



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ODONTOLÓGICAS Y  
DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**EXPRESIÓN DE MSX2 Y PDX-1 EN SANGRE PERIFÉRICA Y BIOPSIAS LÍQUIDAS EN**

**PACIENTES CON CÁNCER DE PÁNCREAS**

**TITULACIÓN POR TESIS**

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

**YAHVÉ IVÁN LÓPEZ MÉNDEZ**

**TUTOR**

**TUTOR: DR. FÉLIX IGNACIO TÉLLEZ ÁVILA**

MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE ENDOSCOPIA GASTROINTESTINAL  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, 15 DE SEPTIEMBRE 2019



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.

ALUMNO  
DR. YAHVÉ IVÁN LÓPEZ MÉNDEZ

TUTOR  
DR. FELIX IGNACIO TÉLLEZ ÁVILA

RESPONSALBE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA  
DR. CARLOS AGUILAR SALINAS

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	27
ANEXOS	31
REFERENCIAS	41

## **Introducción**

El cáncer de páncreas (CP) es la séptima causa de muerte a nivel mundial, progresa rápidamente creando enfermedad metastásica en corto tiempo presentando una supervivencia a 5 años de 5%.<sup>1</sup>

El adenocarcinoma ductal pancreático infiltrante (ADP) es el tipo de tumor con mayor prevalencia, representando el 90% de todos los casos de CP. Según el Informe Mundial del Cáncer 2014, la mortalidad por CP es más alta en el continente europeo (31,6%) que en el resto del mundo.<sup>2</sup> Alrededor del 70% al 80% de los pacientes presentan lesiones irresecables en el momento del diagnóstico. La incidencia global de CP reportada en el 2012 GLOBOCAN es 4.2 por cada 100,000 individuos. La tasa estimada en México es más baja, con una incidencia de 3.4 por cada 10,000 habitantes, que se considera subestimada debido a la disponibilidad de datos limitada o incompleta.<sup>3</sup>

Se han identificado diversos factores de riesgo que están asociados al desarrollo de CP, el factor que tiene mayor asociación es el tabaquismo seguido de diabetes, sedentarismo, raza, obesidad, e incluso tipo de dieta. Por otro lado, existen factores de riesgo no modificables, que engloban a ciertos trastornos genéticos como: Peutz-Jeghers, Li-Fraumeni, Lynch, von Hippel-Lindau entre otros.<sup>4 5 6 7</sup>

El problema principal relacionado al CP es el contar con una herramienta diagnósticas que permita el diagnóstico temprano de esta entidad debido a que éste factor es el principal implicado en las posibilidades de supervivencia del paciente e incluso la oportunidad de ofrecer opciones curativas de tratamiento.

## Marco Teórico

Históricamente, el diagnóstico temprano de CP ha sido difícil debido a problemas técnicos relacionados con la fisiopatología de la enfermedad, por lo que el diagnóstico temprano es uno de los mayores retos actuales en esta neoplasia. Las diversas herramientas de imagen tienen capacidades limitadas para detección temprana y rangos amplios de sensibilidad y especificidad; el ultrasonido abdominal 67% y 40%, tomografía computarizada 69% y 77%, resonancia magnética 84% y 100%, respectivamente.<sup>8</sup> El ultrasonido endoscópico (USE) se usa habitualmente para el diagnóstico del cáncer de páncreas, específicamente la aspiración con aguja fina guiada por USE (USE-FNA) ha demostrado ser un gran avance a la luz de su capacidad para obtener muestras de tumores pancreáticos para el diagnóstico citológico. Aunque el USE-FNA se considera el procedimiento más confiable y seguro para el muestreo de tejidos, la probabilidad de lograr un diagnóstico definitivo está limitada por el hecho de que la citología convencional tiene una alta especificidad, pero poca sensibilidad entre el 70% y 80%. Un problema importante que contribuye a limitar la eficacia diagnóstica de USE-FNA es el error de muestreo. Se estima que la evaluación rápida en el sitio (ROSE) de la calidad de la muestra por parte de un citopatólogo aumenta la sensibilidad del procedimiento en un 10-15%. Desafortunadamente, la disponibilidad de ROSE sigue siendo limitada en las unidades de endoscopia. Por lo tanto, se requieren herramientas adicionales para mejorar la precisión diagnóstica de USE-FNA; a este respecto, la aplicación de la biología molecular para analizar muestras de USE-FNA se considera el enfoque más prometedor.<sup>9 10</sup>

Con respecto al diagnóstico de cáncer pancreático tanto la genómica y proteómica se han dado la tarea de encontrar alguna expresión de proteínas o genes que pudieran respaldar el diagnóstico de cáncer pancreático aun cuando el resultado de la biopsia haya resultado negativo o bien, combinar ambos métodos (histológicos-moleculares) para lograr un mejor diagnóstico.

Se han reportado alteraciones genéticas para el ADP que se caracterizan por mutaciones en varios genes, incluidos K-Ras, Cdkn2a, Tp53, Tgfr2, Epc1, Arid2 y Map2k4, entre otros. Los cistadenomas, las neoplasias quísticas mucinosas papilares intraductales y mucinosas también se caracterizan por mutaciones genéticas en b-catenina, Gnas, Rnf43 y Tp53. Además, las mutaciones heredadas como las que se producen en los genes BRCA2, p16 / CDKN2A y PRSS1 podrían tener un impacto en el riesgo de desarrollar CP.<sup>11</sup> Informes anteriores indican que las mutaciones del gen K-ras se observan con mayor frecuencia en muestras de tejido (45–100%) y suero (77%) de pacientes con CP <sup>14,15</sup> , seguido de mutaciones en los genes que codifican la quinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A) / P16, la proteína tumoral 53 (TP53) y el miembro de la familia SMAD 4 (SMAD4). En particular, las mutaciones de K-Ras se han detectado en etapas premalignas, lo que podría ser útil como marcador de detección temprana para CP.<sup>12</sup>

El conocimiento en rápida expansión de la patogénesis del cáncer de páncreas a nivel molecular está proporcionando nuevos objetivos para la caracterización de la enfermedad, el diagnóstico temprano, el descubrimiento y el desarrollo de fármacos. Varios cambios genéticos y epigenéticos pueden estar involucrados en la carcinogénesis pancreática, incluida la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores y la desregulación de las vías de transducción de señales. Los avances recientes en la comprensión de las vías de señalización del desarrollo en el cáncer de páncreas han dado lugar a nuevos conocimientos sobre los mecanismos de la carcinogénesis pancreática. Se han identificado varios genes expresados embrionariamente como implicados en el desarrollo del CP, incluidos SHH, la vía de señalización de Notch y factor de productor de insulina 1 (PDX1). Sin embargo, se sabe poco sobre la tumorigénesis de PDX1 en el desarrollo del CP.

Algunos estudios han reportado genes homeóticos como PDX1 y el factor de transcripción Msh-homeobox 2 (MSX2) que están relacionados con CP. En el primer caso, se ha demostrado que

PDX1 regula directamente la identidad celular acinar, resistiendo la formación de PDA derivada de PanIN. Por lo tanto, tras la transformación neoplásica, PDX1 se convierte en un factor oncogénico.<sup>13</sup> En el segundo caso, se demostró que MSX2 es un factor de transcripción relacionado con la transición epitelial a mesenquimal (EMT), con una elevada expresión observada en varios tumores de origen epitelial.<sup>14</sup> La expresión de MSX2 también se ha relacionado con la agresividad de PDA a través de la inducción de EMT a través de la señalización relacionada con la vía proteína morfogénica ósea (BMP4). Juntos, estos hallazgos destacan el uso potencial de MSX2 y PDX1 como biomarcadores potenciales para su uso en el diagnóstico de CP.

Los genes de la familia *homeobox* regulan el desarrollo morfológico de una variedad de órganos y sus niveles de expresión varían de acuerdo con las etapas de desarrollo del órgano. Los genes que contienen *homeobox* comparten una secuencia bien conservada de 183 pares de bases que codifica un motivo hélice-lazo-hélice de 64 aminoácidos. La mayoría de los genes *homeobox* están organizados en grupos, y este es el caso de los genes HoxA, B, C y D. Otros genes *homeobox*, dispersos alrededor del genoma y clasificados como homeogenes divergentes también incluyen a la familia MSX.<sup>15</sup> El gen MSX2 es un miembro de la familia de divergentes *homeobox* que contienen genes homólogos de la *Drosophila* (Muscle Segment Homeobox) (MSH), el cual es observado en una variedad de sitios (cresta neural, tejido mamario).<sup>16</sup> Otros estudios han implicado a este gen en el proceso de tumorigénesis y desarrollo tumoral. Se ha sugerido que MSX2 es un objetivo de la vía de señalización de k-ras esto derivado de que MSX2 se regula positivamente en células NIH3T3 transfectadas con v-Ki-ras y DNAc antisentido de MSX2 y ADNc de MSX2 truncado interfiriendo con las actividades de transformación tanto de vK-ras y el oncogén v-raf. Además, la expresión mejorada de MSX2 se ha mostrado en una



variedad de líneas celulares de carcinoma de origen epitelial en comparación con sus tejidos fisiológicos.<sup>17</sup>

#### *Expresión de MSX2*

El gen MSX2 un miembro de la familia de los genes *homeobox* (desarrollo embrionario) es observado en una variedad de sitios, cresta neural, tejido craneal premigratorio, tejido mamario, diente, retina, lente y cresta ectodérmica apical. En el desarrollo de estos órganos, los patrones de expresión de este gen sugieren su participación activa en las interacciones epiteliales-mesenquimales. Se han demostrado niveles mejorados de transcripciones para MSX2 en una variedad de líneas celulares de carcinoma de origen epitelial en comparación con sus tejidos normales correspondientes.<sup>18</sup> Por otro lado se ha mostrado la participación activa de este gen en la tumorigénesis y/o desarrollo tumoral. Se ha sugerido que MSX2 es un objetivo de disminución de activación de la vía de señalización de *ras* porque MSX2 está regulado por aumento en células NIH3T3 transfectadas con v-Ki-ras y ADNc de MSX2 antisentido y ADNc de MSX2 truncado que interfería con las actividades de transformación tanto de vK-ras como de v-raf oncogén, además, la expresión mejorada de MSX2 se ha demostrado en una variedad de líneas celulares de carcinoma de origen epitelial en comparación con sus tejidos normales correspondientes.<sup>19</sup> En el cáncer gástrico, MSX2 se identificó como un objetivo específico para el cáncer y la baja regulación de este gen resultó en la inhibición del crecimiento de células cancerosas in vitro.<sup>20</sup> Del mismo modo, se ha demostrado que MSX2 es un regulador a la baja de la señal WNT y se ha correlacionado con la invasividad del adenocarcinoma endometrioide.

El ADP es uno de los tumores gastrointestinales más agresivos. Una vez que el ADP es clínicamente evidente, progresa rápidamente para desarrollar lesiones metastásicas, frecuentemente al momento del diagnóstico. Se ha reportado que MSX2 se expresó con

frecuencia en líneas celulares de carcinoma pancreático, pero no en células cultivadas benignas, incluyendo células pancreáticas estelares, que son en gran parte responsables de la fibrogénesis de pancreatitis crónica o tejidos pancreáticos humanos normales, sugiriendo que la detección de MSX2 podría ser un marcador útil para diferenciar CP de otras enfermedades pancreáticas benignas. Otros estudios han implicado a este gen en el proceso de tumorigénesis y desarrollo tumoral. Algunas neoplasias quísticas de páncreas son consideradas precursoras de lesiones neoplásicas.<sup>21</sup> Estudios recientes han mostrado la expresión de MSX2 en adenocarcinoma pancreático o en tejidos de neoplasias quísticas pancreáticas (neoplasia mucinosa papilar intraductal, NMPI) con perfil de riesgo elevado para desarrollo de neoplasia.

La correlación entre la regulación positiva de MSX2 y los factores clínico-patológicos ha sido tópico de investigación en diversos carcinomas. La expresión de este gen se asoció con un buen pronóstico en el carcinoma de mama y melanoma maligno.<sup>22</sup>

Un estudio realizado por Satoh K *et al* demostró que la expresión de MSX2 en tejido pancreático correlacionó con el grado de diferenciación histológica e invasión vascular de adenocarcinomas pancreáticos, no así en tejido pancreático normal.<sup>23 24</sup>

Las NMPI tienen un elevado riesgo de progresión a cáncer pancreático y existen estudios en los cuales se ha llevado a cabo la determinación de la expresión de MSX2 en tejido de NMPI. En el estudio de Satoh K *et al* se observó que la expresión de MSX2 en tejido de NMPI fue el único factor independiente que predice la presencia de neoplasia.<sup>25</sup> (Figura 1)

## Expresión de PDX1

Otro gen recientemente explorado es el PDX1, (también conocido como IDX-1 / STF-1 / IPF1).<sup>26</sup> Este gen pertenece a la familia de los *homeobox* es un factor de transcripción crucial en el desarrollo embriológico del páncreas, así como en el proceso de maduración de los islotes.<sup>27,28</sup> Contiene 283 aminoácidos con un peso molecular previsto de 31Kb. Como la mayoría de los otros factores de transcripción, PDX-1 posee una estructura modular con dominios funcionales separados, dentro de su región media posee un homeodominio parecido a una antena, flanqueado en ambos lados por regiones ricas en prolina. PDX-1 está involucrado principalmente en la síntesis celular endocrina pancreática y duodenal, este gen se establece en la regulación de la expresión de una serie de factores clave de células beta, así como la somatostatina; también desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la ontogenia de las células del páncreas y los islotes. Por lo tanto, la alteración homocigótica del gen en ratones y seres humanos da como resultado la agenesia pancreática.<sup>29</sup> Esto expuesto en un estudio por Guo L *et al* en el que la expresión de PDX1 fue específicamente suprimido de la organogénesis de los conductos sólo a partir de nacimiento, demostrando que PDX1 no es necesario para la formación de nuevas células beta de los conductos pancreáticos posnatal; sin embargo, es necesario que estas células beta recién formadas lleguen a ser completamente maduras.<sup>30</sup> Debido al papel clave de PDX1 en el desarrollo embrionario del páncreas y su asociación con procesos de regeneración, la expresión de PDX1 ha sido examinada en líneas celulares de cáncer de páncreas y diversas neoplasias, Wang *et al* examinó la expresión de PDX1 en procesos malignos de mama, colon, próstata, renales, hepáticos, pulmonares y ováricos, utilizando un panel de 85 muestras sanas de 20 órganos o tejidos como control. La intensidad de expresión de

PDX1 se incrementó en tejidos malignos, mientras que en las muestras de sujetos control sin cáncer no expresaron PDX1<sup>31</sup> (Figura 2)

#### *Expresión de PDX1 en carcinoma ductal de páncreas*

Estudios realizados en carcinomas pancreáticos han encontrado que PDX1 se expresa en aproximadamente el 40% de los carcinomas ductales con mínima expresión en el tejido exocrino de páncreas adyacente al tumor.<sup>32</sup> En un estudio realizado por Marzioni M *et al* se observó su expresión en 32/33 casos con cáncer pancreático, en este estudio se incluyeron neoplasias quísticas pancreáticas y la expresión fue positiva en 2 de 15 casos y en la pieza quirúrgica, estas lesiones resultaron positivas para neoplasia, reportando un valor predictivo positivo de hasta el 98.8%.<sup>33</sup> Las 13 neoplasias restantes no mostraron malignidad en la citología o pieza quirúrgica.

Las sensibilidades reportadas para estos genes son las siguientes:

- Sensibilidad reportada para el gen PDX 1 en una población de 48 pacientes S-94%, E-92%, VPP 97%, VPN 86.7%
- Gen MSX2 en una población de 95 pacientes S-73.7% y E-84%<sup>34</sup>

Hasta el momento podemos concluir que después de la introducción de las proteínas PDX1 y MSX2 en diversas líneas celulares de cáncer de páncreas humano están implicadas en proliferación e invasión celular y proceso de tumorigénesis, en la búsqueda de la literatura no hay estudios que reporten expresión génica a nivel de sangre periférica. PDX1 y MSX2 además de expresarse en tejido pancreático neoplásico pueden ser buscados en sangre periférica con la

intención de determinar expresión cualitativa y cuantitativamente lo cual sería de gran ventaja ya que podrían ser considerados como marcadores tumorales séricos capaz de diagnosticar CP a bajo costo y mínimamente invasivo. El objetivo de este trabajo es reportar si existe expresión de estos genes en sangre periférica.

## **Planteamiento del problema**

A pesar de las herramientas actuales, el diagnóstico de malignidad en lesiones sólidas y quísticas pancreáticas continúa siendo un reto, hasta el momento la herramienta diagnóstica de mayor utilidad es el ultrasonido endoscópico con biopsia por aspiración con aguja fina (USE-BAAF), con una sensibilidad de 80% y especificidad de 70%. Debido a la trascendencia del diagnóstico temprano y certero de los pacientes con cáncer de páncreas y a que la sensibilidad de la biopsia directa de tejido pancreático no alcanza el 100%, se requiere de algún otro método diagnóstico auxiliar que sustituya o mejore el desempeño diagnóstico de las pruebas actuales.

Así también es importante determinar si estos tumores expresan algún tipo específico de gen tanto en tejido neoplásico como en sangre periférica con la finalidad de poder tener una herramienta sérica adicional (marcador tumoral) para el diagnóstico de CP.

## **Justificación**

De acuerdo a diversos estudios, la expresión de ambos genes (MSX2, PDX1) puede representar una herramienta útil para el diagnóstico CP. Hasta el momento, no existen estudios que evalúen si la expresión de estos genes en sangre periférica puede mejorar la eficacia diagnóstica o estudios que comparen si existe superioridad de alguno de ellos en relación con la eficacia diagnóstica de CP. Por otro lado, estos estudios se han realizado en poblaciones diferentes a la hispana por lo que se desconoce el comportamiento de estos genes en dicha población.

## **Hipótesis**

La expresión de PDX1 y MSX2 en sangre periférica de pacientes con CP es superior a las herramientas diagnósticas actuales.



## **Objetivo**

### *Primario*

Evaluar la utilidad diagnóstica de la expresión de MSX2 y PDX1 en sangre periférica de pacientes con PC, en comparación con las herramientas diagnósticas actuales.

### *Secundario*

Evaluar la utilidad diagnóstica de la expresión de MSX2 y PDX1 en biopsias líquidas de pacientes con CP

## **Material y métodos**

Estudio prospectivo casos y controles realizado de marzo/2014 a febrero/2017. El protocolo fue evaluado y aceptado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El universo de estudio fueron pacientes que acudieron al Instituto con sospecha diagnóstica de CP con lesiones sólidas o quísticas.

Los criterios de inclusión fueron:

- Edad  $\geq 18$  años
- Pacientes sin contraindicación para el procedimiento (USE-BAAF)
- Plaquetas  $< 50,000$
- INR  $< 1.5$ .
- Pacientes que firmaron consentimiento informado

Los criterios de exclusión considerados fueron:

- Pacientes con contraindicación para alguno de los procedimientos
- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.

Los criterios de eliminación fueron:

- Aquellos pacientes que habiendo sido incluidos previamente en el estudio y que por algún motivo no cumplieron los criterios de inclusión
- Pacientes que abandonaron el estudio

Los pacientes con una lesión en el páncreas diagnosticada por al menos 1 estudio de imagen y confirmada histológicamente por una muestra de biopsia obtenida por ultrasonido endoscópico (USE) se consideraron casos. Se procesaron biopsias de tejido para medir la expresión de

ARNm de los genes PDX1 y MSX2. Se obtuvo tejido de páncreas de control (no CP) de donantes cadavéricos para trasplante de hígado. Se realizó seguimiento de los pacientes con CP 6 meses posteriores al diagnóstico.

#### *Biopsia por aspiración guiada por ultrasonido endoscópico*

Los estudios endosonográficos se realizaron bajo sedación con un instrumento lineal convexo FUJI EG-530UT conectado a una consola SU-8000 (Fuji film Corporation, Minato-Ku, Tokio, Japón) o con un dispositivo GF-UCT140 (Olympus Corp., Tokio, Japón) conectado a una consola SSD Aloka 5500 (Aloka Ltd., Tokio, Japón). La recolección de la biopsia se realizó con agujas 19G, 22G y / o 25G (Wilson-Cook Echotip Ultra, Winston-Salem, NC o Boston Scientific, MA). Después del examen de ultrasonido, una vez que se localizó la lesión, el transductor se colocó en una posición estable frente a la lesión y se insertó una aguja a través de la pared gastrointestinal con el estilete en posición solo durante el primer pase, luego se retiró el estilete y se succionó se aplicó. Se realizó un promedio de 2 a 3 pases por paciente con una técnica de "abanico". El tejido obtenido se usó para la evaluación histopatológica y para la extracción de ARN total.

#### *Grupo Control*

La muestra tisular que estableció el grupo de controles sanos, fue tejido obtenido de donadores cadavéricos para trasplante hepático.

### *Recolección de muestras de sangre periférica.*

Se recolectaron muestras de sangre de pacientes con lesiones pancreáticas usando tubos K2-EDTA (BD-Vacutainer). Las muestras que sirvieron como controles se obtuvieron de pacientes sanos que asistieron al servicio de endoscopia para procedimientos de rutina. El plasma se separó del paquete globular por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

### *Extracción de RNA total*

Las muestras biológicas obtenidas de los procedimientos descritos se colectaron en fresco y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. El RNA total se extrajo de acuerdo con las instrucciones para el reactivo de TriPure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitó en vórtex por espacio de 15 segundos, hasta obtener un aspecto lechoso. Seguido, las muestras se incubaron a 25°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugarán a 13,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa conteniendo el RNA se separó de la fase orgánica que contiene las proteínas y se recuperó en tubo Eppendorf. A dicha fase acuosa se le adicionaron 500 µl de isopropanol para agitar en vórtex e incubar los tubos en hielo seco (~80°C) por espacio de 30 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se descongelaron a 4°C y fueron centrifugadas por 10 min. a 13,000 rpm y 4°C. Posteriormente las muestras descongeladas, se agitaron en vórtex y después se centrifugaron durante 10 min. a 13,000 rpm y 4°C. La pastilla de RNA se lavó con 500µl de etanol 70% (JT Baker) y se procedió a centrifugar con las mismas especificaciones. Posteriormente la pastilla de RNA se lavó con etanol 100%. Una vez centrifugada, la pastilla se dejó secar al aire y a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla fue resuspendida en

agua ultrapura (MiliQ, Millipore) con dietil-pirocarbonato (DEPC 0.1%). El RNA total se almacenó a -70°C hasta su uso

El enriquecimiento total del ARN y la integridad se evaluaron mediante absorbancia de longitud de onda de 260 nm y electroforesis en gel de agarosa desnaturizante, respectivamente. Se usaron relaciones de 260/280 nm y 260/230 nm por encima de 1,8 y 1,5, respectivamente, como indicadores de la pureza del ARN. Una vez evaluado, el ARN se mantuvo a -70 ° C hasta su uso.

Como las muestras de páncreas eran demasiado pequeñas para obtener suficiente ARN, el ADNc se sintetizó utilizando 1 mg de ARN total, una mezcla de hexámeros aleatorios (60 mM) y *primers* anclados con oligo-dT 18 (50 mM), siguiendo las indicaciones del kit de síntesis (Roche Diagnostics GmbH). El ADNc monocatenario resultante, se amplificó por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) por duplicado, utilizando sondas de hidrólisis TaqMan (Roche Diagnostics GmbH) y el kit Light-Cycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los *primers* utilizados en este estudio fueron los siguientes: homeobox 1 pancreático y duodenal (PDX1, NM\_000209.3), avance 5'-AAGCTCACGCGTG-GAAAG-3', reverso 5'-GCCGTGAGATGTTACTTGTGAA-3'; Msh-homeobox 2 (MSX2, NM\_002449.4), reenviar 5'-CAT-GATGGATGCTTGTTC-3', revertir 5'-TGGCTGGTACT-GCCTTCG-3'; y beta-actina, (ACTB, ENST00000331789.2) como el gen expresado constitutivamente, reenviar 5'-CAACCGCGA-GAAGATGAC-3', revertir 5'-GTCCATCACGATGCCAGT-3'. La reacción se realizó usando un aparato LightCycler-480 II (Roche Diagnostics LTD, Rotkreuz, Suiza) en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 ° C durante 10 minutos; seguido de 45 ciclos de 95 ° C durante 10 segundos, 60 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 1 segundo.

### *Análisis de PCR*

El análisis se realizó de acuerdo al método de curvas estándar. Se prepararon diluciones en serie de 0.2 veces comenzando con 100 ng de ARN de entrada para obtener un rango dinámico del producto de amplificación por PCR. Se trazó el punto de cruce ( $C_p$ ) y la cantidad de ARN (nanogramos) basada en  $\log_{10}$  para cada dilución, y se obtuvo la regresión lineal y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Estos datos se correlacionaron con la cantidad de entrada de ARN (nanogramos) basada en  $\log_{10}$  para interpolar y calcular la concentración real de los puntos de entrada de la curva, se encontró que tenían un coeficiente de correlación alto (0.9980). Una vez que las curvas estuvieron listas, los datos de la muestra se interpolaron en la curva y se calculó la cantidad de ARN y se usó para normalizar el control y las muestras positivas para  $C_p$ . Luego se compararon los datos, utilizando pacientes de control como expresión basal (1 vez).

### *Análisis Estadístico y tamaño de muestra*

La distribución de datos para cada variable se analizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos cualitativos se expresan como frecuencias y porcentajes, mientras que los datos cuantitativos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE) para datos paramétricos y mediana (percentiles 25 a 75) para datos no paramétricos. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para evaluar las diferencias entre los grupos. El análisis de la correlación entre variables se realizó aplicando la prueba de correlación de Pearson. Se llevó a cabo un análisis de la característica operativa del receptor (ROC) para la expresión del gen sérico MSX2 y PDX1 en comparación con el grupo control. También se calcularon el área bajo la curva (AUC), así como estimadores de precisión diagnóstica: sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y odds ratio de diagnóstico (OR). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS 25.0 (SPSS, Chicago, IL) y los gráficos se

generaron con el software GraphPad Prism V7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Todas las pruebas fueron de 2 colas y se consideraron significativas en  $p \leq 0.05$

## Resultados

Los criterios de inclusión nos permitieron reclutar inicialmente 83 pacientes con sospecha diagnóstica de CP, de los cuales 49 fueron excluidos debido a una muestra de tejido insuficiente. Por lo tanto, 34 pacientes con lesiones pancreáticas se incluyeron en el análisis final. También incluimos 13 participantes sin CP (no CP). De los pacientes con lesiones pancreáticas, 23 (67%) eran mujeres y 11 (33%) eran hombres, y la edad promedio era de  $60 \pm 16$  años. Las características basales se resumen en la *Tabla 1*.

### *Hallazgos de ultrasonido endoscópico endoscópico*

El USE permitió el diagnóstico de CP en 30 de 34 (88,2%) pacientes, de los cuales 26 (90%) correspondieron a patología maligna. Los resultados histopatológicos confirmaron que 24 de los 26 (92,3%) eran adenocarcinomas malignos, un ampuloma y un tumor neuroendocrino maligno que representa el 7,7% restante de los casos (*Tabla 1*). De los 4 pacientes restantes que no fueron diagnosticados con CP por USE, se encontró que 2 tenían tejido acinar normal y los otros 2 tenían pancreatitis crónica. El tamaño promedio general de la lesión fue de  $36,8 \pm 12,5$  mm. En cuanto al tipo de tumor, observamos que 30 (88,2%) eran lesiones sólidas, mientras que los 4 restantes (11,8%) eran lesiones quísticas. Todos los pacientes con neoplasias malignas presentaron invasión vascular, principalmente a la vena porta, que era el vaso afectado en 17 casos. La aguja más utilizada para la biopsia fue 22G. El número promedio de pases fue de 2 (rango 1-3) por procedimiento, no se reportaron complicaciones.



### *Expresión de MSX2 y PDX1 en biopsias líquidas*

Para hacer una comparación confiable, primero se determinó la expresión génica MSX2 y PDX1 en el grupo sin CP, posteriormente se utilizaron estos valores como la expresión basal (1 vez). El grupo de pacientes con una lesión pancreática se dividió en 2 grupos de acuerdo a los hallazgos histopatológicos. El primer grupo incluía pacientes con patología maligna (MP, n = 26) y el segundo grupo eran pacientes con una patología benigna (PB, n = 8) (*Tabla 1*).

El análisis de los niveles de transcripción de PDX1 no mostró diferencias entre los grupos con CP y no CP 0.52 (0.16-0.96) y 0.79 (0.71-1.49), respectivamente,  $p= 0.23$  (*Figura 3*); por otro lado, la expresión de MSX2 aumentó en pacientes con una lesión pancreática en comparación con el grupo sin CP 1.72 (0.87-3.70) y 1.07 (0.29-1.63), respectivamente, aunque este resultado no alcanzó significancia estadística ( $p=0.17$ ). (*Figura 4*)

Cuando esta comparación se realizó con los grupos con patología benigna (PB) y patología maligna (PM), observamos una diferencia significativa en la expresión de transcripción MSX2 0.66 (0.45–1.54) y 1.98 (1.44–4.61), respectivamente,  $p=0.012$ . (*Figura 5*) La misma comparación para PDX1 reveló que esta transcripción también aumentó en el grupo PM en comparación con el grupo PB 0.62 (0.20–1.20) y 0.36 (0.15–0.65), respectivamente,  $p=0.23$ . (*Figura 6*) Para determinar las diferencias de expresión de ARN mensajero cuando se eliminaron los datos del grupo de PB, comparamos los datos de no CP y PM. En este análisis, se observó que la transcripción de MSX2 estaba regulada al alza en el grupo PM, mientras que la expresión del gen PDX1 no difería entre los 2 grupos de pacientes. (*Figuras 7 y 8*)

### *Expresión de PDX1 y MSX2 en sangre circulante*

El análisis mostró que ambas transcripciones estaban significativamente elevadas en el grupo de CP en comparación con el grupo de no CP PDX1, 2.59 (1.28– 10.12) vs 1.02 (0.81–1.17),  $p=0.036$  [MSX2, 2.05 (1.66–4.60) vs 0.83 (0.49–1.60),  $p=0.006$ ; (*Figura 9 y 10*). La comparación entre los grupos PM y PB reveló que la expresión de PDX1 se incrementó en el grupo PM [2.74 (1.35–11.08) vs. 1.53 (-2.06 a 5.64)], pero no de manera significativa ( $p=0.23$ ). (*Figura 11*) La expresión de MSX2 fue similar en ambos grupos [2.02 (1.58–3.57) vs 2.25 (0.44–5.62),  $p=0.92$ . (*Figura 12*). En contraste con los hallazgos de la biopsia de tejido, tanto MSX2 [2.02 (1.58–3.57) vs 0.83 (0.49–1.60),  $p=0.012$ ] y PDX1 [2.74 (1.35–11.08) vs 1.02 (0.81–1.17),  $p=0.021$ ] las transcripciones fueron significativamente más altas en las muestras de sangre del PM que en el grupo sin CP. (*Figuras 13 y 14*)

### *Análisis de correlación entre parámetros de laboratorio y datos de expresión génica.*

Se realizó un análisis de correlación entre los resultados de laboratorio y la expresión de ARNm de PDX1 o MSX2 en muestras de tejido y sangre. Los datos se presentan en la Tabla 2, respectivamente. No se observaron asociaciones significativas entre los parámetros probados.

### *Utilidad diagnóstica de la expresión del gen PDX1 o MSX2 para el cáncer de páncreas*

Se generaron ROC para determinar si los datos de expresión génica podrían usarse para diagnosticar CP en nuestro grupo de pacientes. El AUC para la expresión génica en muestras de

sangre fue de 0.800 [(IC 95%) 0.660-0.940),  $p=0.034$ ] para PDX1 (Fig. 3A) y 0.827 (IC 95% 0.686-0.967,  $p=0.021$ ) para MSX2. (Figuras 15 y 16).

Los valores de sensibilidad y especificidad para usar el nivel de transcripción PDX1 en sangre para discriminar entre los grupos sin CP y CP fueron ambos del 80%, con un pequeño valor de corte de un cambio de 1,05 veces. El VVP y el VPN para la expresión del gen PDX1 en sangre fueron del 96% y del 60%, respectivamente, con una precisión del 80%, mientras que la sensibilidad y especificidad de la expresión del gen MSX2 en la sangre fueron del 86% y 80%, respectivamente, con un límite valor de un cambio de 1.36 veces. El VVP y VPN para la expresión del gen MSX2 fueron 96% y 50%, respectivamente, con una precisión del 86%. La razón de momios (OR) para CP en pacientes cuyos niveles de expresión génica MSX2 fueron > 1,36 veces de cambio fue 26 (IC95%: 2,28 a 2,95,  $p= 0.006$ ). Del mismo modo, el OR para CP en pacientes con expresión del gen PDX1 > cambio de 1.05 veces fue 16 (IC95% 1.5-1.70,  $p=0.017$ ).

## Discusión

Según nuestros datos, los niveles de transcripción de MSX2 y PDX1 en muestras de sangre circulante fueron más altos en pacientes con lesiones pancreáticas malignas que en los controles (no CP).

El uso de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades biliopancreáticas, incluido el CP, se ha descrito anteriormente. Bartsch *et al*<sup>35</sup> mostraron que los niveles circulantes de las transcripciones LCN2 y TIMP1 podrían ser útiles para el diagnóstico precoz de CP. Aquí observamos que la abundancia de transcripciones de MSX2 y PDX1 son buenos biomarcadores séricos para discriminar entre pacientes sin CP y con CP. Nuestros resultados indican que ambos genes están significativamente regulados en las muestras de sangre periférica de pacientes con CP. También encontramos que la abundancia de transcripción de PDX1 y MSX2 se correlacionó positivamente entre la sangre periférica y la expresión génica de tejidos. Hasta donde sabemos, ningún informe previo ha sugerido el uso de PDX1 como biomarcador en pacientes con CP no diagnosticados. Además, como la expresión de la transcripción PDX1 no se ha estimado en pacientes sanos, nuestros datos ampliaron el análisis mediante el uso de muestras de sangre de participantes sanos para obtener una idea de la correlación entre la expresión del tejido y la observada en la sangre periférica.

Marzoni *et al*<sup>29</sup> informaron un aumento significativo en la expresión de transcripción PDX1 en 54 biopsias de CP. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con este estudio en términos de expresión de PDX1 en los tejidos, ya que observamos una expresión disminuida de esta transcripción en nuestras biopsias. Las diferencias entre los estudios podrían surgir debido al método utilizado para normalizar y analizar los datos de PCR sin procesar. Mientras que Marzoni *et al*<sup>29</sup> usaron la expresión de la línea celular pancreática MIA.PaCa-2 como expresión

basal, nosotros usamos muestras de tejido y sangre circulante de sujetos no CP como controles. Los datos de un estudio realizado por Igarashi *et al*<sup>36</sup> utilizando muestras de colangiocarcinoma informaron una expresión PDX1 similar a la de las muestras de CP, incluidos los valores informados en nuestro estudio.

Aunque no observamos niveles elevados de transcripción de PDX1 en biopsias de CP en comparación con muestras no CP, estos datos son consistentes con el doble papel de PDX1, probablemente experimentando una transición de un gen supresor de tumores a un gen oncogénico, promoviendo la carcinogénesis mediante la vía EMT. Además, nuestros hallazgos están en acuerdo con la noción de que la expresión de PDX1 está regulada negativamente para que las células epiteliales se sometan a EMT y adquieran propiedades metastásicas. Por el contrario, Koizumi *et al*<sup>37</sup> informaron que la supervivencia del paciente con CP fue mayor cuando la expresión de PDX1 estaba directamente regulada a la baja en el tejido pancreático, mientras que Park *et al*. No encontraron diferencias en la tasa de supervivencia entre la proteína PDX1 baja y alta expresión *in situ* en una serie de muestras incluidas en parafina derivadas de pacientes con CP.

Por el contrario, observamos mayores niveles de transcripción de PDX1 en muestras malignas en comparación con las muestras de tejido y sangre no malignas, lo que sugiere fuertemente que la expresión de PDX1 podría ser un indicador más específico para diferenciar entre estas 2 condiciones.

Nuestros hallazgos también mostraron que MSX2 estaba regulado al alza en biopsias de PM en comparación con sus respectivos controles. Lo contrario era cierto cuando esta transcripción se

evaluó en la sangre periférica, donde CP fue significativamente diferente en comparación con muestras no CP, mientras que PB y PM no fueron diferentes. Nuestros resultados son similares a los reportados por Satoh et al, quienes reportaron una precisión diagnóstica de 79.3% para la expresión de MSX2 en pacientes con sospecha de PDAC. Satoh et al sugirieron que la expresión de MSX2 está relacionada con el proceso de diferenciación para las células de carcinoma en lugar de la carcinogénesis, porque la sobreexpresión de MSX2 inducida experimentalmente produce un fenotipo de CP agresivo. El aumento de la expresión de MSX2 en nuestras biopsias también podría estar relacionado con el fenotipo metastásico y el proceso EMT observado en estudios anteriores.

A pesar de las diferencias entre los estudios, todos concluyen que la expresión de MSX2 aumenta en CP a nivel de tejido, y MSX2 podría ser un biomarcador potencial útil en el diagnóstico de CP cuando se asocia con datos histológicos o clínicos. Sin embargo, una diferencia importante a considerar es que, si bien el cepillado de estenosis pancreática o un procedimiento quirúrgico fueron los métodos elegidos para la recuperación de muestras en estos estudios, todas las muestras utilizadas en nuestro estudio fueron obtenidas por USE, siendo este el método de muestreo de tejido más utilizado para el diagnóstico histológico en CP. La masa total de tejido obtenida por USE es mayor que el cepillado, que es un factor importante a considerar en términos de cuantificación de la expresión génica.

Juntos, estos datos sugieren que PDX1 y MSX2 se expresan de manera diferencial y consistente en muestras de sangre periférica de CP, lo que significa que estos productos genéticos podrían usarse como biomarcadores para CP. En apoyo de esta noción, nuestro análisis ROC de la expresión PDX1 y MSX2 demostró la capacidad de distinguir entre los grupos sanos y CP.

Nuestros datos indican que la sensibilidad y la especificidad para PDX1 fueron ambas del 80%, y el análisis de la curva ROC indica que la sensibilidad y la especificidad para MSX2 fueron del 86% y 80%, respectivamente. El VPP y el VPN se estimaron para ambas transcripciones. Encontramos valores iguales para VPP (96%), pero los VPN para PDX1 y MSX2 fueron 60% y 50%, respectivamente. Estos resultados indican que la expresión de PDX1 parece ser más confiable para discriminar entre CP y pacientes sanos. Además, también se ha encontrado que MSX2 está elevado en ADP. Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero en informar los niveles de expresión de MSX2 y PDX1 en tejido y sangre periférica, proporcionando una herramienta adicional para un enfoque más completo para el diagnóstico de pacientes con sospecha de CP.

En conclusión, la expresión del gen pancreático de MSX2 en muestras de tejido obtenidas por USE, así como los niveles de expresión en sangre de MSX2 y PDX1, son más altos en pacientes con CP.

## ANEXOS

Tabla 1. Características basales de la población

Característica	N (%) / $\mu \pm DE$ / M [25-75]
<b>Características sociodemográficas</b>	
Hombres	11 (33)
Mujeres	60 (67.6)
Edad	60 [27-93]
Tabaquismo	7 (20.6)
Alcoholismo	4 (11.8)
Diabetes Mellitus	4 (11.8)
Mortalidad	23 (53.5)
<b>Características Clínicas</b>	
Anemia	19 (55.9)
Pérdida de peso >5%	21 (61.8)
Ictericia	18 (52.9)
<b>Características bioquímicas</b>	
Hemoglobina (g/dL)	12.4 $\pm$ 1.8
Hematocrito (%)	37 $\pm$ 5.1
Leucocitos ( $10^6$ /mL)	8.4 $\pm$ 3.5
Plaquetas	264.6 $\pm$ 99.4
Bilirrubina Total (mg/dL)	6.8 $\pm$ 15.1
Fosfatasa alcalina	316 $\pm$ 287.1
<b>Características tumorales</b>	
Sólido	30 (69.8)
Quístico	4 (9.3)
Maligno	16 (60.5)
No maligno (benigno)	8 (18.5)
Tamaño (mm)	36.8 $\pm$ 12.5
<b>Características histopatológicas</b>	
Adenocarcinoma	23 (92.3)
Tejido acinar sin alteraciones	2 (5.8)
Fibrina y polimorfonuclear	1 (2.9)
Ampuloma	1 (2.9)
Carcinoma ductal	2 (5.9)
Tumor sólido pseudopapilar	1 (2.9)
Pancreatitis crónica	2 (5.8)
Tumor neuroendocrino	1 (2.9)
Epitelio intestinal	1 (2.9)



Tabla 2. Correlaciones entre la expresión génica de PDX1 y MSX2 en tejido pancreático y sangre circulante, y parámetros de laboratorio de rutina en pacientes con cáncer de páncreas.

Parámetro	Tejido pancreático		Sangre circulante	
	Expresión génica de PDX1			
	r	p	r	p
Edad	-0.048	.786	-0.004	.984
Tamaño del tumor	-0.224	.203	-0.082	.667
Hemoglobina	0.126	.478	0.165	.383
Hematocrito	.115	.522	0.127	.511
Leucocitos	-0.037	.836	-0.066	.734
Plaquetas	0.363	<b>.035</b>	0.271	.147
Bilirrubina total	-0.099	.585	-0.027	.888
Fosfatasa alcalina	0.077	.669	-0.102	.592
Parámetro	Expresión génica de MSX2			
	r	p	r	p
	Edad	-0.064	.727	0.104
Tamaño del tumor	0.036	.088	-0.051	.789
Hemoglobina	-0.022	.906	0.174	.356
Hematocrito	0.058	.757	0.26	.172
Leucocitos	-0.057	.763	0.028	.885
Plaquetas	-0.044	.81	0.11	.561
Bilirrubina total	-0.092	.623	0.295	.121
Fosfatasa alcalina	0.048	.798	-0.077	.686

Figura 1. Efectos de la expresión de MSX2 en páncreas.

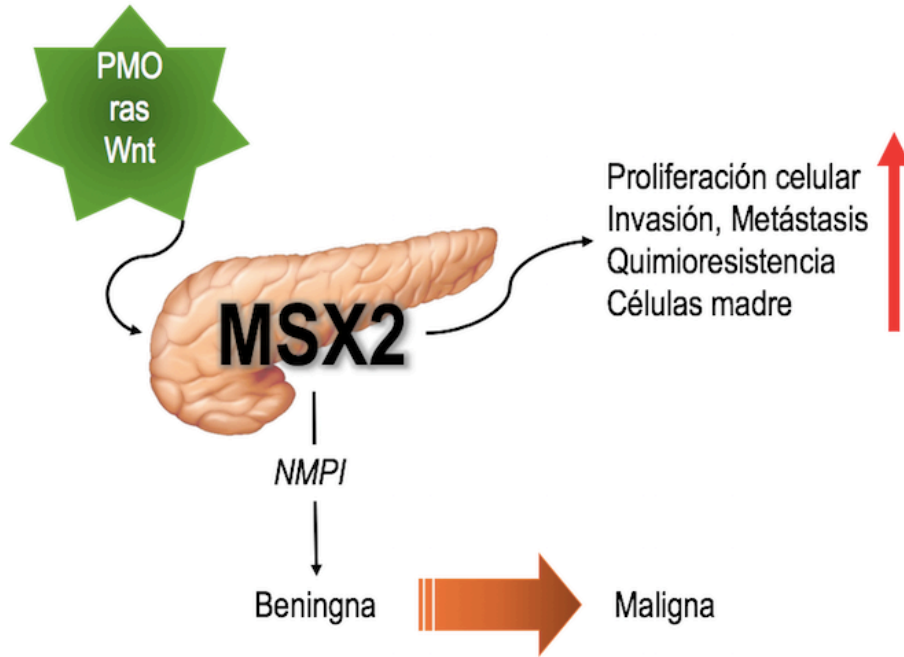


Figura 2. Efectos del aumento en la expresión de PDX1 en tejidos malignos de páncreas.

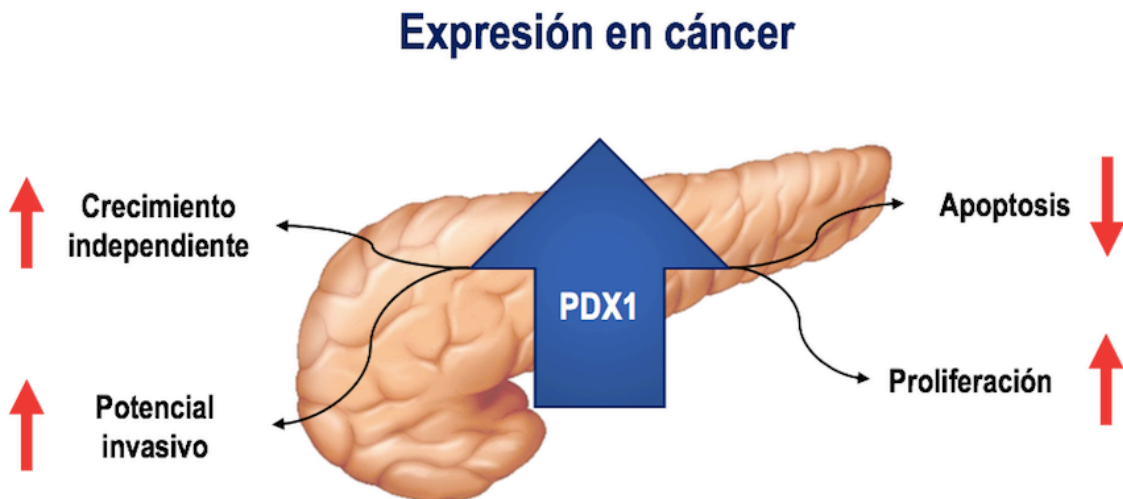


Figura 3. Expresión de PDX1 en biopsias líquidas de pacientes con y sin cáncer de páncreas.

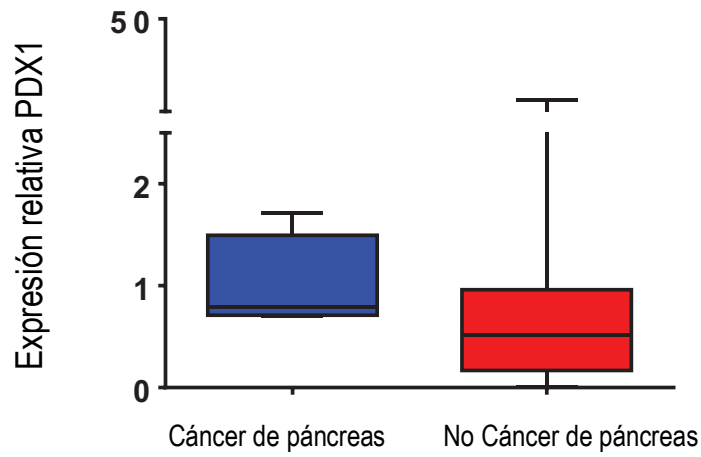


Figura 4. Expresión de MSX2 en biopsias líquidas de pacientes con y sin cáncer de páncreas.

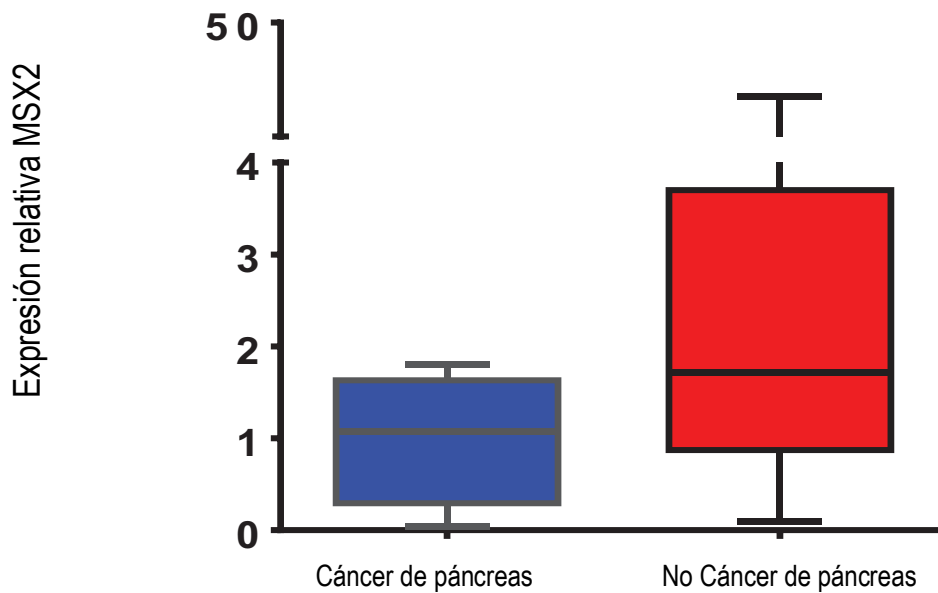


Figura 5. Diferencias en la expresión de MSX2 en biopsias líquidas de páncreas de acuerdo a la malignidad.

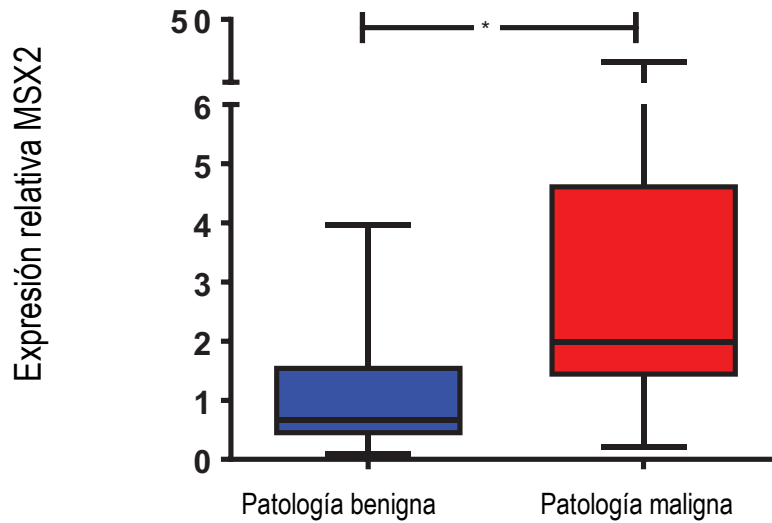


Figura 6. Diferencias en la expresión de PDX1 en biopsias líquidas de páncreas de acuerdo a la malignidad.

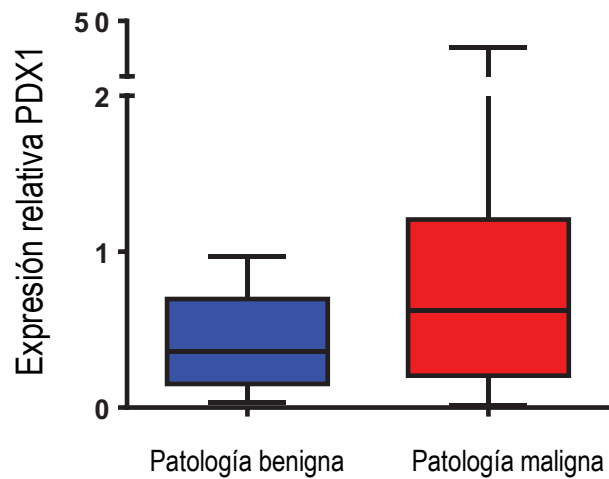


Figura 7. Expresión de MSX2 en ARNm de biopsias líquidas de pacientes sin cáncer de páncreas y patología maligna.

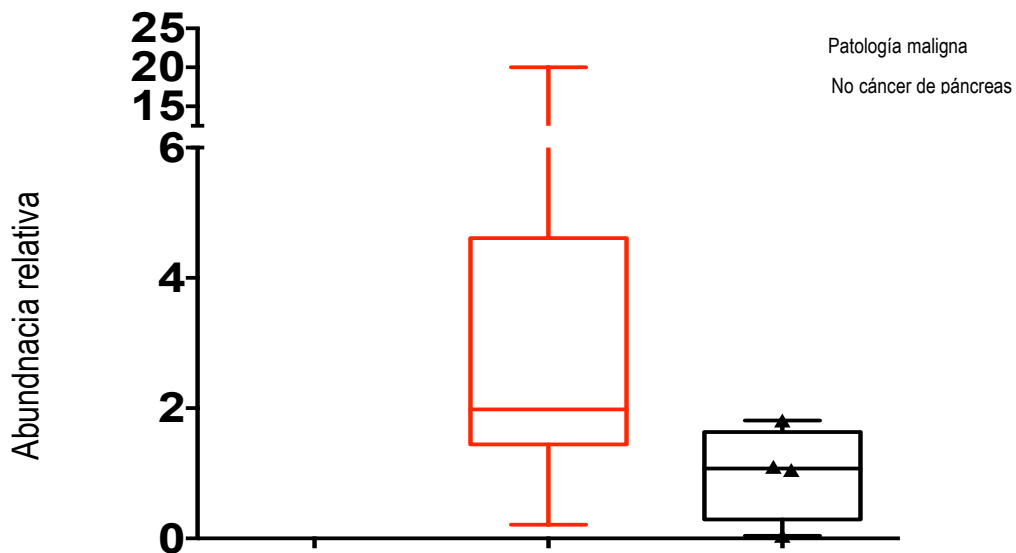


Figura 8. Expresión de PDX1 en ARNm de biopsias líquidas de pacientes sin cáncer de páncreas y patología maligna.

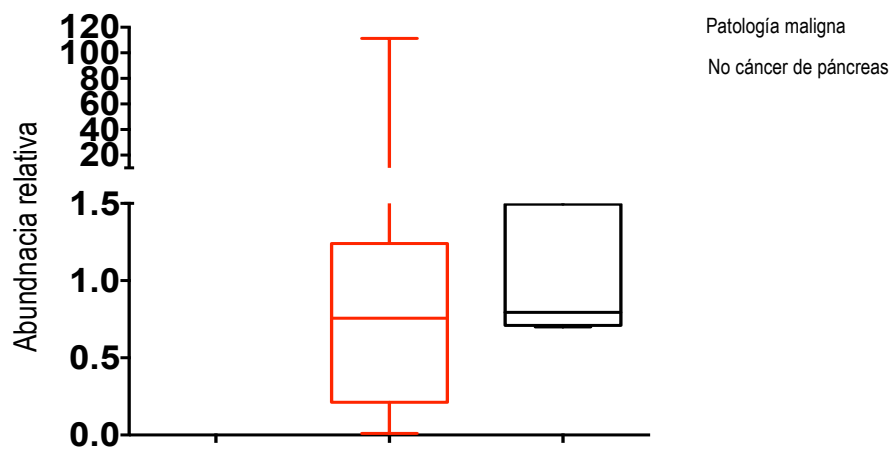


Figura 9. Expresión de PDX1 en sangre circulante de pacientes con y sin cáncer de páncreas.

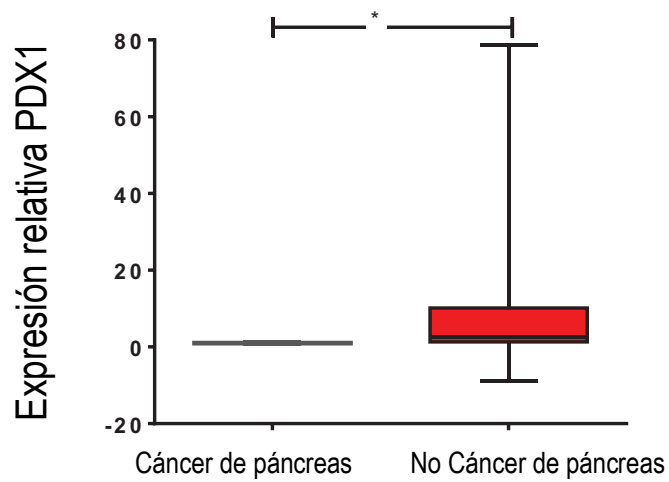


Figura 10. Expresión de MSX2 en sangre circulante de pacientes con y sin cáncer de páncreas.

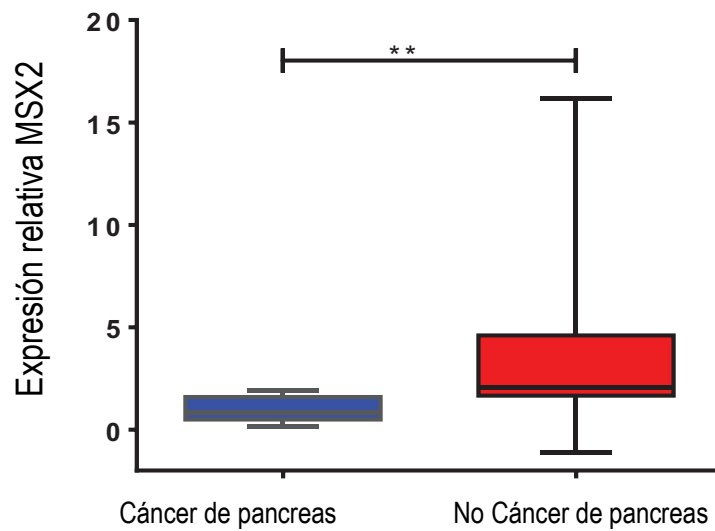


Figura 11. Diferencias en la expresión de PDX1 en sangre circulante de acuerdo a la malignidad.

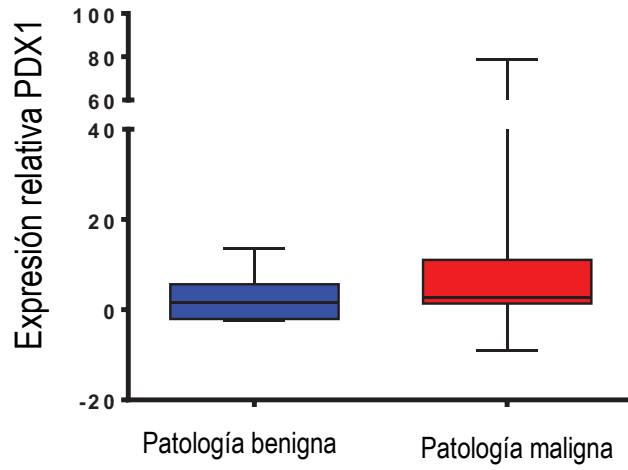


Figura 12. Diferencias en la expresión de MSX2 en sangre circulante de acuerdo a la malignidad.

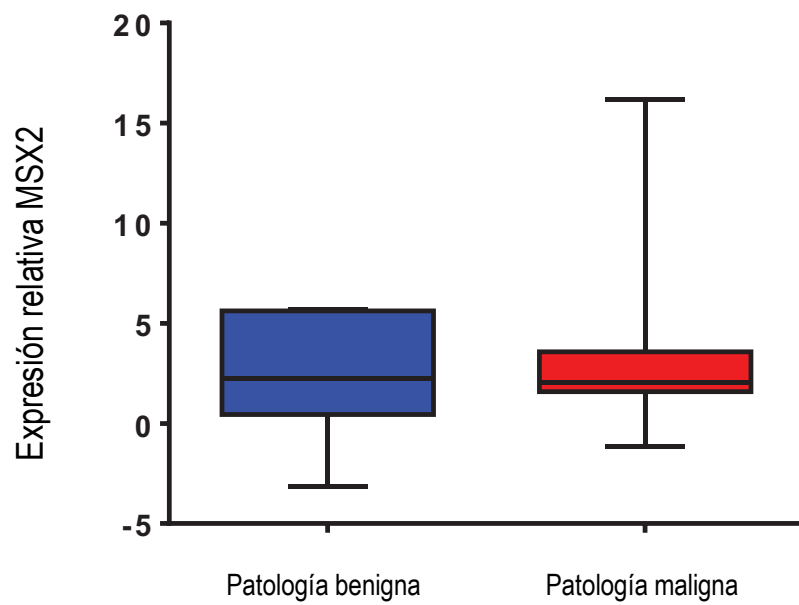


Figura 13. Expresión de MSX2 en ARNm de sangre circulante de pacientes sin cáncer de páncreas y patología maligna.

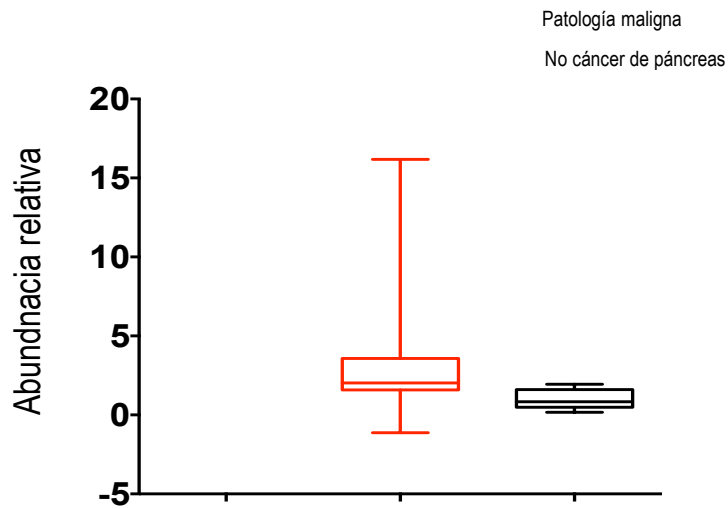


Figura 14. Expresión de PDX1 en ARNm de sangre circulante de pacientes sin cáncer de páncreas y patología maligna.

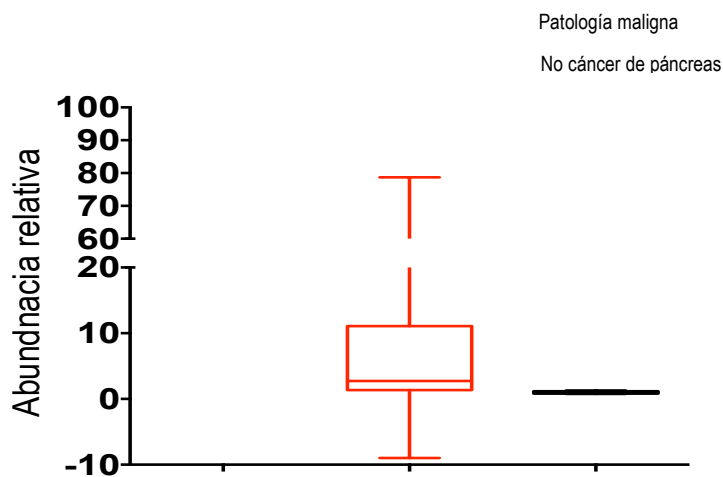
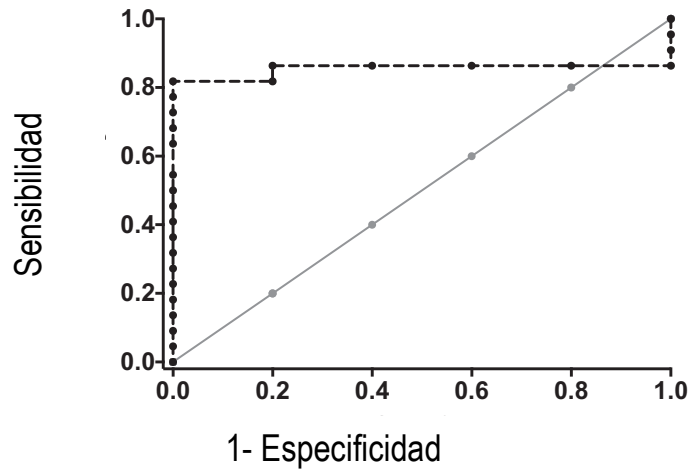


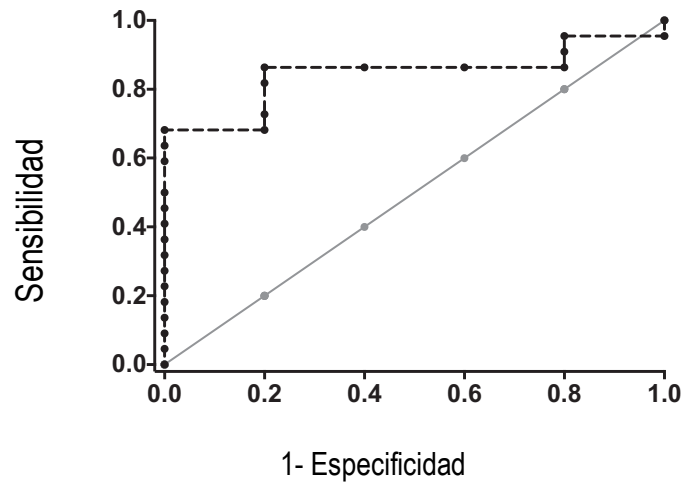


Figura 15. Sensibilidad y especificidad de la expresión de PDX1 para el diagnóstico de cáncer de páncreas.



**PDX1**

Figura 16. Sensibilidad y especificidad de la expresión de MSX2 para el diagnóstico de cáncer de páncreas.



**MSX2**

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Klein, A.P., Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol Carcinog*, 2012. 51(1): p. 14-24.
- <sup>2</sup> Rahib L, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74:2913–21.
- <sup>3</sup> Guitron-Cantu A, Adalid-Martinez R, Segura-Lopez F. [Epidemiology of bilio-pancreatic cancer in Specialty Hospital UMAE N degrees 71 IMSS in Torreon, Coahuil]. *Rev Gastroenterol Mex* 2011;76:287–94.
- <sup>4</sup> Ryan, D.P., T.S. Hong, and N. Bardeesy, Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2014. 371(11): p. 1039-49.
- <sup>5</sup> 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*, 2012. 23(4): p. 843-52.
- <sup>6</sup> Bosetti, C., et al., Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol Carcinog*, 2012. 51(1): p. 3-13.
- <sup>7</sup> Rebours, V., et al., Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(1): p. 111-9.
- <sup>8</sup> Xu, M.M. and A. Sethi, Imaging of the Pancreas. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016. 45(1): p. 101-16.
- <sup>9</sup> De Lisi, S. and M. Giovannini, Endoscopic ultrasonography: Transition towards the future of gastro-intestinal diseases. *World J Gastroenterol*, 2016. 22(5): p. 1779-86.
- <sup>10</sup> Varadarajulu, S. and J.Y. Bang, Role of Endoscopic Ultrasonography and Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography in the Clinical Assessment of Pancreatic Neoplasms. *Surg Oncol Clin N Am*, 2016. 25(2): p. 255-72.
- <sup>11</sup> Hruban RH. Pancreatic cancer. In: Wild BWSCP, editor. *World Cancer Report 2014*. France. 2014.
- <sup>12</sup> Morris JP, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10:683–95.

- 
- <sup>13</sup> Roy N, et al. PDX1 dynamically regulates pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and maintenance. *Genes Dev* 2016;30:2669–83.
- <sup>14</sup> Suzuki M, et al. Over-expression of HOX-8, the human homologue of the mouse Hox-8 homeobox gene, in human tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:187–93.
- <sup>15</sup> Babajko, S., et al., MSX2 in ameloblast cell fate and activity. *Front Physiol*, 2014. 5: p. 510.
- <sup>16</sup> Satoh, K., S. Hamada, and T. Shimosegawa, MSX2 in pancreatic tumor development and its clinical application for the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 430.
- <sup>17</sup> Suzuki, M., et al., Over-expression of HOX-8, the human homologue of the mouse Hox-8 homeobox gene, in human tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 194(1): p. 187-93.
- <sup>18</sup> Takahashi, Y., Le Douarin, N. cDNA cloning of a quail homeobox gene and its expression in neural crest-derived mesenchyme and lateral plate mesoderm. *Proc. Natl. Acad U.S.A.* 1990; 87, 7482-7486.
- <sup>19</sup> Suzuki, M., Tanaka, M., Iwase, T., et al. Over-expression of HOX- 8, the human homologue of the mouse Hox-8 homeobox gene, in human tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993 194, 187–193.
- <sup>20</sup> Ohta, H., Aoyagi, K., Fukaya, M, et al., Cross talk between hedgehog and epithelial- mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers. *Br. J. Cancer* 2009 100, 389–398.
- <sup>21</sup> Loftus, J. E. V., Olivares -Pakzad, B. A., Batts, K.P., et al. Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas: clínico-pathologic features, outcome and nomenclature. *Gastroenterology* 1996; 110, 1909-1918.
- <sup>22</sup> Lanigan, F., et al., Homeobox transcription factor muscle segment homeobox 2 (Msx2) correlates with good prognosis in breast cancer patients and induces apoptosis in vitro. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(4): p. R59.
- <sup>23</sup> Loftus, E.V., Jr., et al., Intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas: clinicopathologic features, outcome, and nomenclature. Members of the Pancreas Clinic, and Pancreatic Surgeons of Mayo Clinic. *Gastroenterology*, 1996. 110(6): p. 1909-18.

- 
- <sup>24</sup> Satoh, K., et al., Evaluation of MSX2 mRNA in brush cytology specimens distinguished pancreatic carcinoma from chronic pancreatitis. *Cancer Sci*, 2011. 102(1): p. 157-61.
- <sup>25</sup> Satoh, K., et al., Expression of MSX2 predicts malignancy of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *J Gastroenterol*, 2010. 45(7): p. 763-70.
- <sup>26</sup> Kaneto, H. and T.A. Matsuoka, Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature beta-cell function. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(3): p. 6281-97.
- <sup>27</sup> Park, J.Y., et al., Pdx1 expression in pancreatic precursor lesions and neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2011. 19(5): p. 444-9.
- <sup>28</sup> Ischenko, I., O. Petrenko, and M.J. Hayman, Analysis of the tumor-initiating and metastatic capacity of PDX1-positive cells from the adult pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(9): p. 3466-71.
- <sup>29</sup> McKinnon, C.M. and K. Docherty, Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*, 2001. 44(10): p. 1203-14.
- <sup>30</sup> Guo, L., et al., PDX1 in ducts is not required for postnatal formation of beta-cells but is necessary for their subsequent maturation. *Diabetes*, 2013. 62(10): p. 3459-68.
- <sup>31</sup> Wang, X.P., et al., Tissue MicroArray analyses of pancreatic duodenal homeobox-1 in human cancers. *World J Surg*, 2005. 29(3): p. 334-8.
- <sup>32</sup> Liu, S.H., et al., PDX-1: demonstration of oncogenic properties in pancreatic cancer. *Cancer*, 2011. 117(4): p. 723-33.
- <sup>33</sup> Marzioni, M., et al., PDX-1 mRNA expression in endoscopic ultrasound-guided fine needle cytoaspirate: perspectives in the diagnosis of pancreatic cancer. *Dig Liver Dis*, 2015. 47(2): p. 138-43.
- <sup>34</sup> Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(9): p. e36.
- <sup>35</sup> Bartsch DK, Gercke N, Strauch K, et al. The combination of MiRNA- 196b, LCN2, and TIMP1 is a potential set of circulating biomarkers for screening individuals at risk for familial pancreatic cancer. *J Clin Med* 2018;7:pii: E295.

---

<sup>36</sup> Igarashi S, Matsubara T, Harada K, et al. Bile duct expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 in perihilar cholangiocarcinogenesis. *Histopathology* 2012;61:266–76.

<sup>37</sup> Koizumi M, Doi R, Toyoda E, et al. Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. *Surgery* 2003;134:260–6.