³⁹ o de TEM como EpCAM, citoqueratinas y vimentina⁴⁰⁻⁴⁴, con una sobrevida corta (1-2 años) en pacientes con PDAC. Sin embargo, la evaluación de la expresión individual de marcadores de ambas características y su relevancia pronóstica en la variación de la sobrevida dentro de grupos de estadio clínico (II/III y IV) y grado de diferenciación (moderado/pobre) en una cohorte de pacientes con PDAC se desconoce. Nosotros hipotetizamos que la evaluación cuantitativa de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y TEM de forma individual, puede mejorar la estratificación actual y proporcionar un pronóstico más certero. Por lo tanto, en este estudio evaluamos la expresión de marcadores de ambas características y analizamos su asociación con variables clínicas en pacientes diagnosticados con PDAC.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC)

3.1.1 Descripción de la enfermedad: Epidemiología

El PDAC corresponde el 85% de los tumores que se generan en el páncreas.^{3,45} Los pacientes diagnosticados con PDAC, tienen un pronóstico desfavorable (sobrevida de 9% a 5 años) debido a que el 80% de los casos de PDAC son diagnosticados en estadios clínicos avanzados.^{3,14} Aún los casos que presentan un tumor potencialmente resecable (menos del 20%) tienen una sobrevida de 20% a 5 años.^{6,13,20,46,47} Los exámenes de diagnóstico disponibles no son específicos y la mayor parte de los pacientes en estadios tempranos, no pueden ser detectados.⁴⁶

El PDAC es un tumor complejo de naturaleza silente, rápida progresión, resistente a quimioterapia y radioterapia, estas características hacen del PDAC un tumor intratable.^{3,6} GLOBOCAN 2018 ha posicionado al cáncer de páncreas en el doceavo lugar en incidencia, con 458,918 casos y en el séptimo lugar en mortalidad con 432,242 casos a nivel mundial (4.4% de todas las muertes causadas por cáncer).^{1,48} Los datos de incidencia y mortalidad son prácticamente idénticos en México en cuanto a posición se refiere.¹ Sin embargo, en Estados Unidos el cáncer de páncreas ocupa la tercer causa de muerte por cáncer y se estima que para antes del año 2030 ocupe la segunda posición.⁴⁹⁻⁵²

3.1.2 Descripción de la enfermedad: Histología y carcinogénesis

El PDAC se origina de las células ductales que revisten los conductos pancreáticos⁵³. En la literatura se ha mencionado que el PDAC también puede originarse de células centro-acinares, este proceso es conocido como metaplasia acinar-ductal.²⁰ En lo que se refiere a los cambios en la histología normal del páncreas y el desarrollo de PDAC se ha establecido que el ducto epitelial sano progresa a un adenocarcinoma invasivo, a través de tres lesiones precursoras: neoplasias pancreáticas intraepiteliales (PanIN), neoplasias mucinosas papilares intraductales y neoplasias mucinosas quísticas.^{45,54} Sin embargo, la mayoría de los PDAC se desarrollan a partir de una PanIN.

Las PanIN están clasificadas en cuatro etapas, PanIN 1A, 1B, (bajo grado) 2 y 3 (alto grado) ^{45,53,55} En una serie de autopsias de pacientes diagnosticados con PDAC se han detectado lesiones de bajo grado en zonas del páncreas donde no se observa presencia de tumor, mientras que las lesiones de alto grado se encontraron adyacentes al tumor, inclusive las lesiones de alto grado se han observado en el páncreas de pacientes con predisposición genética de PDAC.⁵³

Las lesiones de bajo grado tienen una estructura celular plana (1A) o papilar (1B) y se caracterizan por la presencia de atipia y polaridad nucleares retenida, mientras que las lesiones de alto grado 2 tienen características micropapilares, con atipia nuclear y una tasa baja de mitosis. Las lesiones de alto grado 3 (carcinoma *in situ*) tienen pérdida generalizada de polaridad, atipia nuclear y una alta tasa de mitosis.⁵⁵

Las lesiones precursoras necesitan de alteraciones genéticas que propicien el desarrollo del PDAC. *KRAS* es un oncogén que tiene como función principal regular señales para receptores de crecimiento en la célula sana, sin embargo, cuando está mutado resulta en una ganancia constitutiva de función lo que permite la proliferación, la evasión de apoptosis y la supervivencia celular.¹⁷ *KRAS* en su forma mutada es un oncogén que se ha localizado desde el desarrollo temprano de los tumores en las PanIN y que de hecho se encuentra en más del 90% de los PDAC en el cromosoma 12p, principalmente en el codón 12, aunque la mutación también se puede localizar en los codones 13 y 61 aunque de forma menos frecuente.^{53,55,55}

La sobre expresión de oncogenes (*KRAS* y *HER2/neu*) sumada a la inactivación mutacional de los genes supresores de tumor, *CDKN2A*, *P53*, *P16*, *SMAD4/DPC4*, *BRCA2* es detectada con frecuencia en las lesiones de alto grado (2 y 3).^{20,53} La mutación de *KRAS* en el cromosoma 12p en el codón 12 es un parteaguas que junto a la inactivación de los genes supresores de tumor constituyen eventos genéticos que contribuyen el desarrollo del PDAC desde lesiones precursoras (figura 3).^{53,55}

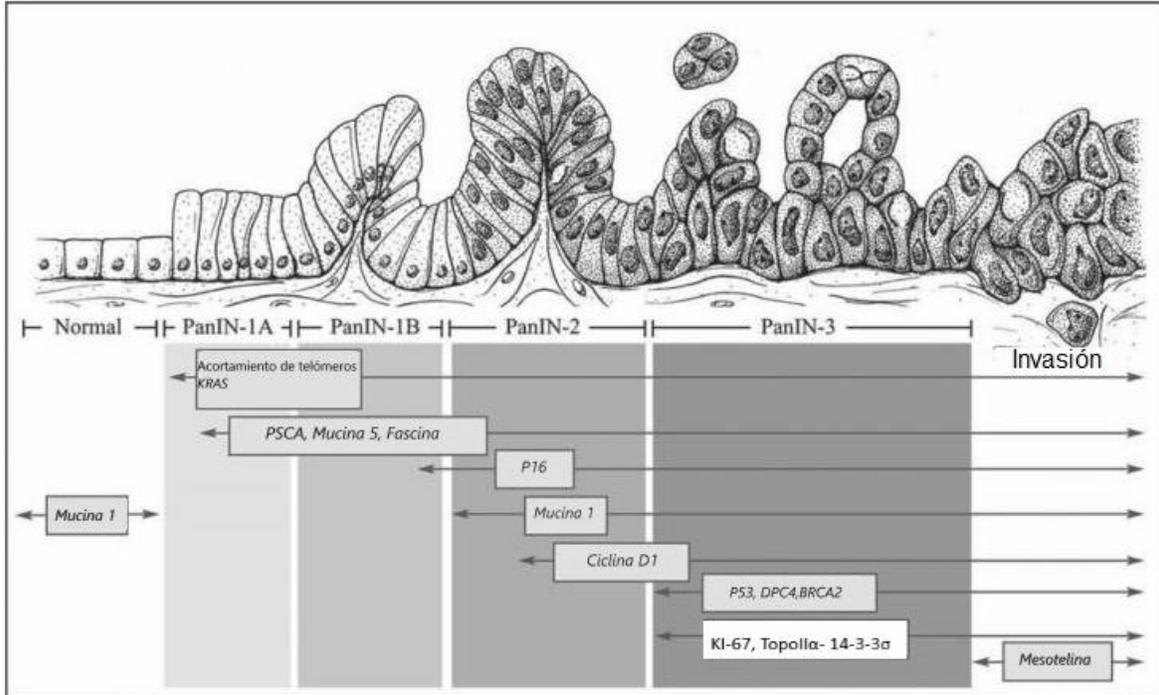


Figura 3. Modelo de progresión adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). Tejido normal (izquierda), carcinoma (derecha), la progresión histológica está asociada con la acumulación de alteraciones genéticas específicas; genes supresores de tumor (*p53*, *Smad4/Dpc4*), oncogenes (*BRCA2*, *KRAS*), y genes de mantenimiento del genoma además de proteínas de ciclo celular (*p16*, *ciclina D1*) de proliferación celular (*Ki-67*, *topoisomerasa II α*), mucinas epiteliales (*mucina 1*, *mucina 5*) y nuevos genes descritos en un microarreglo de tejidos como diferencialmente regulados en cáncer de páncreas invasivo (*mesotelina*, *PSCA*, *fascina* y *14-3-3σ*), el hecho de que estos eventos genéticos no ocurran hacen que se conserve la estructura normal del tejido epitelial pancreático y la terapia blanco busca hacer reversibles estos eventos al punto inicial (bidireccionalidad de las flechas),.Modificado de Koorstra et al. 2008 (54).

3.1.3 Patología de la enfermedad: Signos, síntomas y causas

La mayor parte de los pacientes diagnosticados con PDAC son asintomáticos desde el inicio de la enfermedad lo que permite el crecimiento y el desarrollo del tumor.^{3,20,45} Los pacientes que presentan síntomas generalmente se encuentran en etapas clínicas avanzadas.^{3,20,45} El PDAC debido a su localización anatómica invade frecuentemente vasos vitales (aorta y vena mesentérica) complicando la

intervención quirúrgica (figura 4)⁵³, favoreciendo la diseminación temprana de las células tumorales (metástasis), y el mal pronóstico de los pacientes.^{20,56-58} Los síntomas más comunes en pacientes diagnosticados con PDAC en etapas clínicas avanzadas son: astenia, anorexia, pérdida de peso, ictericia, náuseas y dolor abdominal.^{59,60}

La etiología del PDAC ha sido estudiada exhaustivamente y ha sido sujeta a numerosos metaanálisis, debido a que no se ha descrito un tratamiento efectivo, se piensa que el estudio de las causas que desarrollan el PDAC pueda prevenir la enfermedad.^{3,48} En PDAC se han identificado distintos factores de riesgo, los cuales se han dividido en dos categorías: Factores de riesgo modificables y factores de riesgo no modificables.^{3,61} Los factores de riesgo modificables son el tabaquismo, el alcoholismo, el sobrepeso, la dieta y la exposición a sustancias tóxicas. Los factores de riesgo no modificables son el género, la edad, la etnia, la diabetes mellitus, los antecedentes familiares de cáncer de páncreas, los factores genéticos, las infecciones crónicas, el tipo sanguíneo y la pancreatitis crónica.^{3,61}

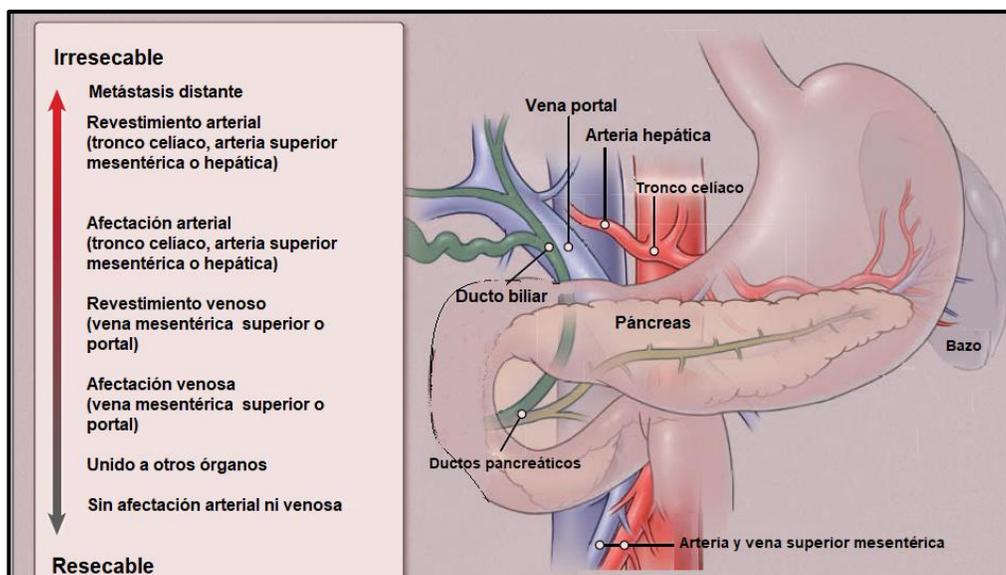


Figura 4. Localización anatómica del páncreas, resecabilidad e irreseabilidad. Debido a la localización del páncreas y a la progresión rápida del tumor, los vasos sanguíneos mayores son invadidos con facilidad lo que imposibilita la cirugía favoreciendo el mal pronóstico de los pacientes. Modificado de Ryan et al. 2014 (52).

El tabaquismo es uno de los factores predisponentes más importantes en PDAC⁶², cerca del 20-25% de los casos de PDAC son atribuidos al tabaquismo.²⁰ En la literatura se menciona que el tiempo de exposición y el número de cigarrillos al día incrementan el riesgo de desarrollar PDAC, aún el riesgo persiste después de diez años de dejar el consumo del tabaco inclusive los fumadores pasivos tienen un riesgo elevado (50%) de desarrollar PDAC.^{63,64} El exceso en el consumo de alcohol basado en licor (más de tres bebidas diarias) favorece en un 14.5% el riesgo de desarrollar PDAC.⁶⁵⁻⁶⁷ Así mismo se ha reportado que el vino y la cerveza no tienen asociación con esta patología.⁶⁸

El consumo de tabaco y el alcohol basado en licor (desde mínimas cantidades) incrementan aún más el riesgo de desarrollar PDAC. De hecho existe un aumento en el riesgo de cáncer de páncreas entre el tabaquismo asociado con el consumo de alcohol (ligero, moderado y fuerte); esto fue estadísticamente significativo a partir de 1 a 3 bebidas alcohólicas a la semana (cociente de probabilidades ajustado por edad (AOR) = 2.31, 95% CI: 1.03, 5.20).⁶⁹

La inactividad física y el exceso de grasa corporal (sobrepeso) durante la edad adulta predisponen el desarrollo de PDAC.^{70,71} Una dieta alta en grasas, carne roja (cocinada a altas temperaturas), alimentos procesados y ricos en nitrosaminas, colesterol, comida frita, también es un factor que aumenta el riesgo en un 30 al 50% de desarrollar PDAC. Por otra parte el consumo alto de vegetales y frutas (ricos en cítricos y antioxidantes), tienen una acción protectora decreciendo el riesgo de desarrollar PDAC en un 38%.^{3,68,72-77}

La exposición a sustancias tóxicas (trabajo con metales y pesticidas) desencadena mecanismos carcinogénicos como la metilación del ADN, la inhibición en la reparación del ADN, la inducción de apoptosis a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, la inestabilidad genómica, la activación de oncogenes, así como la inactivación mutacional de genes supresores de tumor. La exposición ocupacional a níquel, cadmio, arsénico, incluyendo selenio en altas

cantidades (micronutriente esencial), han sido los elementos químicos más estudiados como factores de riesgo para desarrollar PDAC.^{78–111}

El PDAC es más común en hombres que en mujeres. Globocan reporta que la incidencia de PDAC es de 5.5 por cada 10,000 hombres y de 4 por cada 10,000 mujeres.¹ Es probable que ocurra más en hombres debido al tipo de trabajo y a los malos hábitos como el consumo excesivo de tabaco y el alcohol. Sin embargo, no se descarta que esto se deba también a factores genéticos aún no descubiertos que repercutan en la incidencia y mortalidad por cáncer en hombres y mujeres.³ El PDAC es una enfermedad que afecta más a adultos mayores que a jóvenes.¹¹² La mayor parte de los pacientes diagnosticados con PDAC son mayores a 50 años. De hecho, el riesgo de desarrollar PDAC incrementa con la edad, con el pico más alto entre los 60 y los 80 años.^{113–115}

Los estudios poblacionales han reportado que existen diferencias en la incidencia de PDAC dependiendo de la etnia, esto se atribuye al tipo de dieta, al tipo de trabajo, al consumo de alcohol, al consumo de tabaco y a la insuficiencia de vitamina D.^{3,116–118} Además de ello, la incidencia de PDAC depende de la genética poblacional (mutaciones, habilidad de detoxificar el tabaco, expresión de biomarcadores inmunes).^{119,120} En PDAC mutaciones puntuales en oncogenes y genes supresores de tumor como *KRAS* y *P53*, son diferentes en cada etnia, sugiriendo que cada raza tiene diversidad molecular y genética que puede afectar la incidencia de la enfermedad.^{121,122}

La diabetes es una enfermedad en el páncreas que afecta la producción de insulina en la sangre, por lo cual los niveles de azúcar en la sangre son elevados. Aunque sólo el 10% de los pacientes diagnosticados con PDAC tienen antecedentes clínicos de diabetes mellitus¹²³ no significa que no se pueda desarrollar esta enfermedad, de hecho el riesgo persiste después de 20 años de diagnosticada la diabetes mellitus.¹²⁴ Los antecedentes familiares de PDAC han sido reportados de acuerdo a distintos metaanálisis, en los cuales se menciona que el riesgo de desarrollar este tipo de tumor se ve incrementado hasta nueve

veces con respecto a la población en general, incluso este riesgo se incrementa al doble si al menos dos familiares directos tuvieron PDAC.^{125,126}

Aproximadamente el 10% de los pacientes con PDAC tienen predisposición genética, es decir mutaciones en los genes que incrementan el riesgo de desarrollar PDAC. Las mutaciones involucradas en la forma hereditaria de PDAC se encuentran comúnmente en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *CDKN2A*, *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PRSS1*, *STK11*.^{54,127} El PDAC también está relacionado con síndromes familiares asociados a cáncer como la poliposis hereditaria de cáncer de colon (síndrome de Lynch), el síndrome familiar de melanoma múltiple atípico, el síndrome hereditario de cáncer de mama, el síndrome hereditario de cáncer de ovario, el síndrome de poliposis adenomatosa familiar y el síndrome de Li-Fraumeni.³ Las mutaciones hereditarias en los genes *KRAS*, *P53* y *SMAD4* incrementan el riesgo de padecer PDAC.¹²⁸

Los factores infecciosos más importantes reportados en PDAC son: Infección por *Helicobacter pylori* (4-25%)^{73,129}, hepatitis B, virus de la hepatitis C.¹³⁰ En algunos estudios no han encontrado correlación entre el desarrollo de PDAC y la infección por *Helicobacter pylori*¹³¹ por lo que aún está en debate su participación en PDAC. El tipo de sangre está asociado al riesgo de desarrollar cáncer, incluyendo el PDAC.¹³²⁻¹³⁶ Se ha descrito en la literatura que pacientes con tipo de sangre B y O negativo son más propensos a desarrollar PDAC.^{130,137-140} Pacientes infectados por *Helicobacter pylori* y positivos a tipo de sangre O negativo han mostrado mayor riesgo de desarrollar PDAC en comparación a otros grupos sanguíneos.¹²⁹

La pancreatitis es un proceso de inflamación en el páncreas el cual puede ser agudo o crónico. La activación de enzimas digestivas ocurre antes que sean liberadas al intestino delgado, ocasionando que las enzimas digestivas ataquen al páncreas.^{3,141} El proceso inflamatorio genera un daño recurrente en las glándulas por lo que son afectadas las funciones principales del órgano, generando una mala absorción de nutrientes, así como diabetes mellitus.^{3,141}

Diversos estudios han acumulado evidencia acerca de la relación entre la pancreatitis crónica y el PDAC, sin embargo, sólo el 1.8% de los pacientes con pancreatitis crónica pueden desarrollar PDAC 10 años después del diagnóstico y 4% después de 20 años después del diagnóstico.¹⁴²⁻¹⁴⁷

A nivel genético los pacientes diagnosticados con pancreatitis crónica hereditaria asociada a la mutación del gen de tripsinógeno catiónico (PRSS1) y al gen kazal tipo 1 del inhibidor de proteasa serina tienen un riesgo mayor de desarrollar PDAC que pacientes diagnosticados con otros tipos de pancreatitis.¹⁴⁸

3.1.4 Diagnóstico y terapia

La Unión Internacional para Control del Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés) y la AJCC han determinado al TNM como el sistema de estadificación mediante el cual se determina el proceso de la enfermedad al momento del diagnóstico en pacientes con cáncer. El sistema de estadificación TNM clasifica la extensión de la enfermedad y es la determinante más importante para las recomendaciones de tratamiento, así como de pronóstico. El sistema de estadificación TNM clasifica al cáncer por el tamaño y alcance del tumor primario en cm (T), por la presencia o no de metástasis en ganglios linfáticos (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M).^{9,149}

La estadificación clínica en PDAC se divide en estadios clínicos tempranos y avanzados. Los estadios clínicos tempranos son: estadio clínico I donde se observa un tumor resecable menor a 2 cm limitado al páncreas (IA), los tumores mayores a 2 cm, pero menores a 4 cm corresponden al estadio clínico (IB); estadio clínico II (diseminación local o resecable en el límite del borde), el tumor es mayor a 4 cm limitado al páncreas, y se propaga a los nódulos linfáticos cercanos.

46,150,151

Los estadios clínicos avanzados son: estadio clínico III donde el tumor se extiende más allá del páncreas, son tumores mayores a 5 cm, irresecables localizándose en vasos grandes y cercano a los nervios, pero no han hecho metástasis a

órganos lejanos; estadio clínico IV el tumor se ha diseminado a uno o más órganos (figura 5).^{46,150,151}

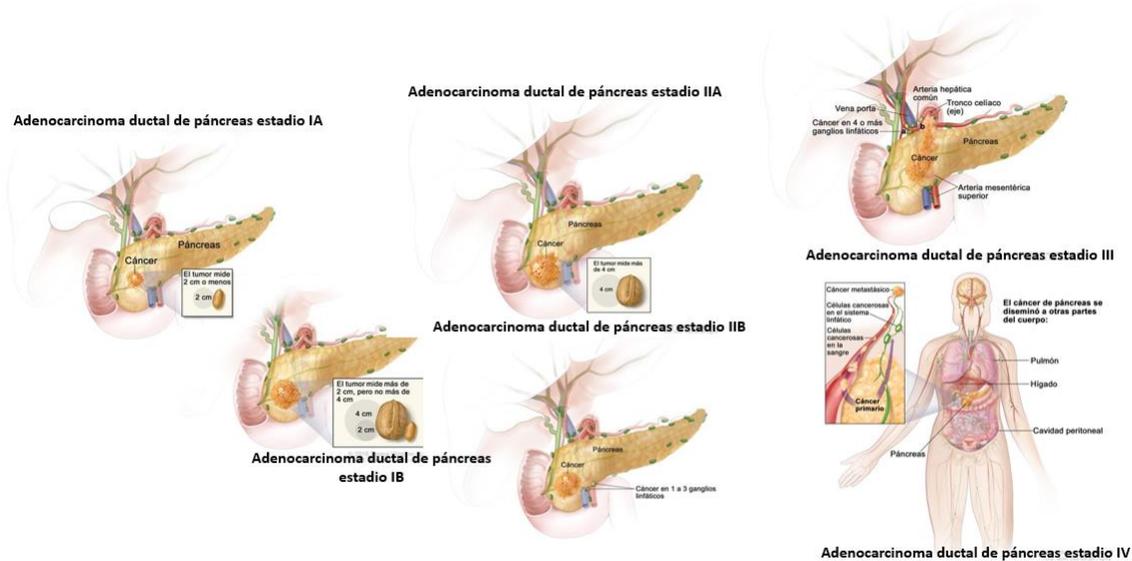


Figura 5. Estadio clínico, TNM (tumor, nódulos linfáticos, metástasis) en adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). Extensión del tumor, estadios clínicos tempranos, intermedios y avanzados. Modificado de Instituto Nacional del Cáncer 2019 (149).

Debido a que los estadios clínicos III y IV son predominantes en PDAC (80-90%), son pocos los pacientes que tienen una supervivencia mayor al 20% a 5 años.^{3,45,46,54} La mayor parte de los pacientes en estadios tempranos son asintomáticos, por lo que se necesitan de herramientas que puedan detectar al PDAC antes que desarrolle invasión y metástasis en los pacientes.^{45,46} Actualmente los métodos de detección que existen son por imagen, de los cuales los más utilizados son: la ultrasonografía abdominal trifásica para protocolo de páncreas (estándar para estadificación y diagnóstico), resonancia magnética, y aspiración con aguja fina guiada por ultrasonido endoscópico para diagnóstico citológico (técnicas con sensibilidad del 80%).^{46,54,152-155}

En pacientes con síntomas se ha utilizado el antígeno de cáncer (CA19-9) para confirmar el diagnóstico y predecir el pronóstico después de la resección y la recurrencia, sin embargo el CA19-9 no se puede utilizar como un método de detección temprana debido a que no es específico para la detección de tumor y puede encontrarse elevado por otras causas no asociadas a cáncer.^{156,157}

La AJCC integra otro criterio que junto al estadio clínico (TNM) se ha utilizado para determinar el pronóstico de los pacientes con cáncer, el grado de diferenciación (G).⁹ G es una medida que se utiliza para evaluar la diferenciación del tumor. La diferenciación se refiere a la semejanza funcional y morfológica entre las células tumorales y las células normales del mismo tejido. Las neoplasias malignas se categorizan en bien diferenciadas (de bajo grado) a indiferenciadas (de alto grado), en cuanto más indiferenciado sea el tumor más agresivo su comportamiento biológico. En el caso de los adenocarcinomas pancreáticos el grado histológico se basa en la extensión de la diferenciación glandular. Si más del 95% del tumor está compuesto de glándulas se clasifican en bien diferenciados; del 50-95% son moderadamente diferenciados y menos del 50% son clasificados como pobremente diferenciados.⁹

Además de la TNM y el G, la AJCC también integra el criterio de invasión linfovascular (LVI) en el diagnóstico de los pacientes con PDAC. Este criterio se categoriza de la siguiente manera: invasión vascular linfática no presente, invasión vascular linfática presente, invasión vascular por vía venosa no presente, invasión vascular por vía venosa presente, no aplicable e indeterminada.¹⁴⁹

La resección quirúrgica es el tratamiento estándar y la única terapia potencialmente curativa en PDAC ¹⁵⁸, sin embargo solo el 10 % de los pacientes con PDAC tienen un tumor resecable al momento del diagnóstico. De hecho, más del 90% de los pacientes sometidos a cirugía fallece debido a la recurrencia local o a la metástasis a distancia.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

La resección quirúrgica en PDAC se basa en tres criterios importantes conocidos como márgenes de resección, estos criterios se clasifican en: R0 cuando no se

observan células tumorales dentro de un radio de 1 mm en el borde de la resección (microscópicamente); R1 cuando se observan una o dos células en un radio de 1 mm cercano al borde de la resección y R2 donde la resección es macroscópicamente incompleta^{160,161}, a pesar de que en PDAC existen pacientes en R0 donde lo esperado es que vivan más tiempo, su sobrevida es poco más longeva que aquellos en R1.^{162–164}

Debido a la baja tasa de sobrevida pese a la resección quirúrgica, se ha implementado la terapia adyuvante (radio y quimioterapia) en pacientes diagnosticados con PDAC con la finalidad de reforzar el tratamiento quirúrgico.^{160–168} La terapia neoadyuvante tiene como función principal reducir el tamaño del tumor en pacientes que presentan enfermedad localmente avanzada (invasión a vasos macroscópicos) con la finalidad de facilitar la intervención quirúrgica, sin embargo, la terapia neoadyuvante no ofrece una ventaja en la sobrevida de aquellos tumores de PDAC potencialmente resecables, aún con terapia adyuvante.^{159–161,169} Los fármacos mayormente empleados son gemcitabina, folfirinox, ácido folínico, oxaliplatino, paclitaxel y 5 fluorouracilo.^{45,170–173}

Pacientes con enfermedad metastásica son tratados de forma paliativa con la finalidad de aliviar los malestares e incrementar el tiempo de sobrevida, pese a esto no hay un tratamiento efectivo y la mayor parte de los casos tienen un periodo corto de vida.¹⁵⁹ Gemcitabina es el tratamiento estándar para pacientes en etapas clínicas IV debido al efecto en la disminución de los síntomas y un perfil de toxicidad favorable.¹⁷⁴

Existen reportes donde se ha utilizado la combinación de fármacos como oxilaplatino con gemcitabina, folfirinox con gemcitabina, capecitabina con gemcitabina, paclitaxel y folfirinox con gemcitabina mejorando el tiempo de sobrevida, aunado a ello estos esquemas de tratamiento suelen ser muy agresivos para los pacientes deteriorando su calidad de vida.^{172,175–187} El desarrollo de terapias efectivas y la búsqueda de marcadores pronóstico es crucial en PDAC, este sigue siendo un reto primordial junto con el diagnóstico temprano de la

enfermedad para mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes diagnosticados con PDAC.⁴⁵

3.2 ESTRATIFICACIÓN PRONÓSTICA Y SU ASOCIACIÓN CON LA SOBREVIDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON PDAC

3.2.1 Estadio clínico

El cáncer de páncreas es uno de los tumores con peor pronóstico que existen, ocupando la primera posición en letalidad a nivel mundial.¹ La letalidad observada en los tumores pancreáticos está principalmente asociada al PDAC, debido a que este subtipo corresponde a la mayor parte de los tumores que se originan en el páncreas (85%)³ y además por la biología tumoral compleja que lo caracteriza. La biología tumoral favorece la invasión local y la diseminación sistémica temprana de las células tumorales (metástasis)^{20,188}, por ende, usualmente el PDAC es diagnosticado en estadios clínicos avanzados (80%)³, donde inclusive aquellos pacientes que pueden ser intervenidos quirúrgicamente (20%) tienen una mediana de supervivencia de tan solo 21 meses.²⁰

No obstante, aunque la mediana de supervivencia para todos los estadios clínicos es de 8 meses¹⁵ se desconoce por que existen pacientes que pueden sobrevivir hasta 5 años^{3,7} independientemente del estadio clínico en el que se diagnostiquen^{7,15} y que sean candidatos o no a resección quirúrgica.^{7,9} Los ensayos clínicos dependen de la estadificación clínica para la estratificación adecuada de los pacientes, sobre lo cual la medición precisa del estudio de un tratamiento puede ser realizado.⁹ El estadio clínico por lo tanto ha sido la herramienta diagnóstica estándar por la cual se le da seguimiento al proceso de la

enfermedad en los pacientes con cáncer y por la cual se determina la sobrevida y el pronóstico de los pacientes.⁷ Sin embargo, debido a que la sobrevida dentro de un estadio clínico particular es muy variable en PDAC se necesita mejorar la predicción de la probabilidad de sobrevida (pronóstico) de este tipo de enfermedad con o sin la resección quirúrgica a la que son sometidos los pacientes.⁹

3.2.2 Grado histológico de diferenciación

Existen parámetros adicionales que se han incluido como parte complementaria de la TNM en la guía de la AJCC. Debido a que la sobrevida en cada estadio clínico es altamente variable, se han realizado estudios que permiten incorporar más parámetros que ayuden a mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes con PDAC. El Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) ubicado en Estados Unidos desarrolló una interpretación gráfica de datos obtenidos de pacientes con PDAC conocida como nomograma. El nomograma se utilizó con el fin de predecir mejor la probabilidad de sobrevida específica de la enfermedad en pacientes candidatos a resección quirúrgica en PDAC. Este nomograma incorporó factores adicionales dentro del modelo predictivo que no estaban incluidos en la estadificación basada en la TNM por la AJCC, uno de los cuales corresponde al grado de diferenciación del tumor (G). Las predicciones realizadas por esta interpretación gráfica lograron discriminar mejor que la estadificación tradicional (TNM), lo que sugirió que la incorporación de variables adicionales podría mejorar la precisión de la estratificación pronóstica.⁹ Este nomograma fue validado de manera independiente por un grupo en el hospital general de Massachusetts en una cohorte de 424 pacientes.¹⁸⁹

Existen múltiples estudios que han asociado el grado de diferenciación como un factor pronóstico importante en pacientes con cáncer de páncreas sometidos a resección quirúrgica para todos los estadios clínicos^{13,168,190–193}, de hecho, se ha demostrado que los pacientes con diagnóstico de PDAC que presentan grado de

diferenciación de bien a moderado, tienen un mejor pronóstico que aquellos pacientes con tumores que presentan grado de diferenciación pobre.¹³

En una cohorte de 1175 pacientes con diagnóstico de PDAC, se observó que sólo una minoría de la cohorte (5%) que correspondía a pacientes intervenidos quirúrgicamente, tenían características patológicas favorables. El grado de diferenciación del tumor (bien y moderado), junto con el tamaño del tumor (menor a 3 cm), los nódulos linfáticos y los márgenes del tumor negativos, incrementaron el tiempo de sobrevida de este grupo de pacientes a 5 años en un 43%.¹³ En este estudio, sin embargo, cuando se consideró el total de los pacientes intervenidos o no quirúrgicamente la sobrevida a 5 años fue del 18%¹³, por lo que la estratificación pronóstica de los pacientes es la suma de un conjunto de variables, dado que el estudio de la sobrevida de los pacientes con PDAC es multifactorial.

Estos parámetros (grado de diferenciación, tamaño del tumor, nódulos linfáticos y márgenes del tumor positivos) están involucrados directamente con la biología compleja de este tipo de tumor y con el pronóstico de los pacientes con PDAC.

El grado de diferenciación hasta el momento había sido considerado como un parámetro independiente para determinar el pronóstico que, si bien define tiempos de sobrevida menores en tumores pobremente diferenciados, aún no había logrado esclarecer por qué existe variabilidad en la sobrevida de pacientes con PDAC, para cada estadio clínico. Sin embargo, un estudio del 2010 reportó que en parte la variabilidad en la sobrevida de los pacientes con PDAC categorizados en estadio clínico, es el resultado de diferencias en el grado de diferenciación del tumor. En este estudio se encontró que el separar a los pacientes por estadio clínico y por grado de diferenciación basado en la categoría de alto grado (tumores pobremente diferenciados e indiferenciados), predecía un menor tiempo de sobrevida en comparación con la categoría de bajo grado (tumores bien y moderadamente diferenciados). Otros parámetros clínicos que fungieron como predictores independientes de resultado adverso en este estudio fueron la edad, el

sexo masculino, el tamaño del tumor mayor a dos centímetros, y los nódulos linfáticos positivos.⁹

Además, en este trabajo añadieron el parámetro G a la estadificación estándar basada en la TNM, utilizando una nueva estadificación denominada TNMG en una cohorte de estudio de 6862 pacientes. Esta clasificación es diferente de la propuesta por la AJCC por la inclusión del G que estratifica a los pacientes en un estadio más avanzado en presencia de un tumor categorizado de alto grado. Un tumor en estadio clínico IIA de alto grado en el sistema de estadificación TNM pasa a ser un estadio clínico IIB en el nuevo sistema TNMG, con una mejora de dos meses en la mediana de supervivencia entre estos estadios clínicos. El añadir el parámetro G en la estadificación estándar, es factible para mejorar la estratificación pronóstica basado en esta propuesta, que incluso se observa en cada estadio clínico y se mantiene estable en un periodo de 5 años.⁹ No obstante a pesar de estos hallazgos, esta nueva estadificación no ha sido aplicada en la guía de la AJCC y aunque ha sido reproducida por otros grupos de investigación¹⁰⁻¹², si bien ayuda en el entendimiento de la variabilidad de la sobrevida de los pacientes con PDAC, no logra explicar cuál es la función de la biología del tumor que favorece un menor o mayor tiempo de sobrevida con base al grado de diferenciación del tumor.

El trabajo realizado por Ren y colaboradores en 2020 menciona además que existen limitaciones en esta estadificación que incluye al parámetro G, las cuales no deben ser ignoradas. Primero a pesar de presentar un rendimiento superior comparado con la estadificación pronóstica actual, la adición del parámetro G crea un sistema más complicado que el actual que forma parte de la octava edición de la AJCC. En segundo lugar, los estudios están limitados a la uniformidad de los estudios preoperatorios (técnicas radiográficas) y las terapias adyuvantes posoperatorias en los pacientes. En tercer lugar, no se puede eliminar la Inter-institucionalidad y la variación entre observadores en los protocolos para la evaluación patológica del parámetro G. Finalmente, la discriminación en la sobrevida con este sistema mejora moderadamente la estadificación actual, lo que

se debe a la inclusión insuficiente de todos los factores predictivos necesarios para la predicción absoluta, los cuales no se incluyen en la SEER (*The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*, por sus siglas en inglés). Los factores pronóstico-validados son el nivel de CA 19-9, los márgenes de resección tumoral, la invasión linfovascular, invasión a nervios, quimioterapia adyuvante.¹²

3.3 CÉLULAS ESTROMALES Y SU FUNCIÓN EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL DE PÁNCREAS.

3.3.1 Desmoplasia

El PDAC se caracteriza diferencialmente de otros tipos de cáncer en el páncreas y otros órganos por la acumulación excesiva de tejido fibrótico y de matriz extracelular rica en fibronectina, colágena I, III, IV, periostina y laminina que rodea a las células tumorales.¹⁷⁻¹⁹ Esta característica se conoce como desmoplasia y ocupa más del 80% del volumen tumoral en el páncreas.²⁰ El microambiente tumoral en PDAC está conformado por la activación y el reclutamiento de células estromales que intervienen en el desarrollo del tumor y la desmoplasia tales como los fibroblastos asociados a cáncer (CAF, por sus siglas en inglés), células inflamatorias (linfocitos, macrófagos, mastocitos, granulocitos), células endoteliales, matriz extracelular, citocinas y factores de crecimiento (figura 6).^{17,20,23,24,194}

Estudios han reportado que la desmoplasia en PDAC promueve la proliferación, la invasión y la metástasis de las células tumorales, así como la quimio resistencia. La desmoplasia es uno de los retos de mayor complejidad en el tratamiento para PDAC.³¹

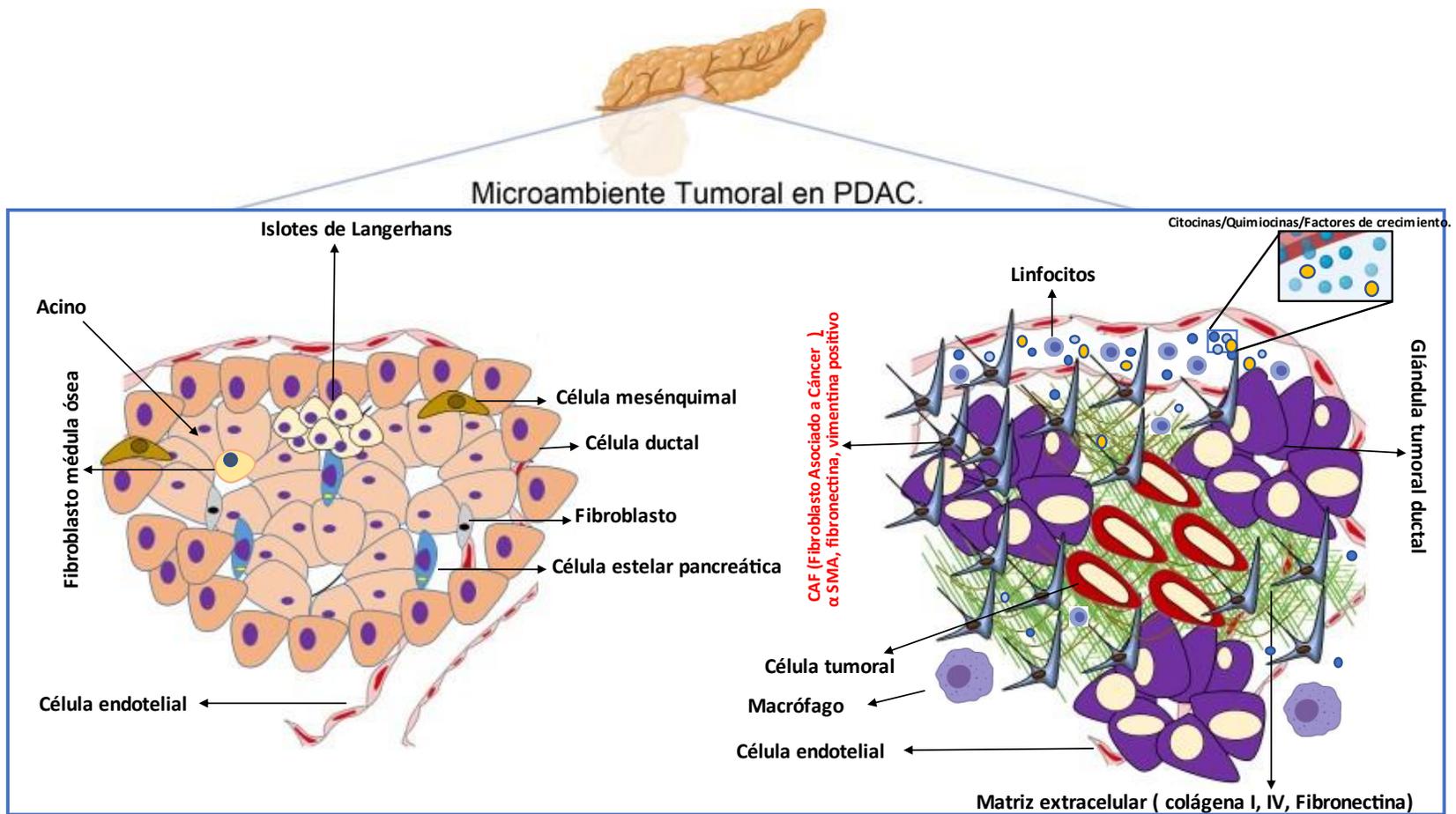


Figura 6. El desarrollo de desmoplasia en el microambiente tumoral de los adenocarcinomas ductales en páncreas. Representación gráfica de la histología normal del páncreas sano (Izquierda). Representación simplificada de la interacción entre las células tumorales, células estromales y células del sistema inmune en PDAC (derecha).

3.3.2 Células estromales que ocasionan la desmoplasia

Las células que ocasionan la desmoplasia son las CAF. Las CAF en páncreas se originan de cuatro subpoblaciones: células estelares pancreáticas (PSC's)²³, fibroblastos provenientes de la médula ósea (BMDCs)²⁰, fibroblastos residentes del mismo órgano²⁴ e inclusive células troncales mesenquimales (MSC)¹⁷. Estas cuatro subpoblaciones que se encuentran normalmente en páncreas sano en una baja proporción, se activan en procesos relacionados a enfermedades benignas (pancreatitis), o por la generación de tumores en el órgano (figura 7)^{17,20,23,24}.

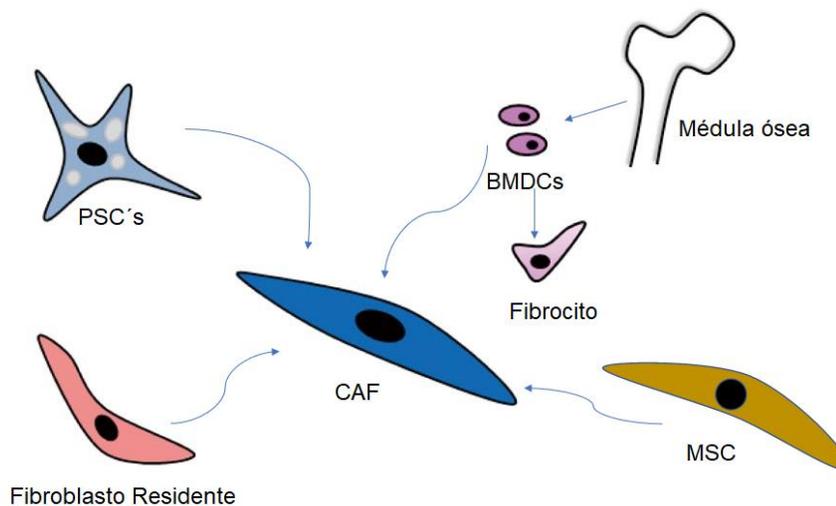


Figura 7. Diferentes tipos de células que originan a los fibroblastos asociados a cáncer (CAF). Las células estelares pancreáticas (PSC's) representan la fuente principal de CAFs en el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), de manera normal las PSC's tienen una localización periacinar y cuando son activadas por citocinas y estrés oxidativo, desarrollan un fenotipo tipo miofibroblasto. Fibroblastos residentes e interlobulares también pueden contribuir a la población de CAFs. Además, diversos estudios han sugerido que los fibroblastos provenientes de la médula ósea (BMDCs) son reclutados durante procesos de daño en el tejido pancreático y llegan a tener propiedades tipo CAFs. Un último hallazgo ha sugerido que las células troncales mesenquimales (MSC) también dan origen a los CAFs. Modificado de Nielsen et al, 2016 (20).

Las CAF en páncreas se caracterizan por compartir una morfología tipo miofibroblasto, (células alargadas en forma de huso) por expresar el marcador de superficie actina de músculo liso alfa (α -SMA) y por secretar una variedad de moléculas de la matriz extracelular y citocinas (colágena I, IL-6, PDGF).^{21,23-29}

Células estelares pancreáticas (PSC's)

Las PSC's son consideradas la fuente más importante de los CAF debido a que son el principal efector en la formación de tejido fibrótico y matriz extracelular en PDAC y otras patologías en el órgano como la pancreatitis crónica.^{30,32} El estudio de esta subpoblación de CAF en páncreas proviene de otro tipo de célula con características morfológicas y funciones similares llamada célula estelar hepática (HSC's), descubierta anteriormente.³⁰ Las PSC's en su estado inactivo contienen vesículas lipídicas en el citoplasma, tienen morfología estrellada, sirven como reservorio de vitamina A y tienen como función principal la remodelación de la matriz extracelular que mantiene la arquitectura normal del tejido pancreático^{21,30,195} a través de la secreción de metaloproteinasas e inhibidores de metaloproteinasas.^{30,196,197}

Las PSC's se encuentran localizadas en el espacio periacinar del páncreas y comprenden del 4 al 7% del total del órgano.¹⁹⁸ En afecciones al páncreas se ha reportado que las PSC's son activadas y se transdiferencian en células con una morfología tipo miofibroblasto, perdiendo todas las características morfológicas de su estado inactivo, teniendo como característica principal de su estado activo la expresión del marcador de superficie α -SMA y la secreción de moléculas de la matriz extracelular como colágena I y fibronectina.^{21,32,198} La expresión de otros marcadores de superficie como vimentina, desmina, proteína ácida fibrilar glial, nestina, marcadores neuroectodermales entre otros, han sido reportados en las

PSC's, sin embargo, la mayor parte de los marcadores no son específicos y han sido reportados en modelos animales.^{20,30}

Los procesos inflamatorios en el páncreas (inducidos por el abuso de alcohol), los factores de crecimiento, las citocinas, el estrés oxidante, la compresión mecánica del páncreas que favorece el estrés sólido (hipoxia) en pancreatitis y en cáncer pancreático, así como las células tumorales favorecen la activación de las PSC's.^{25,30,32}

Los factores de crecimiento que activan las PSC's son: el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 entre otros.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Una vez activada la PSC es capaz de generar de forma autócrina PDGF, TGF- β , IL-1, IL6, TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) y moléculas proinflamatorias como COX-2 de manera constante, lo cual permite la activación y proliferación de PSC's de forma crónica en PDAC, aún en ausencia de los factores desencadenantes iniciales (figura 8).^{19,20,30,202}

Las PSC's han tenido un fuerte impacto en el estudio del microambiente tumoral en páncreas desde que se aislaron y cultivaron en 1998.^{20,194} Se han realizado estudios proteómicos en donde se ha demostrado la participación de estas células en el desarrollo del tumor (proliferación, invasión y metástasis de células tumorales en PDAC).^{20,30}

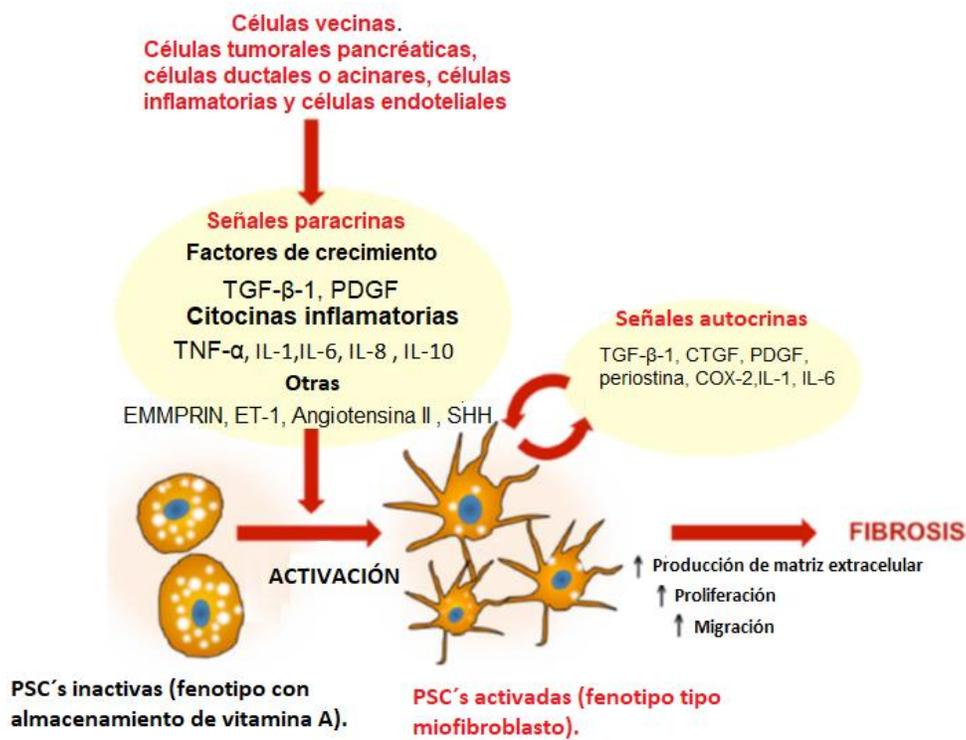


Figura 8. Mecanismos de activación de las células estelares pancreáticas (PSC's). Una característica principal de las PSC's es la transformación de su estado inactivo (fenotipo de almacenamiento de vesículas lipídicas) a un estado activo (fenotipo tipo miofibroblasto). Factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias son liberadas por células vecinas (células tumorales, acinares, ductales, inflamatorias y endoteliales) e inducen la transformación de las PSC's. Las PSC's activadas pueden perpetuar su estado activado secretando estos factores de forma autocrina permitiendo el incremento en la proliferación, migración y producción de matriz extracelular en exceso. En el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) la activación de las PSC's permite la producción de fibrosis extensa la cual a su vez contribuye en la progresión de la enfermedad, metástasis y quimioresistencia. Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), ciclooxigenasa-2 (COX-2), inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN), endotelina 1 (ET-1), interleucinas (IL), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante Beta (TGF-β), factor de necrosis tumoral (TNF-α), ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF, Sonic Hedgehog. Modificado de McCarroll et al, 2014 (200).

Fibroblastos provenientes de la médula ósea

Los CAF se pueden originar de células troncales que provienen de la médula ósea. Los BMDC's, (*Bone Marrow Derived Cells* por sus siglas en inglés) se han reportado en modelos murinos a los cuales se les ha inducido pancreatitis crónica y PDAC.^{28,29,196,203,204} Uno de esos estudios reportó que los BMDC's provenientes de un modelo murino hembra al ser transplantados en un modelo murino macho con pancreatitis crónica formaron parte de la población de PSC's en su estado activo expresando los marcadores α -SMA y desmina.²⁸ Los BMDC's injertados en el páncreas del modelo murino fueron el 5% del total de las PSC's contribuyendo en la reparación del tejido.²⁸ En PDAC se ha reportado que los BMDC's injertados también forman parte de la población de PSC's que genera áreas fibróticas en el páncreas murino.²⁹ Los BMDC's tienen un precursor con el fenotipo CD45+, colágena 1+ el cual se encuentra circulando en la sangre periférica antes de formar parte de las áreas fibróticas del páncreas.²⁰⁴

Fibroblastos residentes del páncreas

Los fibroblastos residentes del páncreas pueden dar origen a los CAF de distintos tipos de tumores.^{205,206} Estos fibroblastos se encuentran en gran proporción en tejido conectivo de distintos órganos (hígado, intestino, riñón, pulmón, bazo, útero) producen moléculas de la matriz extracelular y contribuyen en la homeostasis del tejido conectivo.²⁰⁷ Los fibroblastos residentes del páncreas tienen un origen mesodermal y se caracterizan por su morfología alargada, sin embargo, carecen de marcadores moleculares específicos que los distinga de otras subpoblaciones celulares en distintos tejidos.^{205,208}

FSP-1, (*Fibroblast-specific protein 1* por sus siglas en inglés) en modelos murinos de páncreas, es el marcador más común reportado en los fibroblastos residentes del páncreas, sin embargo, también se puede expresar en células dendríticas y

PSC's en su estado activo.²⁰⁹ En PDAC, FSP-1 se ha localizado expresado en CAFs de humanos y de ratón.²⁰⁵ Las células tumorales de páncreas en humanos también expresan FSP-1, por lo que este marcador no es específico de esta subpoblación.^{210,211} No obstante, existen reportes donde se ha estudiado la coexpresión de α -SMA con FSP-1, demostrando que los fibroblastos residentes del páncreas forman parte de la población de los CAF en PDAC.²⁰⁵

Un estímulo que activa a los fibroblastos residentes del páncreas es el daño tisular, como consecuencia la apoptosis y la necrosis celular permiten la liberación de factores de crecimiento como TGF- β y PDGF, citocinas de células inflamatorias locales, células endoteliales y células mesenquimales, que permiten la proliferación y diferenciación de miofibroblastos que forman parte de las CAF^{212,213}, sin embargo este proceso aún no ha sido documentado en PDAC, donde las PSC's son por mucho la principal fuente de las CAF.²¹⁴

Células Troncales Mesenquimales

Estudios recientes han reportado que existe una nueva subpoblación dentro de las CAF, esta subpoblación corresponde a las células troncales mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés, *Mesenchymal Stem Cells*). Las MSCs se han localizado en el estroma de tumores epiteliales, incluyendo tumores gastrointestinales, tumores de ovario, tumores de colon y tumores de páncreas.^{17,215-217}

La subpoblación de MSCs en el estroma de tumores epiteliales reportada en estos trabajos expresa los marcadores de superficie CD13, CD14, CD29, CD44, CD49 α , CD90, CD73, CD105, CD166 que se encuentran en las MSCs de médula ósea y no expresa los marcadores de superficie hematopoyéticos CD34, CD38, CD45, CD133 y CD14, así como tampoco expresa los marcadores de superficie endoteliales como CD31.^{17,215-217} Además, las MSCs en el estroma de tumores

epiteliales son capaces de dar origen a los tres linajes celulares: adipocitos, condrocitos y osteocitos reportados en las MSCs de médula ósea.^{17,215–217} Estos reportes a su vez han demostrado que las MSCs en el estroma de tumores epiteliales expresan el marcador de superficie que distingue a las CAF, α -SMA.^{17,215}

El estudio de las MSCs en el estroma de PDAC ha permitido encontrar una nueva subpoblación con morfología fibroblastoide que expresa los marcadores mesenquimales reportados en médula ósea con la capacidad de generar los tres linajes distintivos de las MSCs.^{17,215–217} Las MSCs en el estroma de PDAC se encuentran localizadas de manera periacinar y periglandular en el tejido tumoral de páncreas, expresando el marcador α -SMA, esta subpoblación ha sido aislada del componente estromal que corresponde a páncreas desmoplásico tumoral y del componente estromal que corresponde a tumores epiteliales.¹⁴⁹ La subpoblación de MSCs en el estroma de tumores epiteliales posee una mayor capacidad de proliferación que las MSCs de médula ósea²¹⁵, y son capaces de secretar colágena I, una proteína importante en la desmoplasia observada en PDAC así como de expresar otro marcador reportado en las CAF, FSP-1.¹⁷

El estudio de las CAF es complejo debido al origen de cada una de las subpoblaciones que las conforman. Sin embargo, cada una de las subpoblaciones de CAF en PDAC al activarse expresan α -SMA, secretan proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágena I) y factores de crecimiento que mantienen la activación constante de las CAF de manera autocrina. Esto ocasiona la generación de desmoplasia en el tejido tumoral. Las CAF secretan factores de crecimiento y citocinas que son reguladores clave en el desarrollo del tumor. Inclusive las MSCs recién descubiertas como parte de esta subpoblación, son capaces de ayudar al tumor a incrementar la proliferación y metástasis de las células tumorales.¹⁷

3.3.3 Matriz extracelular: factores secretados por los fibroblastos asociados a cáncer y las células tumorales y su papel en el desarrollo del tumor

Las CAF son células que se encargan de la producción de proteínas de la matriz extracelular y tejido fibrótico, proceso llamado desmoplasia.^{21,195} Se ha descrito en la literatura que la desmoplasia promueve el desarrollo del tumor.^{18,32} Esto se debe principalmente a los factores secretados por las CAF, que además de inducir la generación de desmoplasia, a la vez participan en procesos que regulan la proliferación, evasión de apoptosis, invasión y migración de las células tumorales en PDAC.^{17,23,26}

Existe una interacción dual entre las células tumorales de PDAC y las CAF, la cual ha sido estudiada desde inicios del siglo XXI.³¹ Esta interacción beneficia a ambas poblaciones (figura 9)³⁰. Estos estudios se han llevado a cabo en modelos *in vitro* e *in vivo* de PDAC.^{17,23,32,34} En uno de esos estudios se utilizó medio condicionado de líneas celulares de PDAC (MIAPACA2, PANC-1, SW850) para evaluar el efecto en la proliferación de las CAF y los factores secretados por las células tumorales que regulan este proceso biológico.³² El medio condicionado de células tumorales en PDAC incrementa la proliferación de las CAF a través de PDGF.³² Otros estudios han evaluado la capacidad migratoria de las CAF en modelos *in vitro*, por el contacto con células tumorales de PDAC.²³ Estos estudios han reportado que existe un incremento en la capacidad migratoria de las CAF cuando se cocultivan con células tumorales de PDAC²³ o medio condicionado de PDAC, Además la migración de las CAF es regulada a través de PDGF.³³

En contacto con las células tumorales de PDAC las CAF se activan expresando α -SMA.¹⁸ El medio condicionado de líneas tumorales de PDAC, también incrementa en las CAF la secreción de proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, colágena I y periostina.¹⁸ Periostina inclusive es capaz de incrementar de forma autócrina la capacidad de la CAF de secretar continuamente proteínas de la matriz

extracelular.¹⁸ La secreción de proteínas de la matriz extracelular y la activación de las CAF (α -SMA) es regulado por factores de crecimiento como TGF- β 1, Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), PDGF y proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2).¹⁸ Los tumores se benefician de la producción de proteínas de la matriz extracelular, se ha reportado que la secreción de fibronectina, colágena I-4 y laminina, protege a las células tumorales de agentes quimioterapéuticos como 5 fluorouracilo, cisplatino y doxorubicina.¹⁸

La proliferación de células tumorales de PDAC es regulada por factores de crecimiento que secretan las CAF.^{17,23} Existen reportes donde se ha observado el incremento en la proliferación de líneas tumorales (MIAPACA-2, PANC-1) y de células tumorales aisladas de pacientes, principalmente cuando están en contacto con el medio condicionado de las CAF o en cocultivo. Esto se debe principalmente a que las células tumorales tienen receptores para los factores de crecimiento que secretan las CAF, entre ellos PDGF y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)^{17,23}. La evasión de apoptosis también se ha reportado en modelos in vitro. Uno de estos estudios reportó en líneas celulares tumorales (MIAPACA-2, PANC-1) que al inducir apoptosis con H₂O₂ (peróxido de hidrógeno), el medio condicionado de las CAF disminuía el número de células tumorales apoptóticas.²³

La evasión de la apoptosis de las células tumorales en contacto con las CAF es a través de la interacción de la acción directa de las proteínas de la matriz extracelular.¹⁹ Los efectos de supervivencia de las proteínas de matriz extracelular, laminina y fibronectina son regulados a través de sus receptores de integrinas, que son expresados por las células tumorales. Además, los efectos anti apoptóticos de fibronectina parecen estar regulados por la transactivación del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).¹⁹ Todas estas interacciones conducen a la activación de señales de supervivencia y la evasión de apoptosis.¹⁹

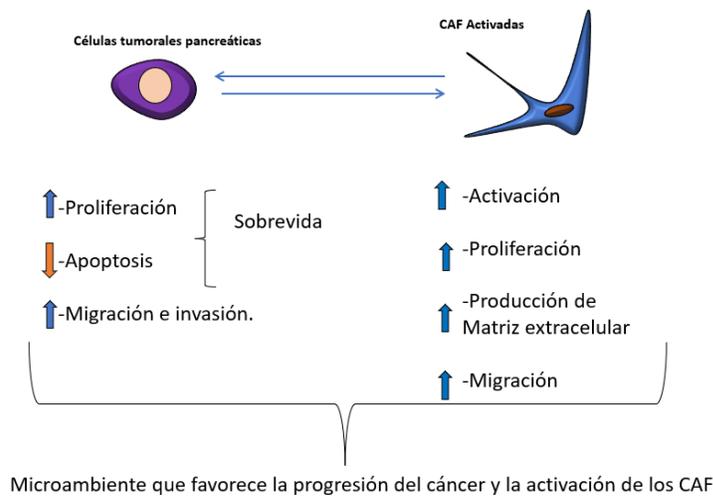


Figura 9. Relación dual entre las células tumorales y los fibroblastos asociados a cáncer (CAF) en adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). Dentro del microambiente tumoral ambas poblaciones se benefician y favorecen el desarrollo del tumor. Tomado de Apte et.al, 2012 (30).

Dentro del microambiente tumoral, se ha observado la participación de las CAF con respecto a la transformación mesenquimatosa de la célula neoplásica, lo cual modifica el epitelio permitiendo la invasión y migración de las células tumorales.^{22,24,25,34} También se ha descrito que en el desarrollo tumoral la presencia aumentada de las CAF comprime y distorsiona la vasculatura, generando un ambiente hipóxico.^{22,218–220} El ambiente hipóxico influye directamente en la generación de desmoplasia, así como en la capacidad migratoria de las células tumorales.^{22,218–220}

La célula tumoral debe modificar su fenotipo, morfología, así como también modificar el microambiente, particularmente el estroma, ello con la finalidad de que se secreten metaloproteinasas que permitan degradar la matriz extracelular para finalmente poder desplazarse, invadir y salir a la circulación²²¹. Para poder ejemplificar los fenómenos de invasión y migración de las células tumorales en PDAC en contacto con las CAF, se han realizado estudios *in vitro*.^{24,25,34} Estos

estudios han demostrado que al co-cultivar células tumorales de PDAC con las CAF, la célula tumoral expresa marcadores mesenquimales como vimentina, snail, twist1 y pierde marcadores epiteliales como e- cadherina, y citoqueratinas lo que favorece el desarrollo de la TEM (figura 10).^{17,27,34,36}

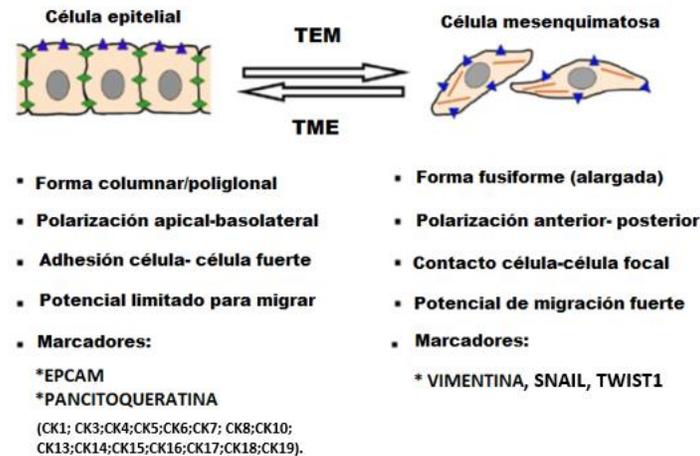


Figura 10. Características de la transición epitelio mesénquima (TEM) en adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). Las células tumorales son capaces de transformarse de un fenotipo epitelial a uno mesenquimatoso, este proceso llamado TEM involucra la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimatosos, como factores de transcripción (snail, twist1), este fenómeno biológico es reversible, una vez que salen las células salen a la circulación y llegan a un órgano secundario son capaces de transformarse en células epiteliales y proliferar. Transición epitelio mesénquima (TEM). Transición mesénquima epitelio (TME). Modificado de Maier et.al. 2010 (36).

Las CAF son capaces de secretar metaloproteinasas (MMP3, MMP2, MMP9) que participan en la degradación de la matriz extracelular^{22,25} lo que permite la invasión de las células tumorales.²²²

Modelos *in vitro* han reportado que las células tumorales de PDAC aumentan la capacidad de migrar e invadir al estar en contacto con co-cultivos de CAF o con medio condicionado (figura 11)^{17,23,34}, en condiciones normóxicas y en condiciones hipóxicas.^{22,25} Estudios han reportado que inclusive el medio condicionado o el co-cultivo de CAF con deficiencia de oxígeno, incrementan la capacidad de migración

de la célula tumoral²², lo cual sugiere que la secreción de una matriz rica en fibronectina por parte de las CAF en condiciones hipóxicas, induce una alteración topográfica en el alineamiento paralelo de las fibras en la matriz extracelular estromal y se favorece una mayor capacidad de movimiento en las células tumorales de PDAC (figura 12).²⁵ Además, se ha reportado que el medio condicionado de CAF irradiadas o co-cultivos con CAF irradiadas promueve aún más la migración e invasión de las células tumorales cuando se compara con aquellas células tumorales de las cuales se ocupó el medio sin irradiar de las CAF.^{18,27}

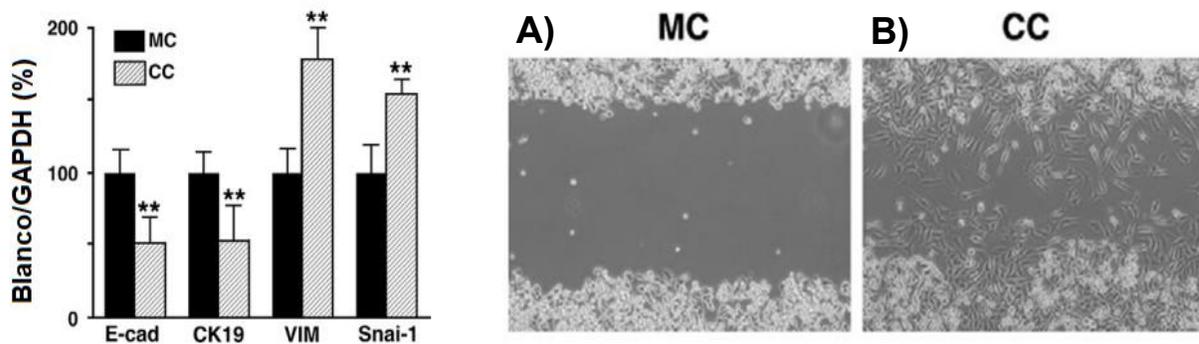


Figura 11. Estudio de la transición epitelio mesénquima en un modelo de co-cultivo indirecto con células estromales (PSC's) y células tumorales de la línea de cáncer pancreático Panc-1 (Izquierda). El co-cultivo favorece la transformación mesenquimatosas de las células tumorales que van perdiendo gradualmente los marcadores epiteliales E-cad y CK19, y expresando los marcadores mesenquimatosos vimentina y el factor de transcripción Snail-1 (PCR en tiempo real). (Derecha) co-cultivo por ensayo de herida (A) mono-cultivo (MC) de células tumorales, donde se observa que la línea celular Panc-1 no es capaz de cerrar la herida por medio de la migración celular. B) Co-cultivo (CC) de células tumorales de Panc-1 y PSC's, la línea celular de Panc-1 es capaz de cerrar la herida por medio de la migración celular al haber estado en contacto con las células estromales. Para verificar la migración celular, se utilizó mitomicina c para inhibir la proliferación celular. Modificado de Kikuta et.al. 2010 (34).

Esta transformación en la célula tumoral es regulada por factores secretados por las CAF como: el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)²²³; el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)²²; la citocina inhibitoria de macrófagos 1 (MIC-1) que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGFβ)²⁴; la quimiocina CXCL12²⁷; así como la interleucina 6²⁶ y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).¹⁷

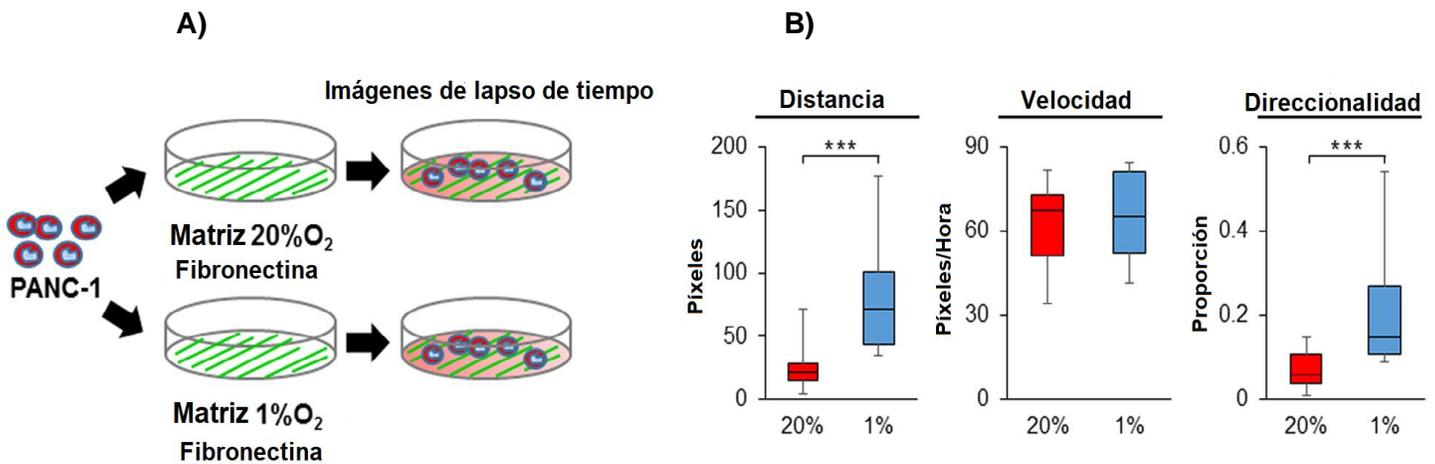
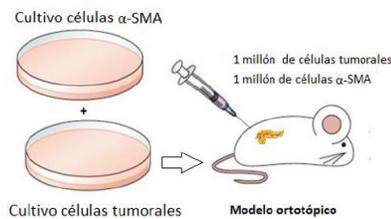


Figura 12. Las CAF secretan proteínas de matriz extracelular. Se ha reportado que las CAF secretan proteínas de matriz extracelular como fibronectina en condiciones hipóxicas y normóxicas, lo cual permite el desplazamiento de las células tumorales en modelos in vitro (A) Sin embargo en condiciones hipóxicas el acomodo de las fibras favorece aún más el movimiento de las células tumorales, incrementando la distancia, velocidad y direccionalidad de la migración tumoral (B). Modificado de Sada et.al. 2016 (25).

Estudios *in vivo* han reportado la participación de las CAF en el desarrollo de metástasis. Uno de esos estudios reportó en modelos ortotópicos murinos que el co-trasplantar CAF que provienen de tejido sano de páncreas con células tumorales de PDAC, incrementan el número de lesiones metastásicas. Esto se observó en comparación con aquellos murinos a los cuales solo se les trasplantaron células tumorales. Además el número de lesiones se incrementó aún más cuando se cotrasplantan células tumorales con CAF provenientes de tumores

de PDAC (figura 13).³³ Otros estudios han reforzado la participación de las CAF en la generación de lesiones metastásicas, donde se ha observado que la metástasis es regulada a través de GM-CSF producida por las CAF¹⁷. En este estudio se utilizó un knockdown para GM-CSF en las CAF de origen tumoral co-trasplantadas con células tumorales de PDAC y se bloqueó por completo la actividad metastásica en un modelo ortotópico de PDAC .¹⁷ Ambos procesos biológicos de migración e invasión, son fundamentales en una de las características que más impactan en la sobrevida de los pacientes con PDAC: la metástasis^{20,56–58}.



Sitios metastásicos	Incidencia de metástasis (Número de animales con metástasis)			
	AsPC-1 (n = 14)	AsPC-1 + CAhPSCs* (n = 14)	AsPC-1 (n = 8)	AsPC-1 + NhPSCs† (n = 8)
Hígado	5	12	3	7
Mesenterio	3	8	3	5
Riñón	0	7	0	4
Diafragma	1	5	1	4
Mediastino	3	6	1	3
Pulmón	0	0	0	1

Figura 13. Modelo ortotópico de ratón en donde se inocularon células tumorales de una línea de metástasis para cáncer de páncreas (AsPC-1) y CAF (células α-SMA). El índice de metástasis se encontró más elevado en los murinos donde se inocularon células tumorales y CAF provenientes de pacientes con cáncer de páncreas (CAhPSC's). NhPSC's (condiciones benignas). Modificado de Xu et. al.2010 (33).

3.4 MARCADORES DE ESTROMA DESMOPLÁSICO Y DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA (TEM) EN PDAC

3.4.1 α -SMA, fibronectina y vimentina como marcadores de estroma desmoplásico y su asociación clínica con PDAC

La participación de los CAF en el microambiente tumoral de los PDAC está involucrada en el desarrollo de células tumorales con una alta capacidad de proliferación, migración e invasión. Es por ello por lo que se han estudiado los marcadores que expresan los CAF en los tumores desmoplásicos y su asociación con características clínicas que estén relacionadas con el pronóstico de los pacientes con PDAC. Fujita y colaboradores en el 2010 investigaron la correlación entre la expresión de α -SMA y el pronóstico de una cohorte de 109 pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC. En dicho trabajo se hizo un punto de corte para la evaluación de la expresión del mensajero de α -SMA categorizada en alta y baja expresión, dónde la expresión alta del mensajero de α -SMA se encontró asociado a un menor tiempo de supervivencia para todos los estadios clínicos, independientemente de que los pacientes fueran tratados o no con quimioterapia adyuvante. La expresión alta del mensajero de α -SMA se asoció con tumores más grandes y se encontró como un factor pronóstico independiente, junto con el grado de diferenciación, el estadio clínico, nódulos linfáticos, tumor residual, invasión vascular positiva y quimioterapia adyuvante.²²⁴

En otro estudio realizado por Sinn y colaboradores se reportó que la expresión baja de α -SMA por inmunohistoquímica se asoció a un mayor tiempo de supervivencia en una cohorte de 162 pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC. La expresión de α -SMA por inmunohistoquímica no se asoció con el grado de diferenciación, tamaño del tumor, presencia de nódulos linfáticos y márgenes quirúrgicos.³⁷ Haerberle y colaboradores reportaron en una cohorte de 198

pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC, que la expresión alta de α -SMA por inmunohistoquímica se asoció a un menor tiempo de sobrevida. Sin embargo, en dicha cohorte solo el estadio clínico, los márgenes quirúrgicos y la metástasis fueron factores pronósticos independientes en la sobrevida general de los pacientes.³⁸

Otro de los marcadores que se han propuesto para identificar CAF asociados al proceso de desmoplasia es fibronectina. La alta rigidez fibrótica del microambiente tumoral comprime los vasos sanguíneos y la perfusión, lo que impide la administración de fármacos en las células tumorales. Fibronectina es el constituyente principal de la matriz extracelular dentro del microambiente tumoral, además de ser producido por las CAF. Además, las células tumorales son capaces de secretar esta proteína de matriz extracelular. De manera normal fibronectina funciona como soporte de las interacciones entre la célula y la matriz extracelular, siendo esencial para la cicatrización de heridas, desarrollo y homeostasis celular. La unión de fibronectina a sus receptores (integrinas de superficie celular) desencadena vías de señalización en las células tumorales pancreáticas, promoviendo la supervivencia del tumor, quimioresistencia (encapsulando el tumor, evitando la difusión del fármaco), invasión celular, metástasis y angiogénesis. Los CAF son la fuente principal de fibronectina y estudios inmunohistoquímicos han confirmado que esta proteína se expresa principalmente en el estroma de PDAC.³⁹ Hu y colaboradores reportaron en un estudio de 138 pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC, que la expresión alta de fibronectina por inmunohistoquímica se asoció a tumores más grandes, a nódulos linfáticos positivos y a estadios clínicos más avanzados. En este estudio fibronectina y el estadio clínico no fueron factores pronóstico-independientes y no se asociaron con la sobrevida de pacientes de PDAC.³⁹ Leppanen y colaboradores reportaron que la expresión de fibronectina por inmunohistoquímica se restringió al componente estromal del tumor y sólo se asoció a tumores de mayor tamaño.²²⁵

Si bien α -SMA y fibronectina han sido dos marcadores del estroma desmoplásico que se han asociado con características clínicas como tamaño del tumor, nódulos linfáticos, estadios clínicos avanzados e inclusive sobrevida. Estos resultados no han mostrado ser homogéneos entre cada cohorte de estudio y por cada marcador. Esto quizás se deba a los criterios que se han utilizado en la metodología donde los análisis son semicuantitativos y podrían repercutir en resultados tan diferentes entre sí.

Sumado al hecho que esta información no ha podido concluir aun cual es la posible causa por la que existen pacientes que pueden superar la media de sobrevida e inclusive sobrevivir un periodo de tiempo más prolongado, independientemente del grado de diferenciación y el estadio clínico en el que se diagnosticaron. Los estudios *in vitro*^{22,25} e *in vivo*³³ funcionalmente han demostrado que la interacción de las células estromales que generan la desmoplasia favorecen un comportamiento más agresivo en los tumores, por lo que es interesante saber si los niveles de expresión de estos marcadores se asocian con una menor sobrevida de los pacientes, por grupos de grado de diferenciación (moderado/pobre) y estadios clínicos (intermedios y avanzados), evaluándolos de forma independiente.

Vimentina es una proteína citoplasmática que se expresa en los CAF que forman parte de la desmoplasia en los tumores de PDAC. Eguchi y colaboradores reportaron la expresión de vimentina en modelos *in vitro* de CAF sometidas a condiciones hipóxicas²², aunque también existen otros reportes donde se ha reportado la expresión de vimentina en condiciones normóxicas.²¹ Las CAF que expresan vimentina son capaces de incrementar la capacidad de invasión de las células tumorales de PDAC.²² Actualmente no existe un estudio que evalúe la expresión de vimentina en el estroma desmoplásico y su asociación con características clínicas en pacientes diagnosticados con PDAC. Dhayat y colaboradores en el 2018 hicieron un estudio donde se evaluaron marcadores de TEM por inmunohistoquímica. Este grupo de trabajo hace énfasis en que, si bien

vimentina es un marcador de TEM, también se encuentra expresado en células estromales que rodean a las glándulas tumorales en PDAC, sin embargo este estudio no asocia la expresión de vimentina en el estroma con características clínicas.²²⁶

3.4.2 EpCAM, Pancitoqueratina y vimentina como marcadores de TEM y su asociación clínica con PDAC

La molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) se expresa en la mayoría de los tejidos epiteliales sanos y en un grupo de carcinomas humanos.⁴⁰ En el proceso de la TEM los marcadores epiteliales aún se pueden expresar, mientras se comienzan a ganar marcadores mesenquimatosos. La mayoría de los trabajos que han estudiado la expresión de EpCAM en células tumorales de PDAC, han evaluado la TEM en células tumorales circulantes (CTC's) de esta enfermedad²²⁷ y de otro tipo de tumores sólidos.³⁵ En estos trabajos se ha descrito que las CTC's comienzan a perder la expresión de EpCAM mientras aumenta la expresión de marcadores mesenquimatosos.

Hyu y colaboradores describieron en un modelo *in vitro* de cáncer de mama, que en el cultivo de mamoesferas (cultivos para enriquecimiento de células troncales y de TEM) generado a partir de la línea celular MCF7, las células que son capaces de formar esferoides expresan marcadores de TEM (snail, twist, slug, N-Cadherina) y reducen la expresión de marcadores de adhesión celular (E-Cadherina). Los investigadores midieron dichos marcadores a través de un ensayo de expresión del RNA mensajero por PCR y lo confirmaron en un western blot en el lisado de las células tumorales de mama.³⁵

En este mismo estudio cuando se realizó la tinción de inmunofluorescencia en las células tumorales de las mamoesferas, se localizó una baja expresión para EpCAM y fue corroborado por el RNA mensajero para EpCAM por PCR. Estos datos indicaron que la TEM podría favorecer un decremento de este marcador, el

cual es un fuerte indicador de la pérdida de la morfología epitelial por la transformación mesenquimatosas.³⁵

Zhao y colaboradores reportaron en un estudio de CTC's de PDAC que la expresión de EpCAM y citoqueratinas aún puede ser localizada en las células tumorales. Ellos encontraron la expresión de CTC's mesenquimatosas (vimentina, twist positivas) y epiteliales (EpCAM, citoqueratina (8/18/19) positivas) por fluorescencia, sin embargo, también reportan una subpoblación híbrida que compartía tanto marcadores epiteliales (EpCAM, citoqueratinas) como mesenquimatosos (vimentina, twist). En el proceso de TEM los marcadores epiteliales se pueden conservar, aunque los marcadores mesenquimatosos se comiencen a expresar.²²⁷ EpCAM es un marcador clave en la identificación de la transformación de la célula tumoral, que define con su baja expresión o ausencia un fenotipo mesenquimatoso potencial.

La expresión de EpCAM por inmunohistoquímica ha sido descrita en tumores pancreáticos. En un estudio realizado por Fong y colaboradores en el 2007, se describió por primera vez que las células tumorales de PDAC expresaban el marcador EpCAM. La expresión de EpCAM fue débil a moderada en la membrana de células de páncreas sano, no obstante, en los tumores de PDAC la expresión en la membrana se observó de moderada a fuerte. En este estudio sólo la edad y el estadio clínico fueron factores pronósticos, mientras que el sexo, el grado histológico y la sobreexpresión de EpCAM no fueron relevantes como factores pronósticos. Sin embargo, en el subgrupo de pacientes con enfermedad en estadios avanzados la sobreexpresión de EpCAM se asoció a un menor tiempo de supervivencia.⁴⁰

En el proceso de la TEM EpCAM aún puede conservarse, lo que no limita encontrar CTC's con la expresión de este marcador en sangre periférica de pacientes con PDAC²²⁷, probablemente otros factores (snail, twist, slug, N-Cadherina) dentro de la célula tumoral estén llevando a cabo la transformación a una célula con características mesenquimatosas y los marcadores epiteliales EpCAM, E-Cadherina y citoqueratinas sean los últimos en perderse o reducir su

expresión²²⁷, por lo que inclusive se han reportado subpoblaciones de CTC's con expresión de marcadores epiteliales, mesenquimatosos e híbridas. ²²⁷ en el artículo de Fong y colaboradores no se descarta que la alta expresión de EpCAM en estas células tumorales favorezca la salida a la circulación, lo cual incrementa la migración de células tumorales, la invasión y metástasis a órganos distantes, incluso se menciona que esto probablemente se deba a un antagonismo con E-cadherina.⁴⁰

Los filamentos intermedios son proteínas citoesqueléticas que tienen un tamaño intermedio entre actina y tubulina (7 a 11 nm de diámetro), encontrándose en el citoplasma de la mayoría de las células. Dentro de los filamentos intermedios se incluyen a las citoqueratinas, las cuales son localizadas en tejidos epiteliales. Las citoqueratinas son divididas en dos subfamilias: tipo 1 citoqueratinas ácidas y tipo 2 citoqueratinas básicas. Los tejidos epiteliales expresan diversos patrones de citoqueratinas, las cuales son generalmente preservadas en sus correspondientes tumores epiteliales. Las citoqueratinas han sido propuestas como marcadores útiles de la diferenciación epitelial en los carcinomas.²²⁸

Raffie y colaboradores reportaron la expresión de citoqueratinas en tumores epiteliales en líneas tumorales de páncreas. La expresión de las citoqueratinas 7,8,16,18 y 19 fueron localizadas en líneas tumorales con grado de diferenciación bien y moderado (AsPC-1, CAPAN-2, SW1990) y la expresión de las citoqueratinas 8,16, 18 y 19 fueron localizadas en líneas tumorales con grado de diferenciación pobre (MIA PaCa-2, Panc-1). Pancitoqueratina es un marcador que contiene un panel de citoqueratinas epiteliales (CK 7,8,9,17,18,19) el cual ha sido utilizado para detectar células tumorales epiteliales en páncreas²²⁸.

Karamitopoulou y colaboradores reportaron la expresión de pancitoqueratina en grupos pequeños de células tumorales desdiferenciadas dispersas en el estroma en el frente del tumor invasivo (tumor buddings, llamada en español como desdiferenciación focal) en una cohorte de 117 pacientes con diagnóstico de

PDAC. La desdiferenciación focal marcada con pancitoqueratina se asoció con tumores más grandes, con la invasión linfovascular y con un menor tiempo de sobrevida.⁴¹

Karamitopoulou y colaboradores reportaron que la presencia de desdiferenciación focal es un factor pronóstico independiente en esta enfermedad.⁴¹ Esta desdiferenciación focal representada por un grupo de más de 5 células, tienen mayor capacidad de salir a la circulación⁴¹, por ende la expresión elevada de este marcador que tiñe la desdiferenciación focal podría estar asociada a una menor sobrevida en pacientes con PDAC.

De hecho Karamitopoulou y colaboradores mencionan en su estudio que la estratificación pronóstica basada en parámetros biológicos podría conducir a una mejor toma de decisiones en la clínica y los tratamientos a los pacientes con PDAC.⁴¹ La inclusión de la expresión aumentada de citoqueratinas en PDAC ha validado un menor tiempo de sobrevida en pacientes con PDAC,^{42,44} sin embargo se desconoce si la sobreexpresión de pancitoqueratina está asociada a una menor sobrevida entre grupos de grados de diferenciación y estadio clínico.

La TEM ha sido estudiada tanto en modelos *in vitro*³⁴ como en modelos *in vivo*³³ sin embargo, también se ha estudiado la expresión de marcadores de tejido tumoral en TEM, en cohortes de pacientes de PDAC. Vimentina además de expresarse en tejido estromal de PDAC²²⁶, se ha localizado en tejido tumoral en TEM de tumores sólidos.

Myoteri y colaboradores reportaron en una cohorte de 53 pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC que la expresión de vimentina por inmunohistoquímica se asoció a tumores con grado de diferenciación pobre, y a un menor tiempo de sobrevida, siendo un factor pronóstico independiente junto con el tamaño del tumor, el grado de diferenciación, los nódulos linfáticos y los márgenes quirúrgicos⁴³.

Javle y colaboradores por otro lado reportaron en una cohorte de 34 pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC que la expresión de

vimentina se asoció al grado de diferenciación del tumor, observando una sobreexpresión de este marcador sólo en tumores pobremente diferenciados no así en tumores bien diferenciados. La expresión alta de vimentina se asoció a un menor tiempo de sobrevida y se observó como un factor pronóstico independiente junto con el grado de diferenciación del tumor.²²⁹

En otro estudio Wang y colaboradores reportaron en una cohorte de 120 pacientes intervenidos quirúrgicamente con diagnóstico de PDAC y tratados con quimioterapia neoadyuvante que la expresión de vimentina fue un factor pronóstico independiente que se asoció a un menor tiempo de sobrevida y a tumores pobremente diferenciados.²³⁰

Dado que vimentina es un marcador de células mesenquimatosas o que estén en TEM, se espera que la alta expresión de este marcador defina periodos más cortos de sobrevida en pacientes con PDAC en estadio clínicos intermedios y avanzados, así como en grados de diferenciación moderados y pobres.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el PDAC es uno de los tumores más letales que existen, esto debido a su naturaleza silente y a la rápida progresión de la enfermedad que, en conjunto con la resistencia a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia, lo hacen intratable. Se sabe que el 80% de los pacientes con PDAC son diagnosticados en estadios clínicos avanzados con un pronóstico desfavorable y que la mediana de sobrevida para todos los estadios clínicos es de 8 meses. Sin embargo, se desconoce si la expresión baja de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM repercute en por que existen pacientes que pueden sobrevivir hasta 5 años, independientemente del estadio clínico y el grado de diferenciación en el que se diagnostiquen. Asimismo, a la fecha no se conoce si las diferencias en la variabilidad de la sobrevida en pacientes diagnosticados con PDAC se deban a características biológicas como el estroma desmoplásico y la transición epitelio mesénquima que participan en el desarrollo de tumores agresivos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Diversos estudios en PDAC han reportado la expresión de marcadores de estroma desmoplásico como α -SMA, fibronectina y vimentina, así como marcadores de TEM como EpCAM, pancitoqueratina y vimentina en ensayos clínicos dónde se les ha asociado con un menor tiempo de sobrevida. Sin embargo, se desconoce si la evaluación cuantitativa de ambas características se asocia a la variabilidad de sobrevida dentro de grupos definidos en estadio clínico (II y III/IV) y grado de diferenciación del tumor (Moderado/pobre). Por lo tanto, en este estudio evaluamos la expresión individual de marcadores del estroma desmoplásico y de TEM para analizar su asociación con variables clínicas en pacientes diagnosticados con PDAC.

5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de páncreas es uno de los tumores con peor pronóstico que existen, este tipo de cáncer no es el más frecuente en cuanto a incidencia se refiere, sin embargo, la tasa de mortalidad que presenta es la más elevada, ocupando la primera posición en letalidad a nivel mundial. El PDAC corresponde al subtipo tumoral más frecuente registrando el 85% de los tumores que se generan en el páncreas, donde la sobrevida general es del 9% a 5 años. Si bien la mayor parte de los pacientes tienen un pronóstico desfavorable, la estratificación pronóstica actual no ha logrado esclarecer porque el tiempo de sobrevida en algunos de ellos muestra una amplia variación y sigue siendo impredecible, independientemente del estadio clínico y grado de diferenciación en el que se diagnostiquen. Los parámetros biológicos como el estroma desmoplásico y la TEM son características que se han descrito en el PDAC y que ayudan en el desarrollo del tumor, por lo que es necesario estudiar si existe una asociación entre la expresión de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM con respecto a la variabilidad de la sobrevida de esta enfermedad dentro de cada estadio clínico y grado de diferenciación.

6. HIPÓTESIS

La expresión elevada de los marcadores de estroma desmoplásico (α -SMA, fibronectina y vimentina) y de TEM (EpCAM, pancitoqueratina y vimentina), se asociarán con una sobrevida menor independientemente del estadio clínico y del grado de diferenciación.

7. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la asociación entre la expresión de marcadores de tejido estromal desmoplásico y tejido tumoral en transición epitelio mesénquima por estadio clínico y grado de diferenciación con respecto a la variabilidad en la sobrevida de pacientes con PDAC.

Objetivos particulares:

1.-Evaluar mediante inmunohistoquímica el nivel de expresión de los marcadores α -SMA, fibronectina y vimentina en tejido estromal desmoplásico de cortes histológicos de pacientes con PDAC y su asociación respecto a las características clínicopatológicas estadio clínico, grado de diferenciación, resecabilidad y sobrevida.

2.-Evaluar mediante inmunohistoquímica el nivel de expresión de los marcadores vimentina, EpCAM y pancitoqueratina en tejido tumoral en transición epitelio mesénquima de cortes histológicos de pacientes con PDAC respecto a las características clínicopatológicas estadio clínico, grado de diferenciación, resecabilidad y sobrevida.

3.-Establecer la relación entre la expresión de marcadores de tejido estromal desmoplásico, así como la expresión de marcadores de tejido tumoral en transición epitelio mesénquima, dentro de cada estadio clínico y grado de diferenciación con la variabilidad en la sobrevida de pacientes con PDAC.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Pacientes y muestras.

Todos los pacientes de este estudio fueron diagnosticados con PDAC y se sometieron a procedimiento de resección pancreática y toma de biopsia en el Hospital de Oncología Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en la Ciudad de México. Debido a que el PDAC no es tan frecuente como otros tumores en nuestro hospital, así como en otros centros médicos internacionales, decidimos hacer un primer acercamiento en el estudio de estos marcadores, como un estudio piloto^{1,113}. Se ha sugerido que el número mínimo de muestras sea calculado de acuerdo con los datos de la fórmula de Cochran²³¹ basado en i) el nivel de $\alpha=0.001$; ii) error de margen bajo = 3%; y iii) la baja frecuencia de la enfermedad = 0.0014. En total en nuestro estudio 25 muestras fueron obtenidas y analizadas en un periodo de tiempo comprendido del 2007 al 2018. Los datos clínico-patológicos se obtuvieron de una base de datos generada a partir de los expedientes clínicos del departamento de archivo clínico del hospital de oncología, estos incluyeron género, edad, estadio T, estadio N, estadio M, estadio clínico (TNM), grado de diferenciación, sobrevida general, tiempo de evolución, tiempo de seguimiento de la primer a la última consulta médica, tiempo de seguimiento del inicio de la enfermedad a la última visita, desmoplasia y tipo de cirugía. Las muestras fueron fijadas en formaldehído y subsecuentemente embebidas en parafina para utilizarse en la construcción de un microarreglo de tejidos (TMA). El uso de muestras humanas fue aprobado por el comité de investigación y ética en investigación en salud del Hospital de Oncología, Centro Médico Siglo XXI, perteneciente al IMSS y registrado con el número de protocolo R-2016-3602-37.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Casos de adenocarcinoma ductal de origen ductal, confirmados por un patólogo experto en PDAC, provenientes del servicio de patología del Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, UMAE (Unidad Médica de Alta Especialidad). Hospital de Oncología.
- Número de cédula y nombre completo del paciente.
- Expediente con información clínica del paciente (físico o electrónico).
- Biopsias y resecciones que correspondieran al tumor primario en bloque de parafina.
- Bloques de parafina (biopsias y resecciones) con suficiente material biológico.
- Casos de PDAC que tuvieran laminillas con tinción de hematoxilina y eosina, que coincidieran con el bloque de parafina.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Casos de adenocarcinoma de páncreas no ductales de origen mucinoso, adenoescamoso, papilar, acinar, pancreatoblastoma, colangiocarcinoma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, tumores neuroendocrinos.
- Casos que no tuvieran información clínica del paciente.
- Biopsias y resecciones que no correspondieran al tumor primario en bloque de parafina (metástasis a ganglios, metástasis a otros sitios), aquellos que no coincidieran con la laminilla teñida de hematoxilina y eosina, fueron descartados.
- Bloques de parafina (biopsias y resecciones) sin suficiente material biológico
- Casos de PDAC que no tuvieran laminillas con tinción de hematoxilina y eosina.

8.2 Diseño del microarreglo de tejidos (TMA) para PDAC.

Con la finalidad de minimizar la variabilidad experimental y obtener reproducibilidad en las tinciones, se utilizó la tecnología de TMA en tejidos embebidos en parafina.²³² Para corroborar el diagnóstico de las muestras de tumor de páncreas, las tinciones de hematoxilina y eosina fueron reevaluadas por dos patólogos expertos en PDAC de acuerdo con la clasificación del 2010 por la Organización Mundial de la Salud. En las muestras tumorales se seleccionaron tres repeticiones con un diámetro de 1mm (core tumoral), los cuales fueron marcados por nuestro patólogo y seleccionadas en zonas con tejido tumoral y tejido desmoplásico estromal para ser trasladadas a un bloque en blanco de parafina utilizando un microarreglador (Chemicon international California USA). Una vez construidos los TMA, se cortaron en secciones seriadas de 3 μ m. La laminilla del microarreglo de tejidos contenía alrededor de 75 cores que correspondieron a las muestras tumorales de 25 pacientes con tres repeticiones cada uno (de cada muestra).

Nosotros establecimos un control de calidad en el diseño y uso del TMA, el cual debía contener al menos un control positivo y negativo a los marcadores utilizados de estroma desmoplásico (α -SMA, fibronectina y vimentina) y TEM (EpCAM, pancitoqueratina y vimentina) además fue necesario corroborar la zona y presencia de los cores utilizados, así como la calidad del core, solo se consideraron los cores que conservaran al menos el 50% del tejido (Figura 14).



Figura 14. Control de calidad de los microarreglos de tejido (TMA). En cada uno de los microarreglos utilizados, se establecieron criterios de calidad en el diseño y uso de los TMA, que correspondía a visualizar controles positivos y negativos para cada marcador utilizado, corroborar zona y presencia del spot, así como la calidad del core y la eliminación de artefactos.

Se decidió trabajar con dos tejidos control en el diseño del TMA, páncreas sano y colón debido a que la expresión de los marcadores de estroma desmoplásico solo marcarían el estroma de ambos tejidos y los marcadores de TEM a su vez marcarían solo tejido epitelial, sin embargo, debido a que, en la mayoría de los TMA (más de la mitad), el tejido control de páncreas se perdió por el proceso inmunohistoquímico, decidimos utilizar el tejido control colón que si se conservó y que además servía como control positivo y negativo de cada uno de los marcadores utilizados.

8.3 Detección de los marcadores α -SMA, fibronectina, vimentina, EpCAM y pancitoqueratina en los TMAs de PDAC por inmunohistoquímica (IHC)

Los microarreglos de tejidos se tiñeron con anti- α -SMA policlonal recombinante en cabra (dilución 1:250; Abcam, Cambridge, UK); anti-fibronectina policlonal recombinante en conejo (dilución 1:1000; Abcam, Cambridge, UK); anti-vimentina monoclonal recombinante en ratón (dilución 1:1000; NSJ Bioreagents, San Diego, Calif); anti-EpCAM monoclonal recombinante en ratón (dilución 1:500; Biolegend, San Diego, Calif): anti-pancitoqueratina (cóctel de citoqueratinas epiteliales CK 7,8,9,17,18,19) monoclonal recombinante en ratón (dilución 1:500; NSJ Bioreagents, San Diego, Calif). Las laminillas fueron desparafinadas a una temperatura de 60°C por 30 min, inmediatamente se lavaron en baños con detergente EZ PREP 1X (Roche, Basilea Suiza) por 5 min para quitar el remanente de parafina de las laminillas. Posteriormente para la recuperación antigénica de las muestras se sumergieron en un buffer de citratos pH6 (Trisodium citrate dihydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), precalentado por 5 min en un horno de microondas. Las laminillas fueron calentadas por 10 min en una olla de presión para microondas (Nordic Ware, St. Louis Park, Minnesota) hasta alcanzar una temperatura de 120°C. Una vez que las muestras se encontraron a temperatura ambiente, las laminillas fueron sumergidas en agua destilada por 10 min. Inmediatamente las laminillas se sumergieron en PBS (HyClone, Logan, Utah) con tween al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) por 5 min. Subsecuentemente la peroxidasa endógena y la proteína (tinción de fondo) fueron bloqueadas con Bloxall (Vector Labs, Burlingame, Calif) por 20 min y suero normal de caballo al 2.5% (Vector Labs, Burlingame, Calif) por 20 min a temperatura ambiente. Después de remover cuidadosamente el suero de caballo al 2.5%, se incubaron los anticuerpos primarios utilizando diluyente de anticuerpo (Leyca Biosystems, Wetzlar, Alemania) a 4°C toda la noche. Al día siguiente las muestras se revelaron con el kit de detección ImmPRESS® horseradish peroxidase (HRP)

de acuerdo con el anticuerpo primario empleado se utilizaron los kits de detección de polímero IgG anti-cabra, anti-conejo, anti-ratón por peroxidasa hecho en caballo (Vector Laboratories, Burlingame, Calif) para los anticuerpos α -SMA, fibronectina, vimentina, EpCAM y pancitoqueratina respectivamente. Todos los anticuerpos secundarios se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Una vez que se lavó el anticuerpo secundario, las muestras fueron cubiertas por el cromógeno diaminobencidina (Abcam, Cambridge, UK) por 5 min, seguido inmediatamente por dos lavados con PBS (HyClone, Logan, Utah) para inhibir la reacción del cromógeno, posteriormente las laminillas fueron sumergidas en agua destilada por 5 min. Finalmente, las laminillas fueron cubiertas por hematoxilina de Harris (Golden Bell, Guadalajara, México) por 30 s y rápidamente se hicieron lavados con agua corriente, por 5 min, enseguida se viraron las muestras utilizando carbonato de litio (Golden Bell, Guadalajara, México) y se lavaron las laminillas nuevamente en agua corriente por 5 min. Por último, se utilizó alcohol isopropílico (ICR, Ciudad de México, México), para secar las laminillas y se montaron inmediatamente con resina entellan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). En nuestros experimentos se generaron duplicados por cada tinción inmunohistoquímica realizada. En las tinciones realizadas se utilizó tejido de colon libre de enfermedad proveniente de una autopsia humana como control de los marcadores inmunohistoquímicos en todas las tinciones. De hecho, las células estromales y epiteliales de este tejido se ocuparon como control negativo y positivo para los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM respectivamente.

8.4 Procedimiento de Evaluación de Inmunohistoquímica

Con la finalidad de evitar la subjetividad en la evaluación de la tinción inmunohistoquímica se realizó un análisis cuantitativo de imagen asistido por computadora, utilizando el software Aperio ePathology Solutions (Leica Biosystems Imaging Inc, Wetzlar, Germany). Las imágenes digitales de las laminillas fueron adquiridas utilizando el escáner digital de ScanScope, (Aperio ePathology Solutions). Las imágenes adquiridas fueron observadas, y organizadas utilizando el visor ImageScope, finalmente se utilizó el sistema administrador de laminillas Spectrum (Aperio ePathology Solutions) para realizar la cuantificación de los marcadores de estroma desmoplásico y TEM.

En el presente estudio se calculó el porcentaje de expresión en píxeles (área positiva de tinción), utilizando el algoritmo de conteo de píxeles positivos V9 de acuerdo con el análisis inmunohistoquímico de cada marcador utilizado.²³³ Un patólogo experto en PDAC, se encargó de seleccionar todo el core tumoral (expresión total para cada anticuerpo) y seleccionar zonas en el TMA correspondiente a tejido estromal desmoplásico y tejido tumoral (figura 15).

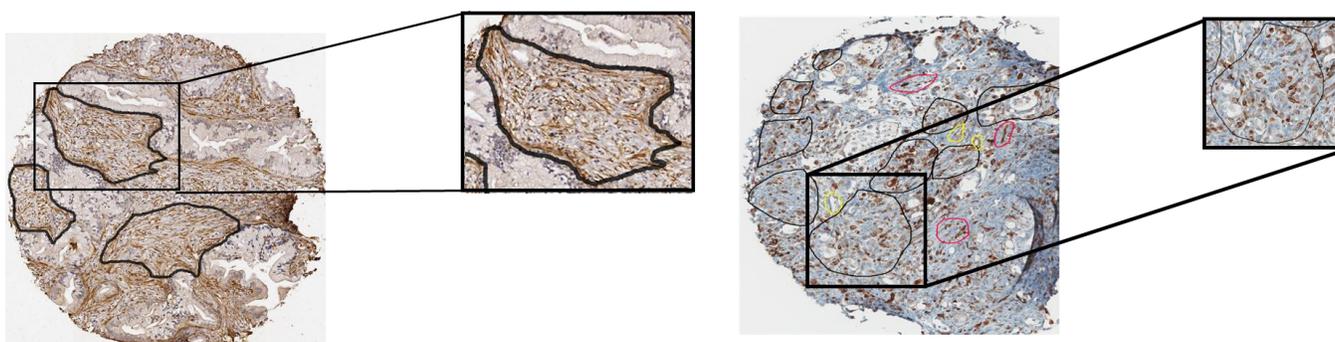


Figura 15. Selección de zonas de tejido estromal desmoplásico y tejido tumoral. En las muestras de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) un patólogo seleccionó los cores y zonas de tejido estromal desmoplásico y de tejido tumoral para realizar el análisis cuantitativo en el software Aperio correspondiente al porcentaje de expresión en píxeles de cada marcador utilizado.

En la selección de cores y zonas se quitaron artefactos (dobles del tejido) que pudieran afectar el análisis realizado. Para calcular el porcentaje de expresión en pixeles, se ocuparon los parámetros del software Aperio, expresión de pixeles moderada: Np (Number of positive pixels), expresión de pixeles fuertes Nsp (Number of strong positive pixels), expresión de pixeles negativos Nn (Number of negative pixels) y expresión de pixeles totales, Nt (Number of total pixels, positive + negative). La fórmula para calcular el porcentaje de expresión en pixeles fue $Np+Nsp/Nt \times 100$.^{233,234} Cada core tumoral y zona de tejido se promedió de acuerdo con el número de muestras obtenidas por paciente (triplicados), la cuantificación obtenida fue el número neto para cada muestra (en el análisis sólo fueron considerados los cores que contenían al menos el 50% de la muestra).

8.5 Análisis estadísticos

Para una visualización comparativa del patrón de porcentaje de expresión de proteínas entre cada estadio clínico, grado de diferenciación y sobrevida analizada, se realizó la creación del mapa de calor del valor de puntuación Z de acuerdo con estudios previos.²³¹ Nosotros diseñamos un mapa de calor basado en los grupos de jerarquía de los niveles de expresión de cada marcador usando la normalización de los datos de la distribución Z (diferencia entre el valor inicial menos el promedio entre la desviación estándar) con ello ordenamos los datos de acuerdo al estadio clínico, grado de diferenciación y sobrevida.

Los valores se clasificaron de acuerdo con la banda de la puntuación Z en expresión alta (colores rosados a rojos), si los datos de cada marcador se encontraban arriba del promedio y en expresión baja (colores azul claro a oscuro), si los datos de cada marcador se encontraban por abajo del promedio. Los datos de cada anticuerpo que se encontraron en el promedio fueron marcados en color

blanco, mientras que los datos que no se pudieron obtener de cada anticuerpo se marcaron en color negro.

El software SPSS (IBM. SPSS Statistics for Windows. Version 21.0. Armonk, New York) fue utilizado para realizar las pruebas estadísticas. La prueba de Chi cuadrada fue utilizada para determinar la asociación entre el estadio clínico, el grado de diferenciación, la sobrevida y la resecabilidad (parámetros categóricos) y

la expresión de los marcadores para "core tumoral", "tejido estromal desmoplásico" y "tejido tumoral" fueron clasificados en alta y baja expresión a partir del valor del promedio para cada uno de los valores (por ejemplo, para cada variable, los valores abajo del promedio fueron considerados como "baja expresión" y los valores iguales o arriba del promedio fueron considerados como "alta expresión"). Los datos de los marcadores fueron clasificados como parámetros categóricos de la siguiente manera: 0 (baja expresión), 1 (alta expresión). Los datos se consideraron significativos cuando el valor de p era ≤ 0.05 .

La sobrevida global se calculó como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico en patología hasta la fecha de la muerte o la fecha del último seguimiento si no se produjo la muerte. El análisis de Kaplan-Meier se utilizó para evaluar la relación entre el nivel de expresión de las proteínas analizadas con el tiempo de sobrevida general. Las muestras se clasificaron en alta y baja expresión y se consideró como punto de corte el promedio de cada marcador. Además de la expresión global de cada proteína se hicieron subclasificaciones considerando el estadio clínico de los pacientes y el grado de diferenciación del tumor. La prueba de Log-rank se usó para evaluar la importancia de las diferencias en las curvas de supervivencia para las muestras con alta o baja expresión del marcador.²³⁵ Se usó el programa estadístico Origin 8 (OriginLab, Northampton, Massachusetts). Los datos se consideraron significativos cuando el valor de p era ≤ 0.05 .

9. RESULTADOS

9.1 Hallazgos histopatológicos

Los datos clínico-patológicos se recuperaron de una base de datos generada a partir de los expedientes clínicos del departamento correspondiente al Archivo Médico del Hospital de Oncología. El estadio TNM se generó de acuerdo con la clasificación TNM, que se determinó a partir de los hallazgos de imagen preoperatorios, los hallazgos intraoperatorios y los hallazgos patológicos postoperatorios⁸. Nuestro estudio recopiló datos de 15 hombres (60%) y 10 mujeres (40%) pacientes con PDAC, con una edad media al momento del diagnóstico de 63 años (rango de 41 a 82 años). Encontramos en el momento del diagnóstico que la mayoría de los pacientes estaban clasificados en el estadio avanzado T y N (84%), sin embargo, en el estadio M encontramos que la mayoría eran M0 (76%).

El estadio clínico II fue predominante aproximadamente en 56% de los casos, mientras que los estadios clínicos III y IV correspondieron al 44% restante. En cuanto al grado de diferenciación, la mayoría de los pacientes se diferenciaron moderadamente (64%). El tiempo de evolución osciló entre 0 y 32 meses, el tiempo de seguimiento de la primera y la última consulta médica osciló entre 1 y 33 meses y el tiempo de seguimiento del inicio de la enfermedad en la última visita osciló entre 0 y 39 meses. En nuestra cohorte de estudio, la supervivencia global media fue de 5 meses (rango, 1-31 meses). Todos los casos fueron positivos para desmoplasia y el tipo de cirugía predominante fue el procedimiento de Whipple (44%). Los datos clínico-patológicos de los pacientes con PDAC se resumen en la tabla 1.

Parámetro	Total (n=25)
Sexo	25 (100%)
Masculino/Femenino	15/10 (60%/40%)
Media de edad al tiempo de cirugía en años (rango)	63 (41-82)
Etapa T	25 (100%)
T2	4 (16%)
T3	12 (48%)
T4	9 (36%)
Etapa N	25 (100%)
N0	4 (16%)
N1	14 (56%)
N2	7 (28%)
Etapa M	25 (100%)
M0	19 (76%)
M1	6 (24%)
Estadio AJCC	25 (100%)
I	0 (0%)
II	14 (56%)
III	5 (20%)
IV	6 (24%)
Grado de diferenciación	25(100%)
Bien diferenciado	0 (0%)
Moderadamente diferenciado	16 (64%)
Pobrememente diferenciado	9 (36%)
Tiempo de evolución	24 (96%)
Mediana de tiempo de evolución en meses (rango)	1 (0-32)
Tiempo de seguimiento de la primer a la última consulta médica	21 (84%)
Mediana (rango)	8 (1-33)
Tiempo de seguimiento del inicio de la enfermedad a la última visita	24 (96%)
Mediana (rango)	12 (0-39)
Sobrevida	22 (88%)
Mediana de supervivencia en meses (rango)	5 (1-31)
Desmoplasia	25 (100%)
Tipo de cirugía	20 (80%)
Whipple	11 (44%)
Lape	3 (12%)
Pancreatectomía Subtotal con Esplenectomía	1 (4%)
Resección Multiestructural	1 (4%)
"WHIPPLE Y LAPE"	2 (8%)
Pancreatectomía	2 (8%)

Tabla 1. Datos clínico-patológicos de los pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). Los datos incluidos en la cohorte retrospectiva del microarreglo de tejidos fueron recopilados del Archivo Médico del Hospital de Oncología, se incluyeron características clínicas e histopatológicas como parte del análisis de este estudio.

9.2 Expresión de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM en muestras de PDAC

En este estudio se analizaron 75 muestras con tejido tumoral y tejido estromal desmoplásico provenientes de una cohorte de 25 pacientes diagnosticados con PDAC para detectar los marcadores de estroma desmoplásico (α -SMA, fibronectina y vimentina) y de TEM (EpCAM, pancitoqueratina y vimentina), esto debido a que se ha sugerido que su expresión podría impactar en el pronóstico de los pacientes ¹⁹.

Los marcadores de nuestro estudio fueron validados en una muestra de tejido control de colon. Los marcadores α -SMA (figura 16 A), fibronectina (figura 16 B) y vimentina (figura 16 C) se expresaron en el citoplasma de células estromales que rodean a las glándulas epiteliales de colon, esto se conoce como tinción peri glandular (figura 17 B), su expresión fue negativa en el tejido epitelial de colon. Los marcadores pancitoqueratina (figura 17 A) y EpCAM (figura 17 B) se expresaron en la membrana y en el citoplasma de células epiteliales de colon siendo una tinción glandular, respectivamente. Su expresión fue negativa en el tejido estromal de colon. El tejido control colón fue utilizado para todos los marcadores (Figura 18).

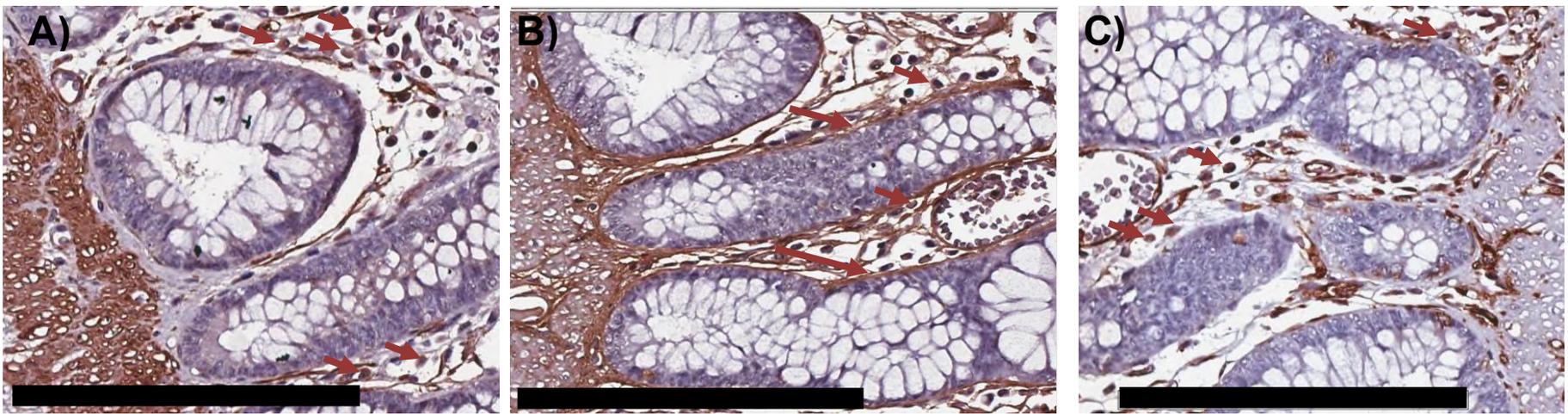


Figura 16. Expresión de los marcadores α -SMA, fibronectina y vimentina en tejido control colón. Los marcadores α -SMA (A) , fibronectina (B) y vimentina (C) se expresaron en el citoplasma de células estromales del tejido colón, que rodea a las glándulas epiteliales. Las flechas cafés pequeñas indican tinción positiva en células estromales, las flechas cafés alargadas indican tinción perilesional que rodea a las glándulas epiteliales (B). Acercamiento 20X. Barra de escala 200 μ .

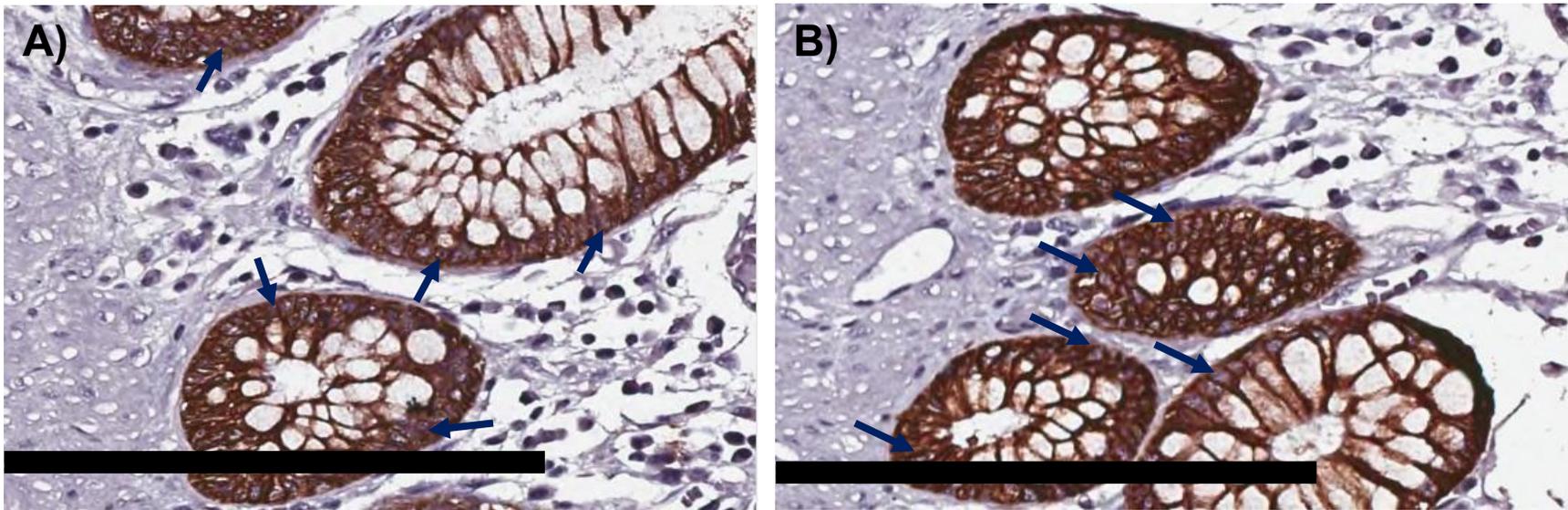


Figura 17. Expresión de los marcadores pancitoqueratina y EpCAM en tejido control colón. Los marcadores pancitoqueratina A), y EpCAM (B) se expresaron en la membrana y citoplasma de células epiteliales del tejido colón, Las flechas azules indican tinción positiva en células epiteliales. Acercamiento 20X. Barra de escala 200 μ .

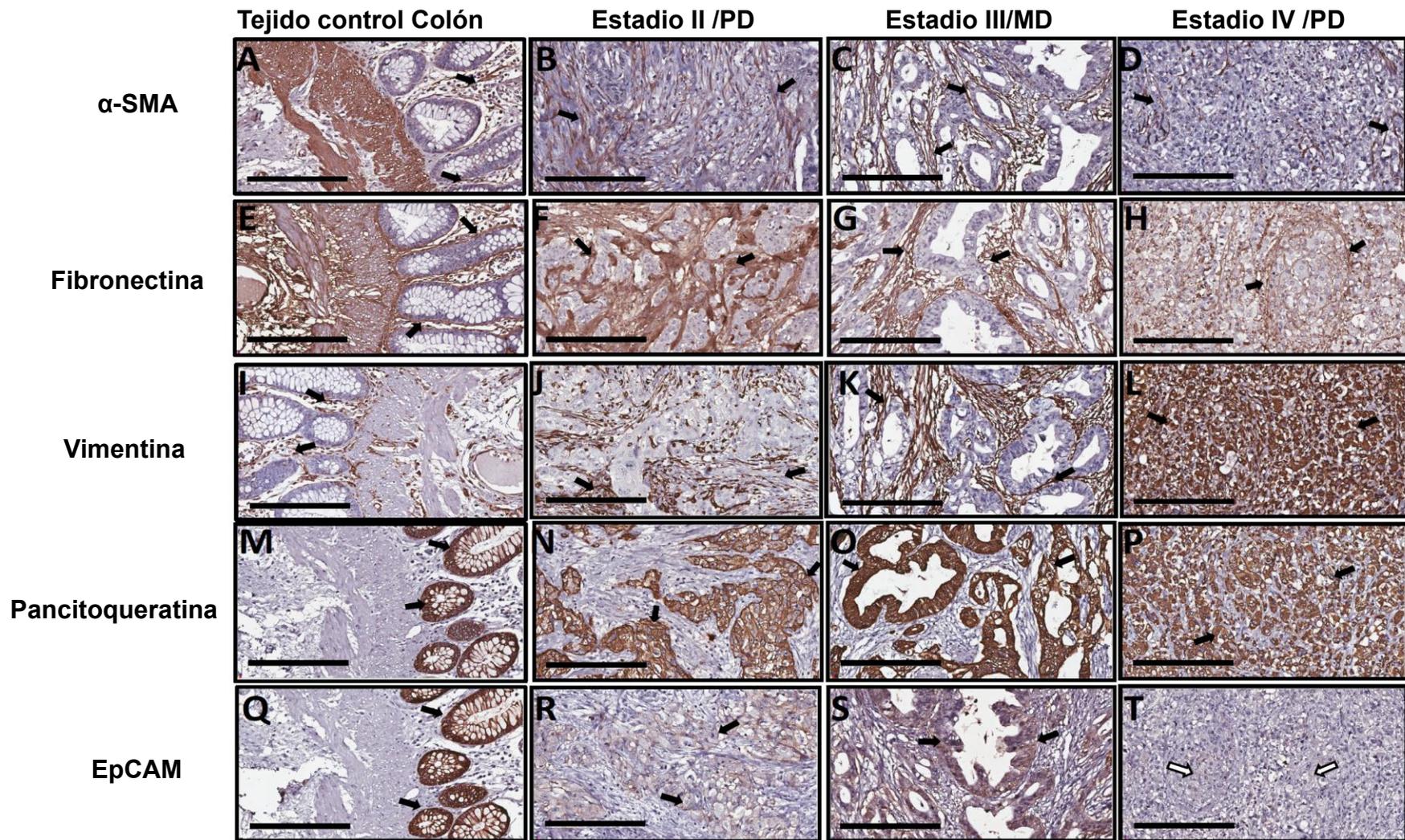


Figura 18. Análisis inmunohistoquímico de los marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima TEM en tejido control de colón y PDAC. Microfotografías representativas de tejido de colón, utilizado como control (A, E, I, M, Q). Tinción peri glandular de células estromales positivas para α SMA (A). Tinción peri glandular de células estromales positivas para fibronectina (E). Tinción peri glandular de células estromales positivas para vimentina (I). Tinción en glándulas epiteliales positivas para EpCAM (M). Tinción en glándulas epiteliales positivas para pancitoqueratina (Q). Las flechas negras indican tinción positiva en estroma (A, E, I). Las flechas negras indican tinción positiva en las glándulas (M,Q). Casos representativos de muestras provenientes de pacientes con PDAC (B, C, D, F, G, H, J, K, L, N, O, P, R, S, T). Estadio clínico II (B, F, J, N, R), Estadio clínico III (C, G, K, O, S), Estadio clínico IV (D, H, L, P, T). Las flechas negras indican tinción perilesional de α SMA (B-D), fibronectina (F-H) y vimentina en el estroma tumoral (J,K). Las flechas negras indican tinción de vimentina (L), pancitoqueratina (N-P) y EpCAM (R-S) en células tumorales. Las flechas blancas indican tinción negativa de EpCAM en células tumorales (T). PD (Pobrememente diferenciado) MD (Moderadamente diferenciado). Todas las tinciones se contra tiñeron con hematoxilina. Acercamiento 20X. Barra de escala 200 μ .

En las muestras de tumor se observaron regiones de desarrollo de estroma desmoplásico en el tejido estromal (tabla 1). No encontramos estadios clínicos I en nuestro estudio (tabla 1), por lo que se evaluó la expresión de marcadores de estroma desmoplásico en estadios II, III y IV. Los marcadores estromales α SMA, fibronectina y vimentina se localizaron rodeando a las glándulas y células tumorales (tinción perilesional) en los tumores (figura 18, B-D; F-H y J, K).

La tinción positiva de α SMA se pudo observar en 22 casos (88%), de los cuales 13 fueron estadio clínico II (52%; figura 18 B), 4 estadio clínico III (16%; figura 18 C) y 5 estadio clínico IV (20%; figura 18 D). La tinción positiva de α SMA se localizó en el 56% de los casos con grado de diferenciación moderado (figura 16 C), así como en el 32% con grado de diferenciación pobre (figuras 18 B y 18 D).

La tinción positiva de fibronectina se pudo observar en 21 casos (84%), de los cuales 13 fueron estadio clínico II (52%; figura 18 F), 4 estadio clínico III (16%; figura 18 G) y 4 estadio clínico IV (16%; figura 18 H). La tinción positiva de fibronectina se localizó en el 52% de los casos con grado de diferenciación moderado (figura 18 G), así como en el 32% con grado de diferenciación pobre (figuras 18 F y 18 H).

La expresión de los marcadores de TEM fue evaluada también en el tejido tumoral (vimentina, pancitoqueratina y EpCAM: figuras 18 J-L, N-P, R-T). La expresión positiva de vimentina fue localizada en 24 casos (96%), 13 de los cuales se encontraban en estadio clínico II (52%), 5 en estadio clínico III (20%) y 6 en estadio clínico IV (24%). La expresión positiva de vimentina fue localizada en el 60% de los casos con grado de diferenciación moderado, pero la tinción fue tenue en la mayoría de los casos (figura 19) y negativa en glándulas tumorales (figuras 18, J, K). La expresión positiva de vimentina fue localizada en el 36% de los casos con grado de diferenciación pobre (figura 18 L). En ambas características estroma desmoplásico y TEM, la expresión de vimentina se observó en el mismo porcentaje para estadio clínico y grado de diferenciación.

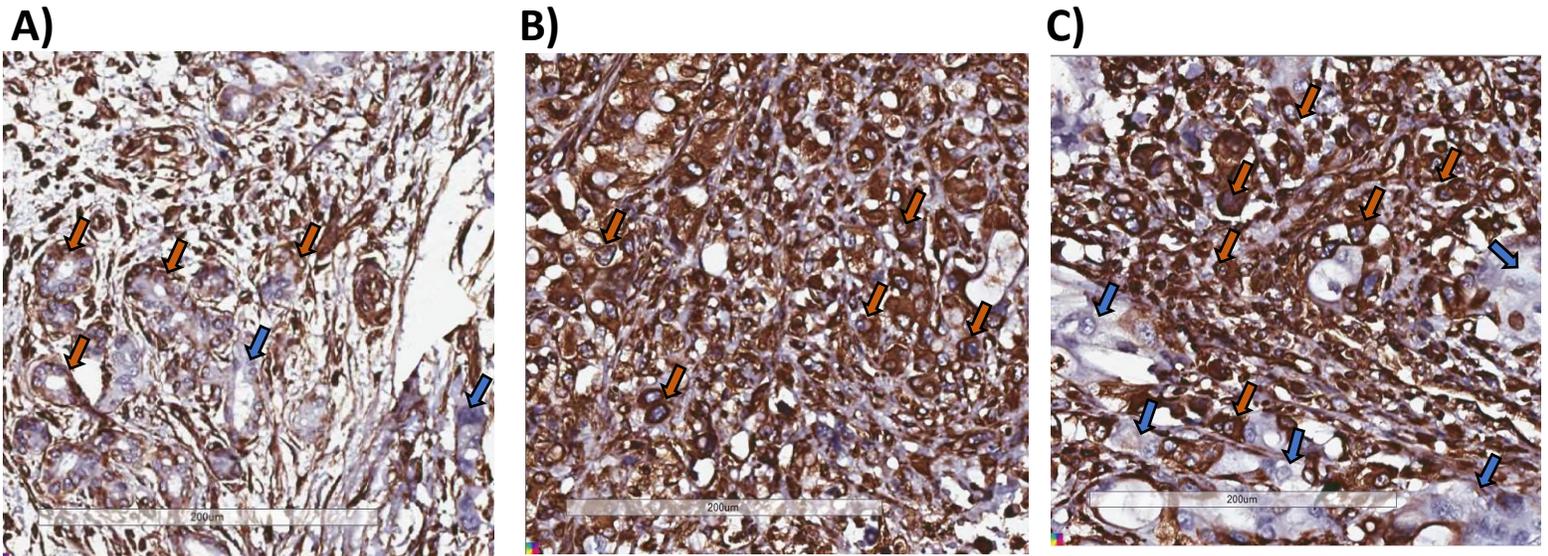


Figura 19. Inmunohistoquímica en tejido tumoral de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) para el marcador vimentina. Las flechas cafés indican tinción positiva tenue de vimentina en células tumorales de un caso moderadamente diferenciado (A), y fuerte en dos casos pobremente diferenciados (B y C), las flechas azules indican tinción negativa en glándulas tumorales. La tinción se contra tiñó con hematoxilina. Acercamiento 20X. Barra de escala 200 µ.

La tinción positiva de pancitoqueratina se pudo observar en 24 casos (96%), de los cuales 14 fueron estadio clínico II (56%; figura 18 N), 5 estadio clínico III (20%; figura 18 O) y 5 estadio clínico IV (20%; figura 18 P). La tinción positiva de pancitoqueratina se localizó en el 60 % de los casos con grado de diferenciación moderado (figura 18 O) y en el 36 % con grado de diferenciación pobre (figura 18 N y 18 P).

La tinción positiva de EpCAM se localizó en 25 de los casos (100%), de los cuales 14 fueron estadio clínico II (56%; figura 18 R), 5 estadio clínico III (20%; figura 18 S) y 6 estadio clínico IV (24%; figura 18 T). La tinción positiva de EpCAM se localizó en el 64% de los casos con grado de diferenciación moderado, marcando glándulas tumorales (figura 18 S) y en el 36% con grado de diferenciación pobre, donde se observó una tinción difusa del marcador (figura 18 R), sin embargo, también existieron casos donde se observaron zonas negativas a EpCAM en células tumorales disgregadas (figura 18 T).

Las microfotografías de vimentina (figura 18 L), de pancitoqueratina (figura 18 P) y de EpCAM (figura 18 T) provienen de un caso seriado con grado de diferenciación pobre donde sólo se observó tinción positiva para vimentina y pancitoqueratina no así para EpCAM. Todos los marcadores de estroma desmoplásico y TEM fueron positivos en nuestra cohorte de estudio.

9.3 Variables clínico-patológicas y su asociación con los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM.

Una vez identificada la expresión de los marcadores, decidimos conocer si existía asociación entre el estroma desmoplásico y la TEM con las variables clínico-patológicas de nuestra cohorte de estudio, para ello identificamos si existían diferentes niveles de expresión entre cada uno de los marcadores. En esta evaluación, se realizó un análisis visual multivariado y se construyó un mapa de calor para las puntuaciones z (Figura 20). Este método mostró heterogeneidad en la expresión de los píxeles para cada marcador de estudio entre los 25 casos de nuestra cohorte incluidos estadio AJCC, grado de diferenciación y sobrevida (Figura 20); por esta razón, cada marcador se separó usando la expresión promedio en píxeles como referencia y clasificamos cada marcador como expresión baja o alta en píxeles.

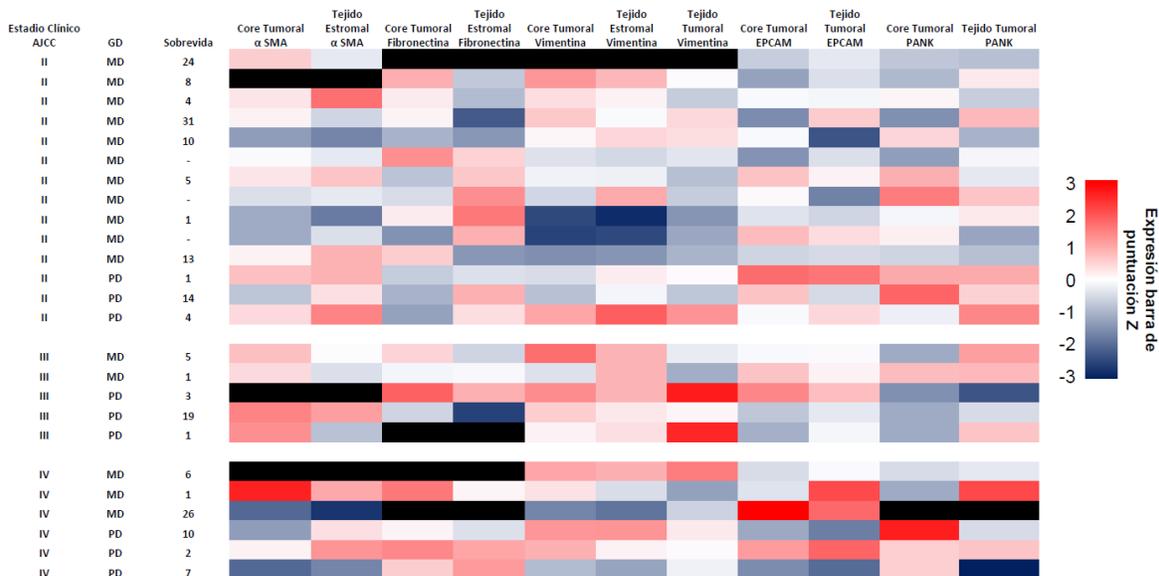


Figura 20. Mapa de calor de las puntuaciones Z. Los niveles bajos de tinción se indican mediante valores que van de -1 a -3 (color azul). Los niveles altos de tinción se indican mediante valores que van de 1 a 3 (color rojo). Las celdas sin valores se indican en negro y las que corresponden a los niveles de expresión medios se indican en blanco. Grado de diferenciación (GD): moderadamente diferenciado (MD) y pobremente diferenciado (PD). La sobrevida está indicada en meses.

La alta expresión de vimentina en el core tumoral se asoció con los estadios clínicos III y IV ($p = 0.041$). La alta expresión de α -SMA en el core tumoral ($p = 0.033$), EpCAM ($p = 0.030$) y pancitoqueratina ($p = 0.050$) en el tejido tumoral se asoció con una menor sobrevida clasificada en menor a 5 meses. La baja expresión de fibronectina en el core tumoral se asoció con resecabilidad positiva ($p = 0.026$). La alta expresión de α -SMA en el tejido estromal se asoció con el grado de diferenciación pobre ($p = 0.035$). Estos resultados se resumen en las tablas 2 y 3.

Variable Clinicopatológica	Marcadores en el Core Tumoral														
	α SMA			Fibronectina			Vimentina			EPCAM			Pancitoqueratina		
	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p
Estadio Clínico II	7	6	0.548	6	8	0.145	4	9	0.041	4	10	0.678	7	7	0.628
Estadio Clínico III y IV	6	3		6	2		8	3		4	7		4	6	
Moderadamente diferenciado	8	6	0.806	8	6	0.746	6	9	0.206	4	12	0.317	6	9	0.459
Pobremente diferenciado	5	3		4	4		6	3		4	5		5	4	
Tiempo de sobrevida < 5 meses	9	1	0.033	6	4	0.845	7	4	0.528	5	6	0.170	5	6	0.801
Tiempo de sobrevida > 5 meses	4	5		5	4		5	5		2	9		4	6	
Resecabilidad Negativa	5	1	0.394	5	0	0.026	7	1	0.061	3	5	0.550	1	6	0.061
Resecabilidad Positiva	7	4		5	7		5	6		3	9		7	5	

Tabla 2. Asociación de características clínico-patológicas con marcadores en core tumoral. Se evaluaron las características clínico-patológicas estadio clínico, grado de diferenciación, sobrevida y reseabilidad para los marcadores de estroma desmoplásico (α SMA, fibronectina y vimentina) y de transición epitelio mesénquima (EPCAM, pancitoqueratina y vimentina) en el core tumoral.

Variable Clinicopatológica	Marcadores en Tejido Estromal y Tejido Tumoral																	
	α SMA (Estromal)			Fibronectina (Estromal)			Vimentina (Estromal)			EPCAM (Tumor)			Pancitoqueratina(Tumor)			Vimentina (Tumor)		
	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p	Alto	Bajo	p
Estadio Clínico II	6	7	0.937	7	6	0.466	6	7	0.188	5	9	0.622	7	7	1.000	3	10	0.247
Estadio Clínico III y IV	4	5		3	5		8	3		5	6		5	5		5	6	
Moderadamente diferenciado	4	10	0.035	5	8	0.284	7	8	0.134	6	10	0.734	7	8	0.673	3	12	0.074
Pobrementemente diferenciado	6	2		5	3		7	2		4	5		5	4		5	4	
Tiempo de sobrevida < 5 meses	6	4	0.498	5	5	0.280	8	3	0.284	7	4	0.030	8	3	0.050	3	8	0.284
Tiempo de sobrevida > 5 meses	4	5		2	6		5	5		2	9		3	7		5	5	
Resecabilidad Negativa	2	4	0.232	2	3	0.889	5	3	0.960	5	3	0.094	5	2	0.109	4	4	0.552
Resecabilidad Positiva	7	4		4	7		7	4		3	9		4	8		4	7	

Tabla 3. Asociación de características clínico-patológicas con marcadores en tejido estromal y tumoral. Se evaluaron las características clínico-patológicas estadio clínico, grado de diferenciación, sobrevida y reseabilidad para los marcadores de estroma desmoplásico (α SMA, fibronectina y vimentina) y de transición epitelio mesénquima (EpCAM, pancitoqueratina y vimentina) en tejido estromal y tejido tumoral.

9.4 La expresión alta de marcadores de estroma desmoplásico y TEM se asocian con una menor sobrevida por estadio clínico y grado de diferenciación.

Se realizó el análisis de sobrevida con la estratificación pronóstica actual (figura 21 A y 21 B) y no encontramos asociación entre la sobrevida y el estadio clínico ($p=0.54$), así como con el grado de diferenciación ($p=0.40$). Posteriormente, decidimos identificar subgrupos para predecir una menor tasa de sobrevida en los diferentes estadios clínicos y grados de diferenciación según la expresión de los marcadores de estroma desmoplásico y TEM en el core tumoral, tejido estromal y tejido tumoral. Con base a nuestro análisis multivariado previamente utilizado con las variables clínico-patológicas, clasificamos cada marcador en baja o alta expresión codificado en píxeles codificados por colores para cada estadio clínico y grado de diferenciación.

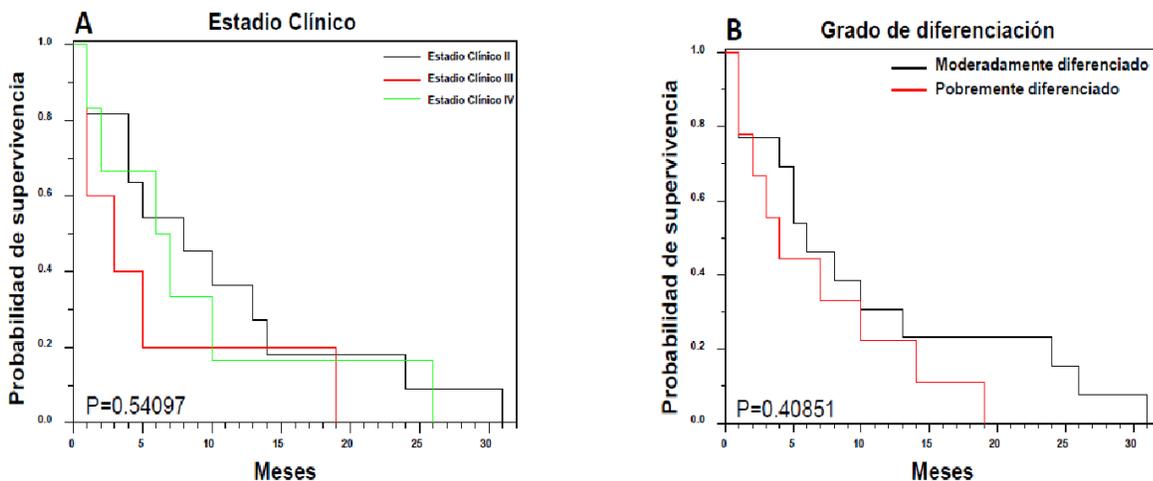


Figura 21. Estratificación pronóstica actual y sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) (A – B). Análisis de Kaplan-Meier de la sobrevida general de los pacientes y el estadio clínico. Las muestras están marcadas en negro para el estadio clínico II, en rojo para el estadio clínico III y en verde para el estadio clínico IV (A). Análisis de Kaplan-Meier de la sobrevida global de los pacientes y grado de diferenciación. Las muestras con grado de diferenciación moderado se marcan en negro y las muestras con grado de diferenciación pobre se marcan en rojo (B).

La expresión alta de α -SMA ($p = 0.03618$), vimentina II ($p = 0.00683$), en el estadio clínico II, así como fibronectina ($p = 0.01554$) y vimentina ($p = 0.03735$) en los estadios clínicos III y IV en el tejido estromal se asociaron con una menor sobrevida. La expresión alta del marcador pancitoqueratina ($p = 0.0393$) en el estadio clínico II de core tumoral y tejido tumoral ($p = 0.00014$) en el estadio clínico III y IV se asoció con una menor sobrevida. Vimentina ($p = 0.03735$) en core tumoral se asoció con una menor sobrevida en estadios clínicos III y IV. Los niveles de expresión altos de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM se asociaron con una menor sobrevida en los estadios clínicos II, III y IV (figura 23).

La expresión alta de los marcadores α -SMA, fibronectina y vimentina se asociaron con una menor sobrevida para los grados de diferenciación moderado (α -SMA $p = 0.02$ / vimentina $p = 0.012$) y pobre (fibronectina $p = 0.01$) en el tejido estromal. La expresión alta de los marcadores pancitoqueratina y EpCAM se asociaron con una menor sobrevida para grado de diferenciación pobre (pan-citoqueratina $p = 0.00185$; EpCAM $p = 0,000085$;) en tejido tumoral. La expresión alta de pancitoqueratina ($p = 0.00977$) en el core tumoral se asoció con una menor sobrevida para el grado de diferenciación moderado. Los niveles de expresión altos de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM se asociaron con una menor sobrevida en tumores con grado de diferenciación pobre y moderado (figura 24).

Todos los análisis de sobrevida que se observan en las figuras 23 y 24, se presentan en la tabla 4. Los análisis de sobrevida que no fueron diferentes para estadio clínico y grado de diferenciación se presentan en las tablas 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Nosotros también realizamos el análisis de sobrevida general en core tumoral, tejido estromal y tejido tumoral, sin embargo, en los análisis de sobrevida no encontramos diferencia entre los grupos con alta y baja expresión de todos los marcadores evaluados (tabla 9).

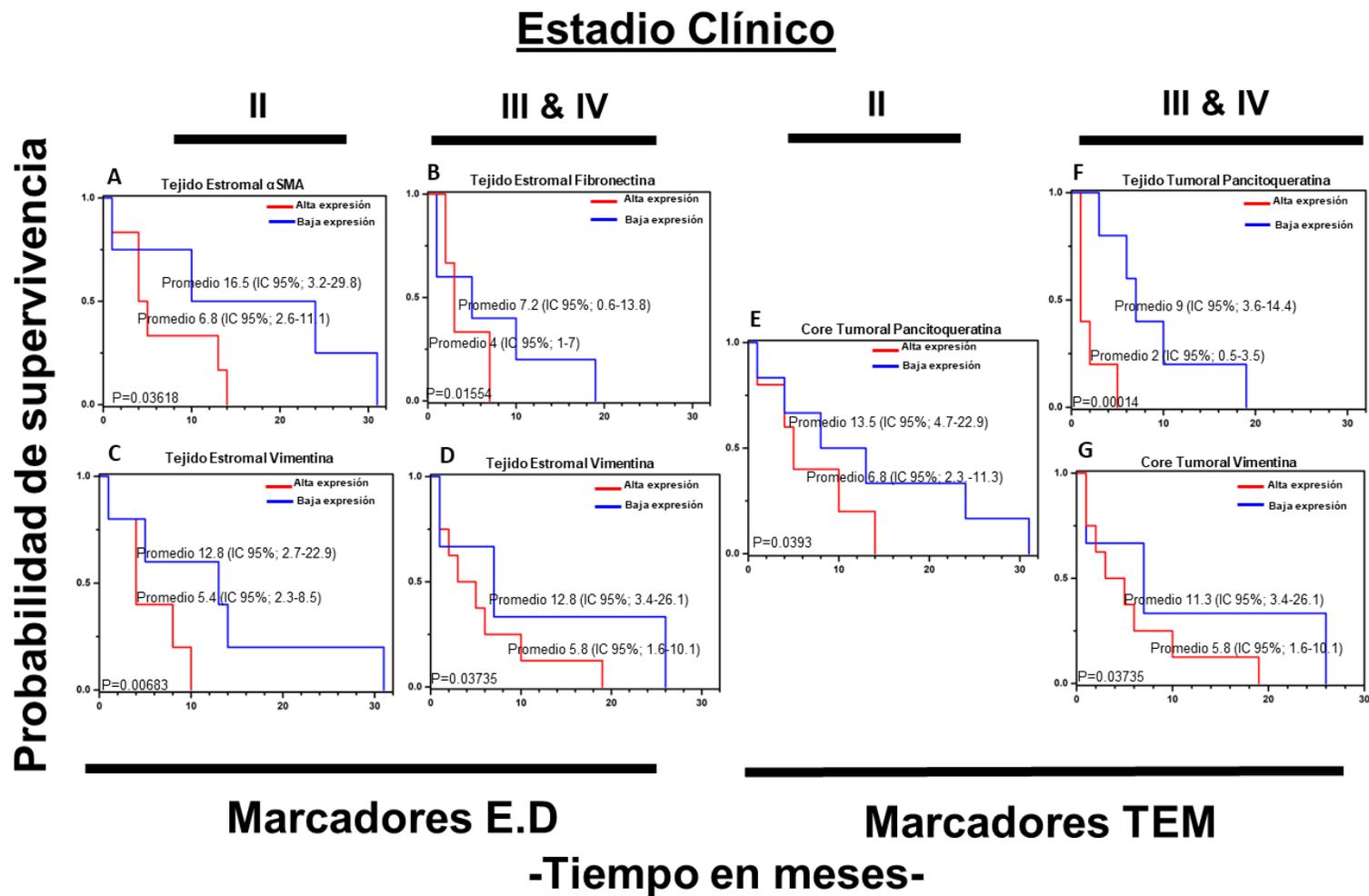


Figura 23. Asociación de marcadores de estroma desmoplásico (E.D) y de transición epitelio mesénquima (TEM) con la supervivencia por estadios clínicos intermedios y avanzados (II, III/IV) en adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). La expresión de los marcadores de E.D y de TEM fue cuantificada y asociada con la supervivencia general de pacientes utilizando el análisis de Kaplan-Meier por estadios clínicos intermedios y avanzados (A-G). El análisis de supervivencia de los marcadores α SMA (n=10; A), vimentina (n=10; C) en tejido estromal y pancitoqueratina en el core tumoral (n=11; E) fueron identificados en el estadio clínico II. El análisis de supervivencia de los marcadores fibronectina (n=8; B), y vimentina en tejido estromal (n=11; D), pancitoqueratina en tejido tumoral (n=10; F) y vimentina en core tumoral (n=11; G) fueron identificados en estadios clínicos III y IV. Para los estadios clínicos (II, III/IV), las muestras con baja expresión están marcadas en azul y las muestras con alta expresión están marcadas en rojo. De manera similar, se muestran los valores medios de supervivencia y los intervalos de confianza (IC) del 95%, se muestran los valores p de la prueba de log rank.

Grado de diferenciación

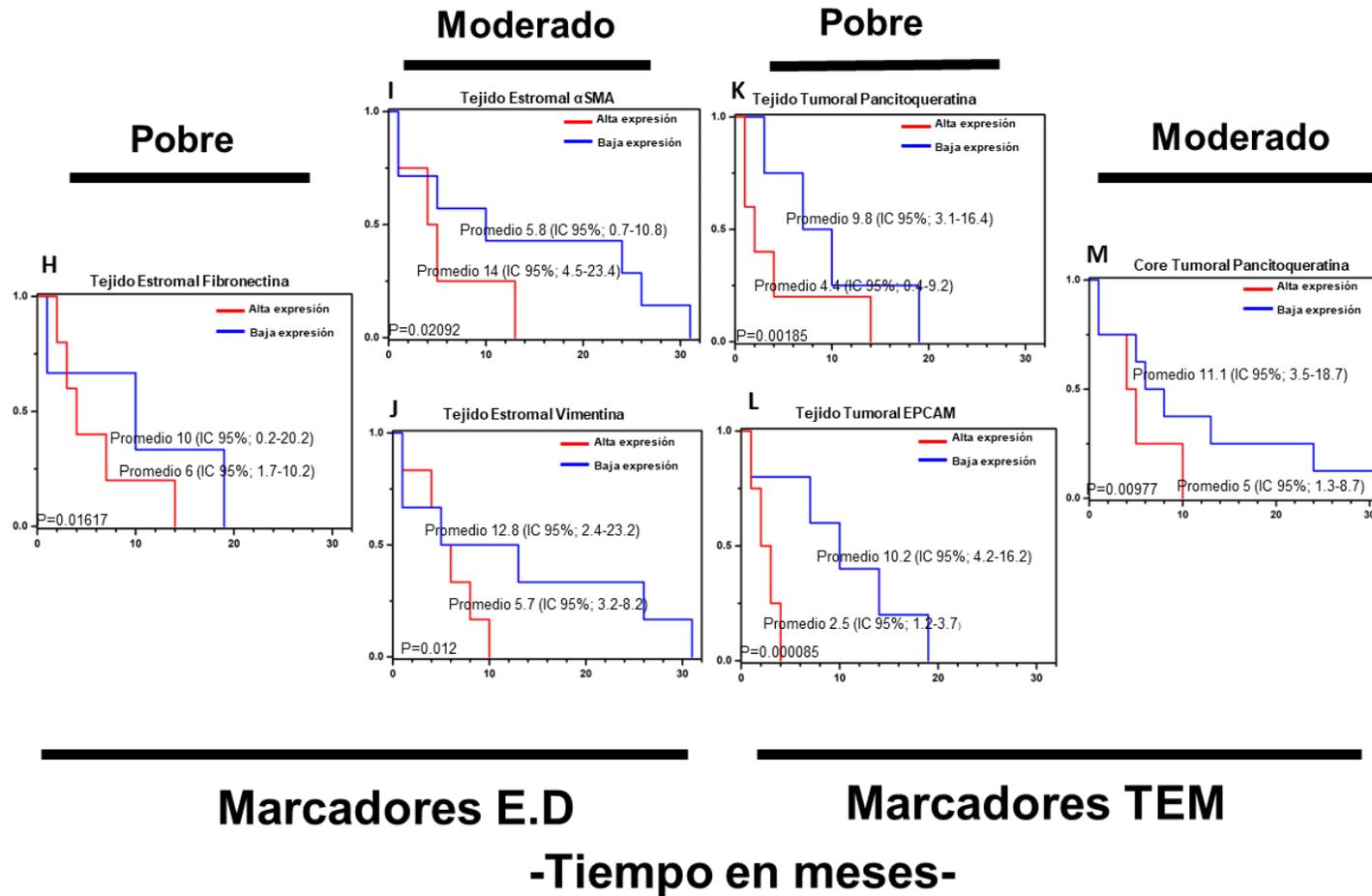


Figura 24. Asociación de marcadores de estroma desmoplásico (E.D) y de transición epitelio mesénquima (TEM) con la supervivencia por grado de diferenciación (moderado y pobre) en adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). El análisis de supervivencia de los marcadores α SMA (n=13; I), vimentina (n=15; J) en tejido estromal y pancitoqueratina en core tumoral (n=14; M) fueron identificados en grados de diferenciación moderados. El análisis de supervivencia de los marcadores fibronectina (n=8; H) en tejido estromal, pancitoqueratina (n=9; K) y EpcAM (n=9; L) en tejido tumoral fueron identificados en grados de diferenciación pobres. Para los grados de diferenciación (moderado y pobre), las muestras con baja expresión están marcadas en azul y las muestras con alta expresión están marcadas en rojo. De manera similar, se muestran los valores medios de supervivencia y los intervalos de confianza (IC) del 95%, se muestran los valores p de la prueba de log rank.

Característica Clínica	N	Tipo de tejido	Marcador niveles de porcentaje de expresión en pixeles (Rango)	Sobrevida en meses	P
Grado de diferenciación moderado	13	Tejido estromal	α SMA alta expresión (21-36)	5.8	0.02092
			α SMA baja expresión (8-19)	14	
Grado de diferenciación moderado	15	Tejido estromal	Vimentina alta expresión (56-72)	5.7	0.012
			Vimentina baja expresión (10-53)	12.8	
Grado de diferenciación pobre	8	Tejido estromal	Fibronectina alta expresión (79-85)	6	0.01617
			Fibronectina baja expresión (61-74)	10	
Grado de diferenciación moderado	14	Core tumoral	Pancitoqueratina alta expresión (25-44)	5	0.00977
			Pancitoqueratina baja expresión (8-23)	11.1	
Grado de diferenciación pobre	9	Tejido tumoral	EpCAM alta expresión (52-79)	2.5	0.000085
			EpCAM baja expresión (12-42)	10.2	
Grado de diferenciación pobre	9	Tejido tumoral	Pancitoqueratina alta expresión (80-86)	4.4	0.00185
			Pancitoqueratina baja expresión (60-74)	9.8	
Estadio clínico II	10	Tejido estromal	α SMA alta expresión (24-36)	6.8	0.03618
			α SMA baja expresión (8-19)	16.5	
Estadio clínico II	10	Tejido estromal	Vimentina alta expresión (56-89)	5.4	0.00683
			Vimentina baja expresión (10-53)	12.8	
Estadio clínico III Y IV	8	Tejido estromal	Fibronectina alta expresión (77-85)	4	0.01554
			Fibronectina baja expresión (61-73)	7.2	
Estadio clínico III Y IV	11	Tejido estromal	Vimentina alta expresión (56-77)	5.8	0.03735
			Vimentina baja expresión (25-47)	12.8	
Estadio clínico II	11	Core tumoral	Pancitoqueratina alta expresión (25-48)	6.8	0.0393
			Pancitoqueratina baja expresión (8-23)	13.5	
Estadio clínico III Y IV	11	Core tumoral	Vimentina alta expresión (44-70)	5.8	0.03735
			Vimentina baja expresión (20-37)	11.3	
Estadio clínico III Y IV	10	Tejido tumoral	Pancitoqueratina alta expresión (81-91)	2	0.00014
			Pancitoqueratina baja expresión (60-75)	9	

Tabla 4. Datos de sobrevida general de los pacientes con positividad a los marcadores indicados en tejido estromal, tejido tumoral y core tumoral por grado de diferenciación y estadio clínico. Asociación de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima (TEM) con estadios clínicos intermedios y avanzados, grado de diferenciación moderado y pobre con la sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.

Característica Clínica	Tipo de tejido	Marcador niveles de porcentaje de expresión en pixeles (Rango)	Sobrevida en meses	P
Grado de diferenciación moderado	Core tumoral	α-SMA alta expresión (14-32)	13.6	0.51912
		α-SMA baja expresión (3-12)	27.5	
	Core tumoral	Fibronectina alta expresión (56-72)	12	0.92278
		Fibronectina baja expresión (28-54)	19.4	
	Tejido Estromal	Fibronectina alta expresión (77-88)	13.1	0.911182
		Fibronectina baja expresión (63-76)	13.6	
	Core Tumoral	Vimentina alta expresión (43-70)	13	0.91095
		Vimentina baja expresión (8-40)	18.5	
	Core Tumoral	EpCAM alta expresión (19-56)	13.8	0.77227
		EpCAM baja expresión (3-18)	20.4	
	Tejido tumoral	EpCAM alta expresión (44-85)	13.3	0.67626
		EpCAM baja expresión (7-43)	16.3	
	Tejido tumoral	PANK alta expresión (78-91)	12.8	0.81933
		PANK baja expresión (70-73)	13.9	

Tabla 5. Datos de sobrevida general de los pacientes con positividad a los marcadores indicados en tejido estromal, tejido tumoral y core tumoral para grado de diferenciación moderado. Resultados negativos de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima (TEM) con el grado de diferenciación moderado respecto a la sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.

Característica Clínica	Tipo de tejido	Marcador niveles de porcentaje de expresión en píxeles (Rango)	Sobrevida en meses	P
Grado de diferenciación pobre	Core tumoral	α-SMA alta expresión (15-24)	9.4	0.98647
		α-SMA baja expresión (3-10)	18.5	
	Tejido Estromal	α-SMA alta expresión (24-34)	10.8	0.27094
		α-SMA baja expresión (9-15)	29.4	
	Spot Total	Fibronectina alta expresión (56-75)	14.6	0.95329
		Fibronectina baja expresión (44-50)	15.6	
	Spot Total	Vimentina alta expresión (44-64)	13.7	0.43325
		Vimentina baja expresión (30-36)	21.6	
	Tejido Estromal	Vimentina alta expresión (56-77)	10.4	0.10706
		Vimentina baja expresión (35-52)	21.7	
	Tejido Tumoral	Vimentina alta expresión (21-60)	14.3	0.49543
		Vimentina baja expresión (12-19)	14.6	
	Core tumoral	EpCAM alta expresión (27-40)	11.3	0.2498
		EpCAM baja expresión (3-18)	19.2	
	Core tumoral	PANK alta expresión (31-59)	8.9	0.23844
		PANK baja expresión (8-22)	20	

Tabla 6. Datos de sobrevida general de los pacientes con positividad a los marcadores indicados en tejido estromal, tejido tumoral y core tumoral para grado de diferenciación pobre. Resultados negativos de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima (TEM) con el grado de diferenciación pobre respecto a la sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.

Característica Clínica	Tipo de tejido	Marcador niveles de porcentaje de expresión en píxeles (Rango)	Sobrevida en meses	P
Estadio clínico II	Core tumoral	α-SMA alta expresión (15-19)	18.4	0.9088
		α-SMA baja expresión (7-12)	23.8	
	Core tumoral	Fibronectina alta expresión (56-69)	11.9	0.29861
		Fibronectina baja expresión (28-51)	18.02	
	Tejido Estromal	Fibronectina alta expresión (79-88)	11.1	0.16013
		Fibronectina baja expresión (63-74)	16.2	
	Core tumoral	Vimentina alta expresión (43-62)	11.1	0.52065
		Vimentina baja expresión (8-40)	19.9	
	Tejido Tumoral	Vimentina alta expresión (21-39)	10.8	0.36015
		Vimentina baja expresión (4-17)	22.13	
	Core tumoral	EpCAM alta expresión (19-40)	15.9	0.88903
		EpCAM baja expresión (3-18)	17	
	Tejido tumoral	EpCAM alta expresión (46-75)	13.8	0.75067
		EpCAM baja expresión (7-42)	18.9	
	Tejido tumoral	PANK alta expresión (78-86)	12.4	0.38819
		PANK baja expresión (71-76)	14.2	

Tabla 7. Datos de sobrevida general de los pacientes con positividad a los marcadores indicados en tejido estromal, tejido tumoral y core tumoral para estadio clínico II. Resultados negativos de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima (TEM) con el estadio clínico II respecto a la sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.

Característica Clínica	Tipo de tejido	Marcador niveles de porcentaje de expresión en pixeles (Rango)	Sobrevida en meses	P
Estadio clínico III y IV	Core tumoral	α-SMA alta expresión (15-32)	13	0.65385
		α-SMA baja expresión (3-7)	16.35	
	Tejido Estromal	α-SMA alta expresión (21-32)	13.5	0.71874
		α-SMA baja expresión (1-18)	16.5	
	Core tumoral	Fibronectina alta expresión (56-75)	13.3	0.38466
		Fibronectina baja expresión (50-54)	36.9	
	Tejido Tumoral	Vimentina alta expresión (21-60)	14.2	0.58912
		Vimentina baja expresión (6-19)	15.2	
	Core tumoral	EpCAM alta expresión (27-56)	14.4	0.53922
		EpCAM baja expresión (3-18)	16.4	
	Tejido tumoral	EpCAM alta expresión (44-85)	15.6	0.60058
		EpCAM baja expresión (12-43)	18.4	
	Core tumoral	PANK alta expresión (31-59)	8.9	0.89437
		PANK baja expresión (8-19)	15.9	

Tabla 8. Datos de sobrevida general de los pacientes con positividad a los marcadores indicados en tejido estromal, tejido tumoral y core tumoral para los estadios clínicos III y IV. Resultados negativos de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima (TEM) con los estadios clínicos III y IV respecto a la sobrevida de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.

Característica Clínica	Tipo de tejido	Marcador niveles de porcentaje de expresión en píxeles (Rango)	Sobrevida en meses	p
Sobrevida	Core tumoral	α-SMA alta expresión (14-32)	8.5	0.61091
		α-SMA baja expresión (3-12)	11.3	
	Tejido Estromal	α-SMA alta expresión (21-36)	7.3	0.37506
		α-SMA baja expresión (1-19)	11.8	
	Core Tumoral	Fibronectina alta expresión (56-75)	7.7	0.90232
		Fibronectina baja expresión (28-54)	9.8	
	Tejido Estromal	Fibronectina alta expresión (77-88)	5.1	0.26278
		Fibronectina baja expresión (61-74)	9.3	
	Core tumoral	Vimentina alta expresión (44-70)	6.7	0.66941
		Vimentina baja expresión (8-40)	7.8	
	Tejido Estromal	Vimentina alta expresión (56-89)	5.69	0.09972
		Vimentina baja expresión (10-53)	12.3	
	Tejido Tumoral	Vimentina alta expresión (22-60)	6.8	0.39513
		Vimentina baja expresión (4-18)	10.5	
	Core tumoral	EpCAM alta expresión (19-56)	7.4	0.5794
		EpCAM baja expresión (3-18)	9.6	
	Tejido tumoral	EpCAM alta expresión (44-85)	8.2	0.88239
		EpCAM baja expresión (7-43)	9.4	
	Core tumoral	PANK alta expresión (25-59)	6	0.29258
		PANK baja expresión (8-23)	9.7	
Tejido tumoral	PANK alta expresión (78-91)	6.3	0.3687	
	PANK baja expresión (60-76)	10.1		

Tabla 9. Datos de sobrevida general de los pacientes con positividad a los marcadores indicados en tejido estromal, tejido tumoral y core tumoral. Resultados negativos de la expresión de marcadores de estroma desmoplásico y de transición epitelio mesénquima (TEM) con la sobrevida general de pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas. En este análisis no se hizo la separación de los estadios clínicos, así como de los grados de diferenciación.

10.DISCUSIÓN

El estroma desmoplásico es una característica que distingue a los PDAC de otros subtipos tumorales en páncreas²⁰ y está directamente asociado a una de las características de malignidad que promueven la diseminación de las células tumorales a vasos sanguíneos y a vasos linfáticos, la TEM.³⁴ Recientemente se ha estudiado el papel que tienen individualmente el estroma desmoplásico y la TEM en el pronóstico de los pacientes con PDAC.^{38,42,43} A pesar de que se ha reportado que ambos parámetros de manera independiente influyen negativamente en la sobrevida de cohortes de pacientes con PDAC,^{38,42,43} no se han realizado estudios que determinen la expresión individual de marcadores de estroma desmoplásico y de TEM en la misma cohorte de estudio, por grupos de estadio clínico (estadios intermedios II/ avanzados III y IV) y grados de diferenciación(moderados/pobres), así como su asociación con los tiempos de sobrevida en cada uno de estos parámetros.

En este estudio encontramos que la alta expresión de los marcadores α SMA, fibronectina y vimentina que se encontraron en el estroma desmoplásico de muestras de pacientes con PDAC se asociaron a una menor sobrevida en estadios clínicos intermedios y avanzados, así como a grados de diferenciación tanto pobre como moderadamente diferenciados. De manera interesante, el mismo comportamiento se observó con los marcadores de TEM vimentina, pancitoqueratina y EpCAM.

A nuestro conocimiento este es el primer estudio que establece una asociación entre la expresión de los marcadores tanto de estroma desmoplásico como de TEM con la sobrevida por grupos de estadio clínico y de grado de diferenciación, lo que sugiere que la evaluación de estos marcadores puede tener una asociación en la variación del tiempo de sobrevida en pacientes con PDAC.

En nuestra cohorte de estudio el marcaje perilesional positivo a los marcadores α SMA y fibronectina coincide con lo reportado en otros grupos^{39,223} donde la acumulación de tejido estromal es una característica que define este tipo de tumores epiteliales.³⁷

Por otro lado, a pesar de que α -SMA previamente se ha asociado con una menor supervivencia de pacientes con PDAC^{37,38} nunca se ha reportado asociada a un menor grado de diferenciación lo que implica la importancia del estroma desmoplásico en el desarrollo de tumores más agresivos, como se reporta en estudios *in vitro* donde se ha demostrado que la interacción entre los CAF y las células tumorales favorece la TEM, adoptando características morfológicas y funcionales que permiten a la célula tumoral, la motilidad, la migración e inclusive la capacidad de generar metástasis en modelos *in vivo*.^{17,23,26,33} Resulta interesante que α -SMA se asociara con tumores pobremente diferenciados, dado que son estas células tumorales las que tienen mayor potencial de salir a la circulación, que aquellas que aún forman glándulas en los grados de diferenciación moderados.

La baja expresión de Fibronectina se asoció a una resecabilidad positiva, lo que implica que una menor cantidad de estroma desmoplásico podría facilitar la intervención quirúrgica, debido a que este marcador estromal forma parte del tejido fibrótico secretado por las células estromales que favorecen el desarrollo del estroma desmoplásico¹⁹ que ocupa más del 80% del volumen tumoral.²⁰ Esta asociación se reporta por primera vez en nuestro estudio, donde otros grupos de investigación han asociado además a este marcador estromal con estadios clínicos avanzados, nódulos linfáticos positivos y tumores más grandes en cohortes de mayor tamaño.³⁹

Un aspecto importante es que el marcador vimentina recientemente ha comenzado a ser evaluado como un marcador de estroma desmoplásico en cohortes de pacientes con PDAC,²³⁶ dado que vimentina se ha descrito principalmente como un marcador de TEM.^{43,229,230} Pese a que en nuestro estudio detectamos su expresión en el citoplasma de células que corresponden al tejido

estromal que rodea a las glándulas tumorales, como se ha reportado en trabajos previos ²²⁶ nosotros además encontramos asociación de su expresión elevada con una pobre supervivencia por estadio clínico y grado de diferenciación. Este es el primer estudio que reporta la asociación de la expresión del marcador vimentina en el estroma desmoplásico con características clínicas de pacientes diagnosticados con PDAC.

La mayoría de los trabajos donde se han evaluado marcadores estromales por inmunohistoquímica ^{38,40,41,224} en PDAC lo hacen de forma cualitativamente o semi cuantitativamente. Nuestro estudio utilizó valores de expresión en píxeles evaluados de forma cuantitativa. Incluso otro grupo de investigación ha trabajado análisis moleculares donde se ha corroborado en muestras de parafina que los niveles incrementados de α SMA a nivel mensajero se asocian con un peor pronóstico sugiriendo que el análisis cuantitativo utilizando muestras de parafina es confiable ²²⁴, sería interesante validar en estudios posteriores si vimentina y fibronectina a nivel mensajero dentro del estroma tumoral pueden asociarse con características clínicas de pacientes con PDAC, lo cual corroboraría aún más la información que generamos en este estudio por nuestro análisis inmunohistoquímico cuantitativo.

En lo que concierne a la tinción inmunohistoquímica de los marcadores de desmoplasia utilizados en este estudio, los patrones de tinción fueron heterogéneos entre los diferentes estadios y grados de diferenciación. Aún no es claro porque existen diferentes patrones de tinción, que modulan la expresión alta o baja de los marcadores de desmoplasia en los pacientes, esto podría atribuirse a vías de señalización que se han estudiado en el estroma desmoplásico de PDAC, como es el caso de Hedgehog (HH) ²³⁷ y el ligando secretado por las células tumorales Sonic Hedgehog (SHH) ²³⁸ los cuales favorecen la generación del estroma desmoplásico rico en fibroblastos observado en este cáncer. ²³⁹

Nuestro trabajo se enfocó en estudiar los marcadores expresados en los CAF que producen la reacción desmoplásica en los tumores de PDAC. El grado de reacción desmoplásica ha sido considerado como un factor independiente a los marcadores

de CAF el cual se ha asociado a un mejor pronóstico en pacientes con PDAC.³⁷ Esto concuerda con otros trabajos que han dirigido terapias anti estroma en modelos *in vivo* a través de anticuerpos neutralizantes²⁴⁰ o knock outs condicionales dirigidos al ligando SHH de la vía HH²³⁹ lo que ha generado resultados controversiales, puesto que las terapias anti estroma promueven un comportamiento más agresivo del tumor, mostrando mayor desdiferenciación histológica, mayor metástasis e incrementando la proliferación celular en el tumor.²³⁹

Se ha propuesto que los estudios posteriores deben centrar la atención a los CAF, más que a la desmoplasia como una entidad homogénea, debido a que puede existir la posibilidad que existan subpoblaciones que modulen la progresión tumoral y otras subpoblaciones que ayuden a retenerlo.²³⁹

Estudios inmunohistoquímicos han destacado que los CAF se encuentran en proximidad con las células tumorales de PDAC lo que sugiere permite una estrecha comunicación dual entre ambas poblaciones.^{38,224} De hecho diversos grupos de investigación han demostrado la participación de los CAF en el desarrollo de la TEM de las células tumorales de PDAC.^{17,21,34,195} Nosotros realizamos la evaluación de los marcadores epiteliales EpCAM y pancitoqueratina, así como del marcador mesenquimatoso vimentina en tumores desmoplásicos de PDAC.

EpCAM ha sido descrito en la literatura como uno de los marcadores que junto con CD44 y CD24 caracterizan a una subpoblación de células iniciadoras de tumor en PDAC.²⁴¹ Estudios recientes han reportado la expresión de EpCAM en CTC's (células tumorales circulantes) de pacientes de tumores epiteliales de mama³⁵ y de páncreas.²⁴² Esta subpoblación de células tumorales positivas a EpCAM se ha sugerido pase por cambios morfológicos que modifiquen su fenotipo epitelial a uno mesenquimatoso.^{35,242,243}

EpCAM Se ha descrito en la literatura como un marcador clave en la búsqueda y separación de CTC's de distintos tumores epiteliales, sin embargo, las células

tumorales que entran en la circulación necesitan la TEM para intravasarse, sobrevivir en el torrente sanguíneo e invadir órganos distantes, es en este proceso donde las células tienen cambios fenotípicos, como la pérdida de expresión de marcadores epiteliales, lo que permite incluso tener un fenotipo muy similar a una célula troncal.³⁵

A pesar de que se pueden localizar CTC's con expresión de EpCAM, existe la limitante de que, en el enriquecimiento de estas células, aquellas que son mesenquimatosas no puedan ser analizadas. Para demostrar que esto sucede se ha trabajado con cultivos *in vitro* en esferoides con células tumorales de mama (MCF-7). Este tipo de cultivos permiten enriquecer una subpoblación de células troncales tumorales y facilitar la TEM. En el trabajo de Hyun y colaboradores en 2016 utilizando cultivos de mamoesferas identificaron por medio de western blot el incremento de genes relacionados a la TEM (snail, twist, slug) lo cual conlleva una reducción en la adhesión célula-célula, donde el decremento de E-cadherina, EpCAM y el incremento de N-cadherina se observó en las células tumorales de los esferoides. En este trabajo se reportó que la expresión disminuida de EpCAM está asociado al proceso de la TEM.³⁵

De hecho en nuestro estudio a pesar que la expresión del marcador epitelial EpCAM se observó en glándulas y células tumorales dispersas, existieron casos donde en los grados de diferenciación pobres el marcador EpCAM tuvo una expresión débil e incluso nula en zonas de células tumorales disgregadas, lo cual podría estar asociado a la TEM que se ha descrito en el trabajo de Hyun y colaboradores.³⁵

Otros marcadores que forman parte del tejido epitelial tumoral son las citoqueratinas, desde su caracterización en líneas tumorales de PDAC por western blot²²⁸ hasta las tinciones inmunohistoquímicas en muestras de tejidos provenientes de pacientes diagnosticados con PDAC se han descrito a las citoqueratinas 7,8,17,18 y 19 como parte del componente tumoral en el tejido epitelial exócrino del páncreas y otros tumores del tracto gastrointestinal.²⁴⁴

Pancitoqueratina se ha utilizado como un marcador para la detección de células tumorales epiteliales en páncreas (desdiferenciación focal) que comparten marcadores mesenquimatosos^{41,244,245}, de hecho es otro de los marcadores que se utilizan para la búsqueda y caracterización de CTC's en PDAC.²⁴⁶ En contraste con otros estudios los cuales han reportado la expresión de pancitoqueratina exclusivamente en la desdiferenciación focal ^{41,242} nosotros reportamos que la expresión de pancitoqueratina se detectó en glándulas y células tumorales dispersas rodeadas por estroma desmoplásico en muestras de PDAC.

En nuestro estudio vimentina se expresó principalmente en células tumorales disgregadas, por lo que el estrecho contacto con el estroma desmoplásico sugiere que en PDAC, estas células pudieran tener mayor facilidad de salir a la circulación en grupos o de forma individual. ^{245,247}

Este es el primer trabajo que estudia la expresión de dos marcadores epiteliales pancitoqueratina, EpCAM y uno mesenquimatoso (vimentina) por inmunohistoquímica en PDAC y que además reporta la asociación entre la alta expresión de vimentina con estadios clínicos avanzados (III y IV). Esta interacción dual entre el estroma desmoplásico y la TEM podría explicar porque este tipo de tumores son más agresivos en estadios clínicos avanzados favoreciendo la transformación de la célula tumoral en un fenotipo más agresivo con alta capacidad de migración y metástasis. Si bien la expresión de EpCAM ya se ha reportado asociada a una menor supervivencia en pacientes con PDAC,³⁹ este es el primer estudio que demuestra la asociación de pancitoqueratina con tasas de supervivencia bajas. No obstante, algunos estudios solo han reportado la expresión de este marcador como un identificador de desdiferenciación focal que a su vez se asocia con una menor tasa de supervivencia.⁴¹

A diferencia de los estudios individuales que han descrito la expresión de los marcadores EpCAM y pancitoqueratina en cohortes de estudio diferentes,^{40,41} el nuestro incluyó la expresión de ambos marcadores en una misma cohorte de pacientes, donde pudimos observar en cortes seriados que en el proceso de TEM, los marcadores epiteliales pueden dejar de expresarse mientras otros se pueden

conservar, como fue el caso de pancitoqueratina, aun cuando las células tumorales comienzan a expresar marcadores mesenquimatosos como vimentina lo que coincide con estudios *in vitro* reportados por otros grupos.^{17,27,34} Podría ser que la generación de desmoplasia y la interacción de las células estromales que desarrollan el exceso de matriz extracelular, sean las que estén favoreciendo este comportamiento dentro del microambiente tumoral de los pacientes diagnosticados con PDAC, por lo tanto, este asociado a una menor sobrevida.

De acuerdo a la estratificación pronóstica actual basada en el estadio clínico (TNM) y en el grado de diferenciación (G), en nuestro estudio estos parámetros no se asociaron a la sobrevida de los pacientes diagnosticados con PDAC, lo cual coincide con otros trabajos publicados aun utilizando un mayor número de pacientes incluidos³⁹ comparado con nuestra cohorte, no obstante estos trabajos a su vez se contraponen con aquellos estudios que incorporan una mayor cantidad de pacientes.^{7,9} A pesar de ello, se ha reportado que, en cada estadio clínico, incluso en aquellos avanzados, se observa heterogeneidad en el tiempo de sobrevida de los pacientes donde si bien el 75% fallece a los 5 meses de ser diagnosticados con PDAC un 9% puede sobrevivir hasta 5 años¹⁵, lo cual no se explica con la estratificación pronóstica actual.^{16,248}

Al elegir un panel de anticuerpos de estroma desmoplásico y de TEM por cada paciente, encontramos que la expresión de los marcadores en el mapa de calor era heterogénea en todos los casos de nuestra cohorte de estudio, lo que indicó la presencia de subgrupos de alta y baja expresión de donde partió nuestro análisis. Nuestro estudio es el primero en reportar que la variabilidad en la sobrevida de los pacientes depende de la expresión elevada de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM, cuando se categoriza por los diferentes estadios clínicos intermedios y avanzados (II, III y IV) y grados de diferenciación (moderado y pobre).

El análisis de imagen cuantitativo nos permitió observar en las gráficas de Kaplan Meier que la expresión mayor de cada uno de los marcadores definió una sobrevida más corta, en los grupos de estadio clínico (estadio clínico II/III y IV) y

grado de diferenciación (moderado, pobre), a diferencia de otros trabajos donde se han asociado individualmente estos marcadores con la sobrevida general de los pacientes de PDAC.^{38–40,43} Esto no ocurrió en nuestro estudio lo que probablemente se deba al tamaño de muestra.

Sin embargo, este hallazgo nos permitió observar en nuestra cohorte de estudio que la expresión en pixeles mayor de cada marcador definió porque unos pacientes sobreviven menos que otros y que esto no depende necesariamente de estadios clínicos avanzados o grados de diferenciación pobres. El estudio de la sobreexpresión de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM que están directamente relacionados a la interacción entre las células estromales que generan la desmoplasia y que además proveen a las células tumorales el incremento de su motilidad y salida a la circulación impactan de manera negativa en la sobrevida, independientemente de los criterios de la estratificación pronóstica actual.

Existe un estudio de una cohorte de 153 pacientes con PDAC en la literatura que ha reportado que la sobreexpresión de EpCAM se asocia a un menor tiempo de sobrevida en estadios clínicos avanzados, en comparación con aquellos pacientes donde no se observó sobreexpresión de este marcador epitelial⁴⁰, Un estudio similar al de EpCAM reportó que la sobreexpresión de α -SMA en 144 pacientes en estadio IIB se asoció con un tiempo de sobrevida más corto que en pacientes sin sobreexpresión de este marcador estromal.³⁸

Estos hallazgos preliminares clave, pertenecen a análisis semicuantitativos realizados en pacientes con PDAC que indican que los marcadores de TEM pueden estar asociados a una menor sobrevida en los estadios clínicos III y IV⁴⁰ y los marcadores estromales podrían estar asociados a una menor sobrevida en los estadios clínicos II³⁸, de hecho en nuestra cohorte de pacientes mexicanos con este subtipo de cáncer de páncreas se observa este comportamiento, no obstante nosotros incluimos en nuestro estudio, estadios clínicos IIA.

No obstante, al clasificar los estadios clínicos y grados de diferenciación por subgrupos nuestra cohorte de estudio se vio reducida, lo cual es una limitante en nuestro trabajo. Sin embargo, este trabajo no ha sido el único que ha utilizado un número reducido de muestras, de hecho, cohortes pequeñas de 7 y 10 pacientes han sido documentados en otros estudios respectivamente.^{249,250} Con los resultados generados en este estudio piloto es necesario realizar proyectos posteriores con un tamaño de muestra mayor que nos puedan indicar que este comportamiento se sigue observando, que además incluyan al estadio clínico I, así como tumores bien diferenciados que nos permitan identificar si la expresión de cada uno de los marcadores también se asocia con la sobrevida general de los pacientes con PDAC como ha sido demostrado previamente.

11. CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio mostró que los marcadores de estroma desmoplásico (α -SMA, fibronectina y vimentina) y de TEM (EpCAM, pancitoqueratina y vimentina) están asociados al estadio clínico, al grado de diferenciación, la resecabilidad y a la sobrevida evaluada en una cohorte de pacientes con PDAC. Además, la mayor expresión de los marcadores α SMA, fibronectina, vimentina, EpCAM y pancitoqueratina se asociaron con un menor tiempo de sobrevida en los diferentes grupos de estadio clínico (Estadios II, III y IV) y grado de diferenciación (moderado/pobre). La inclusión de los marcadores de estroma desmoplásico y de TEM en la estratificación pronóstica, podría mejorar el entendimiento de los diferentes tiempos de sobrevida de los pacientes con PDAC, independientemente del estadio clínico y grado de diferenciación en el que se diagnostiquen y con ello contribuir a la estratificación pronóstica actual. Además, estos resultados podrían contribuir al estudio de terapias blanco-dirigidas hacia el estroma desmoplásico que modula la transformación de células tumorales en TEM con mayor capacidad de invasión y metástasis, sin embargo, esto aún está en fase de estudio debido a las diferentes subpoblaciones de CAF que conforman el estroma desmoplásico y el cómo modulan el microambiente tumoral.

12. PERSPECTIVAS

En este estudio piloto encontramos asociación de la expresión de los marcadores de estroma desmoplásico y transición epitelio mesénquima con una menor supervivencia de pacientes diagnosticados con PDAC en estadios clínicos II, III y IV así como en grados de diferenciación pobres y moderados, sin embargo a pesar de que nuestros hallazgos son importantes, es necesario incrementar el tamaño de muestra en un estudio prospectivo, para incluir estadios clínicos I y tumores bien diferenciados los cuales no pudimos conseguir en este primer estudio. Sin embargo, pensamos que incrementando el número de centros hospitalarios se puedan conseguir estadios clínicos IB y tumores bien diferenciados de al menos un periodo mínimo de tiempo de 10 a 15 años, tal como lo han hecho otros grupos de investigación.

Además, el estudio de subpoblaciones de CAF es imprescindible en el entendimiento del desarrollo y progresión rápida de esta enfermedad, por lo que también es necesario evaluar por inmunofluorescencia la co-expresión de marcadores que puedan distinguir a diferentes grupos de CAF en los tumores de PDAC y describir las zonas donde se localicen estos grupos de células miofibroblastoides como continuación del presente trabajo.

La relación dual entre el estroma desmoplásico y el tumor es un factor clave en el entendimiento del desarrollo tumoral y de terapias blanco dirigidas al PDAC, más aún el siguiente paso debe ser aislar subpoblaciones de CAF y realizar co-cultivos celulares con las células tumorales que diferencien su función biológica en PDAC, debido a que se han realizado estudios donde el estroma ha sido eliminado y como consecuencia se acelera la progresión del tumor, por lo que aún es mucho lo que se desconoce de la relación entre el estroma y el desarrollo de los adenocarcinomas pancreáticos, es necesario incluir el estudio de estas subpoblaciones de CAF en futuros trabajos.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home>. 25 de agosto 2022.
2. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
3. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **10**, 10–27 (2019).
4. Aaltonen, L. A. & Hamilton, S. R. World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press: Lyon. 219-221 (2000).
5. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed (2006).
6. Mohammed, S., Van Buren II, G. & Fisher, W. E. Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 9354–9360 (2014).
7. Bilimoria, K. Y. *et al.* Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer* **110**, 738–744 (2007).
8. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, *et al.*, editores. *Manual de estadificación del cáncer del AJCC*. Springer International Publishing; (2017).

9. Wasif, N. *et al.* Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging? *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 2312–2320 (2010).
10. Rochefort, M. M. *et al.* Impact of tumor grade on pancreatic cancer prognosis: validation of a novel TNMG staging system. *Ann. Surg. Oncol.* **20**, 4322–4329 (2013).
11. Hlavsa, J. *et al.* Tumor grade as significant prognostic factor in pancreatic cancer: validation of a novel TNMG staging system. *Neoplasma* **65**, 637–643 (2018).
12. Ren, H. *et al.* Equipping the American Joint Committee on Cancer Staging for Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with Tumor Grade: A Novel Staging System. *J. Oncol.* **2020**, 9093729 (2020).
13. Winter, J. M. *et al.* 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* **10**, 1199–1210; discussion 1210-1211 (2006).
14. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet* **363**, 1049–1057 (2004).
15. Peran, I., Madhavan, S., Byers, S. W. & McCoy, M. D. Curation of the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Subset of the Cancer Genome Atlas Is Essential for Accurate Conclusions about Survival-Related Molecular Mechanisms. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **24**, 3813–3819 (2018).
16. He, C., Zhang, Y., Cai, Z., Lin, X. & Li, S. Overall survival and cancer-specific survival in patients with surgically resected pancreatic head adenocarcinoma: A competing risk nomogram analysis. *J. Cancer* **9**, 3156–3167 (2018).

17. Waghray, M. *et al.* GM-CSF Mediates Mesenchymal-Epithelial Cross-talk in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* **6**, 886–899 (2016).
18. Erkan, M. *et al.* Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology* **132**, 1447–1464 (2007).
19. Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W. & Pandol, S. J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* **117**, 50–59 (2007).
20. Nielsen, M. F. B., Mortensen, M. B. & Detlefsen, S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J. Gastroenterol.* **22**, 2678–2700 (2016).
21. Bachem, M. G. *et al.* Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* **115**, 421–432 (1998).
22. Eguchi, D. *et al.* Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor. *J. Surg. Res.* **181**, 225–233 (2013).
23. Vonlaufen, A. *et al.* Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 2085–2093 (2008).
24. Kalli, M., Papageorgis, P., Gkretsi, V. & Stylianopoulos, T. Solid Stress Facilitates Fibroblasts Activation to Promote Pancreatic Cancer Cell Migration. *Ann. Biomed. Eng.* **46**, 657–669 (2018).

25. Sada, M. *et al.* Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. *Cancer Lett.* **372**, 210–218 (2016).
26. Öhlund, D. *et al.* Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **214**, 579–596 (2017).
27. Li, D. *et al.* Radiation promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic cancer cell by activating carcinoma-associated fibroblasts. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 2192–2206 (2016).
28. Marrache, F. *et al.* Role of bone marrow-derived cells in experimental chronic pancreatitis. *Gut* **57**, 1113–1120 (2008).
29. Direkze, N. C. *et al.* Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* **64**, 8492–8495 (2004).
30. Apte, M. V., Pirola, R. C. & Wilson, J. S. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front. Physiol.* **3**, 344 (2012).
31. von Ahrens, D., Bhagat, T. D., Nagrath, D., Maitra, A. & Verma, A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **10**, 76 (2017).
32. Bachem, M. G. *et al.* Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* **128**, 907–921 (2005).
33. Xu, Z. *et al.* Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am. J. Pathol.* **177**, 2585–2596 (2010).

34. Kikuta, K. *et al.* Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403**, 380–384 (2010).
35. Hyun, K.-A. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget* **7**, 24677–24687 (2016).
36. Maier, H. J., Wirth, T. & Beug, H. Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Cancers* **2**, 2058–2083 (2010).
37. Sinn, M. *et al.* α -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study. *Br. J. Cancer* **111**, 1917–1923 (2014).
38. Haeberle, L. *et al.* Stromal heterogeneity in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* (2018)
doi:10.1016/j.pan.2018.05.004.
39. Hu, D. *et al.* Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **17**, 29 (2019).
40. Fong, D. *et al.* Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J. Clin. Pathol.* **61**, 31–35 (2008).
41. Karamitopoulou, E. *et al.* Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **49**, 1032–1039 (2013).
42. Matros, E. *et al.* Cytokeratin 20 expression identifies a subtype of pancreatic adenocarcinoma with decreased overall survival. *Cancer* **106**, 693–702 (2006).

43. Myoteri, D. *et al.* Prognostic Evaluation of Vimentin Expression in Correlation with Ki67 and CD44 in Surgically Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2017**, (2017).
44. Muckenhuber, A. *et al.* Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Subtyping Using the Biomarkers Hepatocyte Nuclear Factor-1A and Cytokeratin-81 Correlates with Outcome and Treatment Response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **24**, 351–359 (2018).
45. Hidalgo, M. *et al.* Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **15**, 8–18 (2015).
46. De La Cruz, M. S. D., Young, A. P. & Ruffin, M. T. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am. Fam. Physician* **89**, 626–632 (2014).
47. Li, D., Xie, K., Wolff, R. & Abbruzzese, J. L. Pancreatic cancer. *Lancet* **363**, 1049–1057 (2004).
48. Ilic, M. & Ilic, I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 9694–9705 (2016).
49. Matrisian, L. M. & Berlin, J. D. The Past, Present, and Future of Pancreatic Cancer Clinical Trials. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* **35**, e205-215 (2016).
50. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).

51. Lucas, A. L. *et al.* Global Trends in Pancreatic Cancer Mortality From 1980 Through 2013 and Predictions for 2017. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 1452-1462.e4 (2016).
52. Gad, M. M. *et al.* Temporal trends of pancreatic ductal adenocarcinoma in young adults in the United States: A Population-Based Study. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* (2019) doi:10.1016/j.clinre.2019.07.001.
53. Ryan, D. P., Hong, T. S. & Bardeesy, N. Pancreatic adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1039–1049 (2014).
54. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet Lond. Engl.* **378**, 607–620 (2011).
55. Koorstra, J.-B. M., Hustinx, S. R., Offerhaus, G. J. A. & Maitra, A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **8**, 110–125 (2008).
56. Wolfgang, C. L. *et al.* Recent progress in pancreatic cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **63**, 318–348 (2013).
57. Spadi, R. *et al.* Current therapeutic strategies for advanced pancreatic cancer: A review for clinicians. *World J. Clin. Oncol.* **7**, 27–43 (2016).
58. Tien, Y. W. *et al.* A High Circulating Tumor Cell Count in Portal Vein Predicts Liver Metastasis From Periampullary or Pancreatic Cancer: A High Portal Venous CTC Count Predicts Liver Metastases. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3407 (2016).

59. American gastroenterological association medical position statement: epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* **117**, 1463–1484 (1999).
60. Porta, M. *et al.* Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **7**, 189–197 (2005).
61. Midha, S., Chawla, S. & Garg, P. K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* **381**, 269–277 (2016).
62. Fuchs, C. S. *et al.* A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch. Intern. Med.* **156**, 2255–2260 (1996).
63. Lynch, S. M. *et al.* Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am. J. Epidemiol.* **170**, 403–413 (2009).
64. Vrieling, A. *et al.* Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Cancer* **126**, 2394–2403 (2010).
65. Wang, Y.-T., Gou, Y.-W., Jin, W.-W., Xiao, M. & Fang, H.-Y. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer* **16**, 212 (2016).
66. Lucenteforte, E. *et al.* Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23**, 374–382 (2012).

67. Tramacere, I. *et al.* Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int. J. Cancer* **126**, 1474–1486 (2010).
68. Michaud, D. S. *et al.* Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). *Cancer Causes Control CCC* **21**, 1213–1225 (2010).
69. Rahman, F., Cotterchio, M., Cleary, S. P. & Gallinger, S. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PloS One* **10**, e0124489 (2015).
70. Li, D. *et al.* Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA* **301**, 2553–2562 (2009).
71. Aune, D. *et al.* Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23**, 843–852 (2012).
72. Michaud, D. S. *et al.* Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 518–524 (2005).
73. Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int. J. Epidemiol.* **44**, 186–198 (2015).
74. Lightsey, D. & National Council Against Health Fraud and Quackwatch. Comment on ‘Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies’. *Br. J. Cancer* **107**, 754–755 (2012).

75. Stolzenberg-Solomon, R. Z. *et al.* Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **16**, 2664–2675 (2007).
76. Beaney, A. J. *et al.* Higher Meat Intake Is Positively Associated With Higher Risk of Developing Pancreatic Cancer in an Age-Dependent Manner and Are Modified by Plasma Antioxidants: A Prospective Cohort Study (EPIC-Norfolk) Using Data From Food Diaries. *Pancreas* **46**, 672–678 (2017).
77. Paluszkiewicz, P., Smolińska, K., Dębińska, I. & Turski, W. A. Main dietary compounds and pancreatic cancer risk. The quantitative analysis of case-control and cohort studies. *Cancer Epidemiol.* **36**, 60–67 (2012).
78. Ojajärvi, I. A. *et al.* Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* **57**, 316–324 (2000).
79. Bosch de Basea, M. *et al.* Relationships between occupational history and serum concentrations of organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. *Occup. Environ. Med.* **68**, 332–338 (2011).
80. Porta, M. *et al.* Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Lancet Lond. Engl.* **354**, 2125–2129 (1999).
81. Hartwig, A. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **23**, 951–960 (2010).

82. Hartwig, A., Krüger, I. & Beyersmann, D. Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair. *Toxicol. Lett.* **72**, 353–358 (1994).
83. Kasprzak, K. S. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 604–615 (1991).
84. Lee, Y. W. *et al.* Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2547–2557 (1995).
85. Ahamed, M. *et al.* Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* **283**, 101–108 (2011).
86. Schwartz, G. G. & Reis, I. M. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **9**, 139–145 (2000).
87. Kriegel, A. M. *et al.* Serum cadmium levels in pancreatic cancer patients from the East Nile Delta region of Egypt. *Environ. Health Perspect.* **114**, 113–119 (2006).
88. Schwerdtle, T. *et al.* Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 432–442 (2010).
89. Bertin, G. & Averbeck, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**, 1549–1559 (2006).

90. Candéias, S., Pons, B., Viau, M., Caillat, S. & Sauvaigo, S. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: analysis on dedicated biochips. *Mutat. Res.* **694**, 53–59 (2010).
91. Waalkes, M. P., Cherian, M. G., Ward, J. M. & Goyer, R. A. Immunohistochemical evidence of high concentrations of metallothionein in pancreatic hepatocytes induced by cadmium in rats. *Toxicol. Pathol.* **20**, 323–326 (1992).
92. Yorifuji, T., Tsuda, T. & Grandjean, P. Unusual cancer excess after neonatal arsenic exposure from contaminated milk powder. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 360–361 (2010).
93. Yorifuji, T., Tsuda, T., Doi, H. & Grandjean, P. Cancer excess after arsenic exposure from contaminated milk powder. *Environ. Health Prev. Med.* **16**, 164–170 (2011).
94. Straif, K. *et al.* A review of human carcinogens--Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol.* **10**, 453–454 (2009).
95. Qin, X.-J. *et al.* Dual actions involved in arsenite-induced oxidative DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1806–1813 (2008).
96. Pu, Y.-S., Jan, K.-Y., Wang, T.-C., Wang, A. S. S. & Gurr, J.-R. 8-Oxoguanine DNA glycosylase and MutY homolog are involved in the incision of arsenite-induced DNA adducts. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **95**, 376–382 (2007).
97. Reichard, J. F. & Puga, A. Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics* **2**, 87–104 (2010).
98. Brown, K. M. & Arthur, J. R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* **4**, 593–599 (2001).

99. Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 775–806 (2007).
100. Amaral, A. F. S., Cantor, K. P., Silverman, D. T. & Malats, N. Selenium and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 2407–2415 (2010).
101. Bardia, A. *et al.* Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 23–34 (2008).
102. Zhuo, H., Smith, A. H. & Steinmaus, C. Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **13**, 771–778 (2004).
103. Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G. & Gluud, C. Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004183 (2008) doi:10.1002/14651858.CD004183.pub3.
104. Etminan, M., FitzGerald, J. M., Gleave, M. & Chambers, K. Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control CCC* **16**, 1125–1131 (2005).
105. Burney, P. G., Comstock, G. W. & Morris, J. S. Serologic precursors of cancer: serum micronutrients and the subsequent risk of pancreatic cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**, 895–900 (1989).

106. Murawaki, Y. *et al.* Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* **259**, 218–230 (2008).
107. Jackson, M. I. & Combs, G. F. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **11**, 718–726 (2008).
108. Smith, M. L., Lancia, J. K., Mercer, T. I. & Ip, C. Selenium compounds regulate p53 by common and distinctive mechanisms. *Anticancer Res.* **24**, 1401–1408 (2004).
109. Fowler, B. A., Whittaker, M. H., Lipsky, M., Wang, G. & Chen, X.-Q. Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **17**, 567–568 (2004).
110. Schrauzer, G. N. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **57**, 1864–1873 (2000).
111. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Suppl.* **7**, 1–440 (1987).
112. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. *SEER*
https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/index.html. 5 de octubre 2020.
113. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
114. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).

115. Bosetti, C. *et al.* Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol. Carcinog.* **51**, 3–13 (2012).
116. Brotherton, L., Welton, M. & Robb, S. W. Racial disparities of pancreatic cancer in Georgia: a county-wide comparison of incidence and mortality across the state, 2000–2011. *Cancer Med.* **5**, 100–110 (2016).
117. Shavers, V. L., Harlan, L. C., Jackson, M. & Robinson, J. Racial/ethnic patterns of care for pancreatic cancer. *J. Palliat. Med.* **12**, 623–630 (2009).
118. Ma, J., Siegel, R. & Jemal, A. Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970–2009. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1694–1700 (2013).
119. Pernick, N. L. *et al.* Clinicopathologic analysis of pancreatic adenocarcinoma in African Americans and Caucasians. *Pancreas* **26**, 28–32 (2003).
120. Arnold, L. D. *et al.* Are racial disparities in pancreatic cancer explained by smoking and overweight/obesity? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **18**, 2397–2405 (2009).
121. Dong, M. *et al.* Ki-ras point mutation and p53 expression in human pancreatic cancer: a comparative study among Chinese, Japanese, and Western patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **9**, 279–284 (2000).
122. Song, M. M. *et al.* Comparison of K-ras point mutations at codon 12 and p21 expression in pancreatic cancer between Japanese and Chinese patients. *J. Surg. Oncol.* **75**, 176–185 (2000).

123. Rosato, V. *et al.* Population attributable risk for pancreatic cancer in Northern Italy. *Pancreas* **44**, 216–220 (2015).
124. Bosetti, C. *et al.* Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **25**, 2065–2072 (2014).
125. Klein, A. P. *et al.* Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res.* **64**, 2634–2638 (2004).
126. Greer, J. B., Whitcomb, D. C. & Brand, R. E. Genetic predisposition to pancreatic cancer: a brief review. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 2564–2569 (2007).
127. Solomon, S., Das, S., Brand, R. & Whitcomb, D. C. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J. Sudbury Mass* **18**, 485–491 (2012).
128. Klein, A. P. Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol. Carcinog.* **51**, 14–24 (2012).
129. Risch, H. A., Yu, H., Lu, L. & Kidd, M. S. ABO blood group, *Helicobacter pylori* seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 502–505 (2010).
130. Ben, Q., Wang, K., Yuan, Y. & Li, Z. Pancreatic cancer incidence and outcome in relation to ABO blood groups among Han Chinese patients: a case-control study. *Int. J. Cancer* **128**, 1179–1186 (2011).

131. Chen, X.-Z. *et al.* Association of helicobacter pylori infection and chronic atrophic gastritis with risk of colonic, pancreatic and gastric cancer: A ten-year follow-up of the ESTHER cohort study. *Oncotarget* **7**, 17182–17193 (2016).
132. Anstee, D. J. The relationship between blood groups and disease. *Blood* **115**, 4635–4643 (2010).
133. Liumbruno, G. M. & Franchini, M. Beyond immunohaematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **11**, 491–499 (2013).
134. Franchini, M., Favalaro, E. J., Targher, G. & Lippi, G. ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **49**, 137–149 (2012).
135. Franchini, M., Liumbruno, G. M. & Lippi, G. The prognostic value of ABO blood group in cancer patients. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **14**, 434–440 (2016).
136. Zhang, B.-L., He, N., Huang, Y.-B., Song, F.-J. & Chen, K.-X. ABO blood groups and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **15**, 4643–4650 (2014).
137. Wolpin, B. M. *et al.* ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 424–431 (2009).
138. Amundadottir, L. *et al.* Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat. Genet.* **41**, 986–990 (2009).

139. Rizzato, C. *et al.* Pancreatic cancer susceptibility loci and their role in survival. *PLoS One* **6**, e27921 (2011).
140. Dandona, M., Gao, F., Linehan, D. C. & Wang-Gillam, A. Re: ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 135–137; author reply 137 (2010).
141. Etemad, B. & Whitcomb, D. C. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* **120**, 682–707 (2001).
142. Ekblom, A. *et al.* Pancreatitis and pancreatic cancer: a population-based study. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 625–627 (1994).
143. Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P. & Pezzilli, R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **24**, 349–358 (2010).
144. Duell, E. J. *et al.* Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23**, 2964–2970 (2012).
145. Yadav, D. & Whitcomb, D. C. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 131–145 (2010).
146. Hirota, M. *et al.* The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP Al* **12**, 79–84 (2012).
147. Lowenfels, A. B. *et al.* Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1433–1437 (1993).

148. Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P. & Whitcomb, D. C. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med. Clin. North Am.* **84**, 565–573 (2000).
149. *AJCC Cancer Staging Manual*. (Springer International Publishing, 2017).
150. Edge, S. B. & Compton, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 1471–1474 (2010).
151. Cáncer de páncreas—Versión para pacientes - Instituto Nacional del Cáncer.
<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pancreas>.
152. Klauss, M. *et al.* Value of three-dimensional reconstructions in pancreatic carcinoma using multidetector CT: initial results. *World J. Gastroenterol.* **15**, 5827–5832 (2009).
153. Wong, J. C. & Lu, D. S. K. Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **6**, 1301–1308 (2008).
154. Harewood, G. C. & Wiersema, M. J. Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 1386–1391 (2002).
155. Tummala, P., Junaidi, O. & Agarwal, B. Imaging of pancreatic cancer: An overview. *J. Gastrointest. Oncol.* **2**, 168–174 (2011).
156. Tempero, M. A. *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma, version 2.2012: featured updates to the NCCN Guidelines. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **10**, 703–713 (2012).

157. Safi, F. *et al.* High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas* **2**, 398–403 (1987).
158. Chan, C. & Santes, O. [Pancreatic tumors: an update]. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **77** **Suppl 1**, 108–111 (2012).
159. Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Büschenfelde, C., Friess, H. & Kleeff, J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med.* **7**, e1000267 (2010).
160. Campbell, F. *et al.* Classification of R1 resections for pancreatic cancer: the prognostic relevance of tumour involvement within 1 mm of a resection margin. *Histopathology* **55**, 277–283 (2009).
161. Esposito, I. *et al.* Most pancreatic cancer resections are R1 resections. *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 1651–1660 (2008).
162. Neoptolemos, J. P. *et al.* A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1200–1210 (2004).
163. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* **304**, 1073–1081 (2010).
164. Maeda, A. *et al.* Randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus S-1 in patients with resected pancreatic cancer: Japan Adjuvant

- Study Group of Pancreatic Cancer (JASPAC-01). *Jpn. J. Clin. Oncol.* **38**, 227–229 (2008).
165. Kleeff, J. *et al.* Pancreatic cancer microenvironment. *Int. J. Cancer* **121**, 699–705 (2007).
166. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **358**, 1576–1585 (2001).
167. Richter, A. *et al.* Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World J. Surg.* **27**, 324–329 (2003).
168. Kuhlmann, K. F. D. *et al.* Surgical treatment of pancreatic adenocarcinoma; actual survival and prognostic factors in 343 patients. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **40**, 549–558 (2004).
169. Tuveson, D. A. & Neoptolemos, J. P. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches. *Cell* **148**, 21–23 (2012).
170. Lim, K.-H. *et al.* Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *The Oncologist* **17**, 192–200 (2012).
171. Evans, D. B. *et al.* Preoperative gemcitabine-based chemoradiation for patients with resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 3496–3502 (2008).

172. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1817–1825 (2011).
173. Von Hoff, D. D. *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1691–1703 (2013).
174. Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van Cutsem, E., Rougier, P., & ESMO Guidelines Working Group. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23 Suppl 7**, vii33-40 (2012).
175. Sultana, A. *et al.* Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 2607–2615 (2007).
176. Colucci, G. *et al.* Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologia dell'Italia Meridionale. *Cancer* **94**, 902–910 (2002).
177. Viret, F. *et al.* Gemcitabine in combination with cisplatin (GP) versus gemcitabine (G) alone in the treatment of locally advanced or metastatic pancreatic cancer: Final results of a multicenter randomized phase II study. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4118–4118 (2004).
178. Louvet, C. *et al.* Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 3509–3516 (2005).

179. Heinemann, V., Boeck, S., Hinke, A., Labianca, R. & Louvet, C. Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* **8**, 82 (2008).
180. Poplin, E. *et al.* Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 3778–3785 (2009).
181. Colucci, G. *et al.* Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 1645–1651 (2010).
182. Berlin, J. D. *et al.* Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**, 3270–3275 (2002).
183. Scheithauer, W. *et al.* Biweekly high-dose gemcitabine alone or in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a randomized phase II trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **14**, 97–104 (2003).
184. Riess, H. *et al.* A randomised, prospective, multicenter, phase III trial of gemcitabine, 5-fluorouracil (5-FU), folinic acid vs. gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, LBA4009–LBA4009 (2005).

185. Di Costanzo, F. *et al.* Gemcitabine with or without continuous infusion 5-FU in advanced pancreatic cancer: a randomised phase II trial of the Italian oncology group for clinical research (GOIRC). *Br. J. Cancer* **93**, 185–189 (2005).
186. Herrmann, R. *et al.* Gemcitabine (G) plus capecitabine (C) versus G alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer. A randomized phase III study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and the Central European Cooperative Oncology Group (CECOG). *J. Clin. Oncol.* **23**, LBA4010–LBA4010 (2005).
187. Cunningham, D. *et al.* Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5513–5518 (2009).
188. Chu, G. C., Kimmelman, A. C., Hezel, A. F. & DePinho, R. A. Stromal biology of pancreatic cancer. *J. Cell. Biochem.* **101**, 887–907 (2007).
189. Ferrone, C. R. *et al.* Validation of a postresection pancreatic adenocarcinoma nomogram for disease-specific survival. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 7529–7535 (2005).
190. Geer, R. J. & Brennan, M. F. Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am. J. Surg.* **165**, 68–72; discussion 72-73 (1993).
191. Lim, J. E., Chien, M. W. & Earle, C. C. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann. Surg.* **237**, 74–85 (2003).

192. Benassai, G. *et al.* Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *J. Surg. Oncol.* **73**, 212–218 (2000).
193. Gebhardt, C., Meyer, W., Reichel, M. & Wünsch, P. H. Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch. Surg.* **385**, 14–20 (2000).
194. Hui, L. & Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **368**, 7–13 (2015).
195. Apte, M. V. *et al.* Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* **43**, 128–133 (1998).
196. Shek, F. W.-T. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am. J. Pathol.* **160**, 1787–1798 (2002).
197. Mahadevan, D. & Von Hoff, D. D. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1186–1197 (2007).
198. Apte, M., Pirola, R. C. & Wilson, J. S. Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 416–423 (2015).
199. Vonlaufen, A. *et al.* Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: a promising in vitro tool for studies of human pancreatic stellate cell biology. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **10**, 434–443 (2010).
200. Apte, M. V. *et al.* Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* **44**, 534–541 (1999).

201. Mews, P. *et al.* Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* **50**, 535–541 (2002).
202. McCarroll, J. A. *et al.* Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer. *Front. Physiol.* **5**, 141 (2014).
203. Scarlett, C. J. *et al.* Recruitment and activation of pancreatic stellate cells from the bone marrow in pancreatic cancer: a model of tumor-host interaction. *PloS One* **6**, e26088 (2011).
204. Lin, W.-R. *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to cerulein-induced pancreatic fibrosis in the mouse. *Int. J. Exp. Pathol.* **93**, 130–138 (2012).
205. Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W. & Kalluri, R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1640–1646 (2006).
206. Augsten, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front. Oncol.* **4**, 62 (2014).
207. Öhlund, D., Elyada, E. & Tuveson, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med.* **211**, 1503–1523 (2014).
208. Chang, H. Y. *et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12877–12882 (2002).
209. Boomershine, C. S. *et al.* Autoimmune pancreatitis results from loss of TGFbeta signalling in S100A4-positive dendritic cells. *Gut* **58**, 1267–1274 (2009).

210. Ikenaga, N. *et al.* S100A4 mRNA is a diagnostic and prognostic marker in pancreatic carcinoma. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* **13**, 1852–1858 (2009).
211. Tsukamoto, N. *et al.* The expression of S100A4 in human pancreatic cancer is associated with invasion. *Pancreas* **42**, 1027–1033 (2013).
212. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 526–537 (2007).
213. Klöppel, G., Detlefsen, S. & Feyerabend, B. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **445**, 1–8 (2004).
214. Erkan, M. *et al.* StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* **61**, 172–178 (2012).
215. Cao, H. *et al.* Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. *Cancer Lett.* **274**, 61–71 (2009).
216. Lin, J.-T. *et al.* Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6. *Exp. Cell Res.* **319**, 2216–2229 (2013).
217. McLean, K. *et al.* Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J. Clin. Invest.* **121**, 3206–3219 (2011).
218. Büchler, P. *et al.* Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J. Surg. Res.* **120**, 295–303 (2004).

219. Koong, A. C. *et al.* Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **48**, 919–922 (2000).
220. Ide, T. *et al.* The hypoxic environment in tumor-stromal cells accelerates pancreatic cancer progression via the activation of paracrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 2600–2607 (2007).
221. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
222. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52–67 (2010).
223. Yang, X.-P. *et al.* Pancreatic stellate cells increase pancreatic cancer cells invasion through the hepatocyte growth factor /c-Met/survivin regulated by P53/P21. *Exp. Cell Res.* **357**, 79–87 (2017).
224. Fujita, H. *et al.* alpha-Smooth Muscle Actin Expressing Stroma Promotes an Aggressive Tumor Biology in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* **39**, 1254–1262 (2010).
225. Leppänen, J. *et al.* Tenascin C, Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* **48**, 43–48 (2019).
226. Dhayat, S. A. *et al.* Clinical Impact of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Regulating MicroRNAs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **10**, (2018).
227. Zhao, X.-H. *et al.* Molecular detection of epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells from pancreatic cancer patients: Potential role in clinical practice. *World J. Gastroenterol.* **25**, 138–150 (2019).

228. Rafiee, P. *et al.* Characterization of the cytokeratins of human colonic, pancreatic, and gastric adenocarcinoma cell lines. *Pancreas* **7**, 123–131 (1992).
229. Javle, M. M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 3527–3533 (2007).
230. Wang, M. *et al.* Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Treated Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* **48**, 1367–1372 (2019).
231. Bartlett, J. E. & Ik, J. W. K. Organizational Research: Determining Appropriate Sample Size. in *Survey Research Information Technology, Learning, and Performance Journal* (2001).
232. Hassan, S., Ferrario, C., Mamo, A. & Basik, M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 19–25 (2008).
233. Santosh, N., McNamara, K. K., Beck, F. M. & Kalmar, J. R. Expression of cornulin in oral premalignant lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **127**, 526–534 (2019).
234. Marinaccio, C. & Ribatti, D. A simple method of image analysis to estimate CAM vascularization by APERIO ImageScope software. *Int. J. Dev. Biol.* **59**, 217–219 (2015).
235. Whitaker-Menezes, D. *et al.* Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 4047–4064 (2011).

236. Maehira, H. *et al.* Vimentin Expression in Tumor Microenvironment Predicts Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Heterogeneity in Fibroblast Population. *Ann. Surg. Oncol.* **26**, 4791–4804 (2019).
237. Amakye, D., Jagani, Z. & Dorsch, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med.* **19**, 1410–1422 (2013).
238. Wang, Z. *et al.* Disrupting the balance between tumor epithelia and stroma is a possible therapeutic approach for pancreatic cancer. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **20**, 2002–2006 (2014).
239. Rhim, A. D. *et al.* Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25**, 735–747 (2014).
240. Bailey, J. M. *et al.* Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 5995–6004 (2008).
241. Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* **67**, 1030–1037 (2007).
242. Okubo, K. *et al.* Clinical impact of circulating tumor cells and therapy response in pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* **43**, 1050–1055 (2017).
243. Pimienta, M., Edderkaoui, M., Wang, R. & Pandol, S. The Potential for Circulating Tumor Cells in Pancreatic Cancer Management. *Front. Physiol.* **8**, 381 (2017).
244. Wong, H. H. & Chu, P. Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**, 262–284 (2012).

245. Kohler, I. *et al.* Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **30 Suppl 1**, 78–84 (2015).
246. Amantini, C. *et al.* Expression Profiling of Circulating Tumor Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients: Biomarkers Predicting Overall Survival. *Front. Oncol.* **9**, 874 (2019).
247. Chouat, E. *et al.* Tumor budding is a prognostic factor linked to epithelial mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. Study report and literature review. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **18**, 79–84 (2018).
248. Stark, A. P. *et al.* Long-term survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgery* **159**, 1520–1527 (2016).
249. Pacheco-Velázquez, S. C. *et al.* Heart myxoma develops oncogenic and metastatic phenotype. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **145**, 1283–1295 (2019).
250. Chan, K. S., Ho, B. C. S. & Shelat, V. G. A pilot study of estrogen receptor (ER) expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, (2021).