



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS CIRCULANTES TUMORALES
EN CÁNCER DE PÁNCREAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

BIÓL. ROSALES GALLEGOS VICTOR HUGO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022

ABRIL



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/316/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **6 de diciembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **ROSALES GALLEGOS VICTOR HUGO** con número de cuenta **311018723** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS CIRCULANTES TUMORALES EN CÁNCER DE PÁNCREAS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. GENARO VÁZQUEZ VICTORIO
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Vocal: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Secretario: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 31 de marzo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca con número de registro 904746.

A mi tutora, la Dra. Karla Itzel Vázquez Santillán, así como y a los miembros del comité tutor, la Dra. Aliesha Araceli González Arenas y el Dr. Julio Isael Pérez Carreón.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme desarrollarme académicamente y ser el propulsor de mi educación científica además de brindarme múltiples herramientas educativas, académicas y de bienestar durante mis estudios de posgrado llevado a cabo mayormente en confinamiento domiciliario durante la pandemia de COVID-19.

A la doctora Karla Itzel Vázquez Santillán, mi tutora, por ser mi guía en este periplo científico, por acogerme dentro de su grupo de investigación y confiar siempre en mis capacidades, impulsando mi capacidad creativa y de análisis haciendo de mi proyecto de maestría una actividad retadora y enriquecedora. Su ahínco científico es fuente de motivación y un ejemplo muy grande.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Aliesha Araceli González Arenas y el Dr. Julio Isael Pérez Carreón por su guía y mentoría.

A los miembros del sínodo, Dr. Genaro Vázquez Victorio, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dr. Felipe Vaca Paniagua y Dra. Aliesha Araceli González Arenas por sus oportunos comentarios y tiempo dedicado a la revisión del manuscrito los cuales enriquecieron sustancialmente esta tesis.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica por permitirme participar como estudiante dentro de sus instalaciones, por las herramientas de aprendizaje y cursos que ha proveído a sus estudiantes particularmente a raíz de la situación de pandemia, además de enriquecer mi vida académica y social.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, por darme la bienvenida en el laboratorio de Epigenética del INMEGEN y adherirme a su equipo de investigación con cuyos miembros me he formado académicamente y compartido experiencias entrañables.

A mis compañeros del laboratorio, M. en C. Alejandro Ordaz Ramos, M. en C. Olivia Téllez Jiménez y QFB. Gabriela Espejo Villaldama, por su acompañamiento constante y valiosos comentarios, sugerencias y críticas a este proyecto de maestría. Sus conocimientos y amistad han sido invaluable pese al distanciamiento físico.

Al programa Espora Psicológica de la Unidad de Posgrado de la UNAM y al Departamento de Psiquiatría y Salud Mental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por brindarme atención, la cual ha sido fundamental para alcanzar la eficiencia y aprovechamiento académicos en mis estudios de maestría.

También agradezco a toda la gente anónima que comparte su ayuda en los foros de programación, así como también a la comunidad de especialistas en bioinformática quienes comparten su código, conocimientos y tutoriales de manera abierta en internet.

Finalmente, pero no por ello menos importante, a mis padres y hermanos por su afecto absoluto, por su constante apoyo y por su infatigable pasión por las ciencias y la vida misma.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Capítulo 1. Introducción	4
1.1 Cáncer.....	4
1.2 Cáncer de páncreas	6
1.3 Metástasis	9
1.4 Células iniciadoras de la metástasis.....	11
1.5 Células circulantes tumorales	13
Capítulo 2. Propuesta de investigación	17
2.1 Planteamiento del problema	17
2.2 Hipótesis.....	18
2.3 Objetivos	18
2.3.1 Objetivo general	18
2.3.2 Objetivos Particulares.....	18
Capítulo 3. Metodología	19
3.1 Selección de datos de expresión de CCT.....	19
3.2 Exploración de los datos y análisis de expresión diferencial de genes	19
3.3 Limpieza y filtrado de datos.....	20
3.4 Enriquecimiento de sets de genes	20
3.5 Identificación de genes comunes entre experimentos	20
3.6 Análisis de supervivencia.....	20
3.7 Análisis de variables clinicopatológicas y correlación de la expresión génica.....	21
3.8 Esencialidad de los genes en líneas celulares de cáncer	21
Capítulo 4. Resultados	22
4.1 Las células circulantes tumorales disminuyen su actividad transcripcional con respecto a los tumores primarios pancreáticos.....	22
4.2 Las células circulantes tumorales y las metástasis hepáticas tienen un enriquecimiento negativo de la transición epitelial-mesenquimal y de otros procesos biológicos	24

4.3	Los diferentes estudios de células circulantes tumorales comparten un perfil de expresión génica común que se asocia con la sobrevida de los pacientes	25
4.4	El perfil de expresión transcripcional de células circulantes tumorales se asocia con variables clínico-patológicas del cáncer de páncreas	31
4.5	Los genes sobreexpresados en CCT forman un cluster de correlación	35
4.6	Los genes del clúster son esenciales en cáncer de páncreas, se asocian con la sobrevida libre de recurrencia y correlacionan con marcadores de transición epitelial-mesenquimal	35
Capítulo 5. Discusión.....		40
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas.....		45
Referencias Bibliográficas		46

Resumen

El cáncer de páncreas (CaPa) es la neoplasia más letal, con una tasa de supervivencia del 9%. El CaPa se caracteriza por su naturaleza agresiva y escasa respuesta al tratamiento, ya que 82% de los casos presentan algún grado de metástasis al momento del diagnóstico. El nexo entre el sitio tumoral primario y las metástasis distantes son las células circulantes tumorales (CCT), las cuales son capaces de invadir e incorporarse a los vasos sanguíneos, sobrevivir en la circulación y evadir al sistema inmunológico hasta infiltrarse en tejidos distantes. Por estas razones, la caracterización de las CCT es esencial para identificar mecanismos que hacen posible la diseminación metastásica. Las CCT constituyen una alternativa no invasiva en el estudio de pacientes con tumores malignos, estas células consideradas como biopsias líquidas, pueden permitir el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad. A pesar del papel central de las CCT como agentes de la dispersión metastásica, la mayoría de los estudios realizados en CaPa se han limitado a cuantificar el número de CCT en sangre, y unos cuantos se han enfocado en caracterizar a nivel molecular a esta población celular.

El proyecto tiene como objetivo identificar firmas transcripcionales asociadas a células circulantes tumorales. Para ello se seleccionaron datos de expresión provenientes de tumor primario (TP), CCT, y metástasis hepáticas (MH) derivadas de pacientes con CaPa de los sets de datos GSE18670, GSE151580 y GSE114704 del Gene Expression Omnibus. Los datos se procesaron a través de un flujo de trabajo bioinformático para obtener el análisis de expresión diferencial entre TP, CCT y MH. El análisis de enriquecimiento de set de genes se llevó a cabo utilizando el programa GSEA. Para determinar la esencialidad de los genes se realizaron búsquedas en la base de datos de dependencia de genes del proyecto Achilles–DepMap. Para correlacionar la expresión génica con variables clínico-patológicas, se accedió a los datos de la cohorte de CaPa de The Cancer Genome Atlas – PanCancer y de páncreas normal GTEx, a través de UCSC Xena Browser. La manipulación, limpieza, filtrado y visualización de los datos se realizó con el ambiente de desarrollo Rstudio.

Los resultados del trabajo muestran que en CCT la mayoría de los genes se encuentran subexpresados, indicando que las CCT muestran una disminución de la actividad transcripcional con respecto al TP. Además, las CCT y las MH mostraron un enriquecimiento negativo de la vía de transición epitelial-mesenquimal. Mediante exploración de datos, se identificaron 681 genes diferencialmente expresados en CCT, comunes en estudios diferentes. De estos, 34 se asocian significativamente con la sobrevida de los pacientes y la sobrevida libre de recidiva, lo cual les confiere un valor pronóstico. Por si fuera poco, los perfiles de expresión de estos 34 genes se asocian de manera significativa con el grado histológico de la enfermedad, así como con la clasificación T-N tumoral, la presencia de tumor residual y el grado de respuesta al tratamiento. De los genes sobreexpresados en CCT, 5 de ellos también se sobreexpresan en tumores primarios. Dentro del clúster de expresión de estos genes se identificaron 3 de particular interés: Los genes WDR1 y CFLAR muestran ser altamente esenciales en líneas celulares de CaPa y

se relacionan con remodelación del citoesqueleto y evasión de la apoptosis. El tercer gen identificado, POU2F2 (OCT2), correlaciona positivamente con la expresión de marcadores mesenquimales y negativamente con marcadores epiteliales.

En conclusión, hemos identificado cambios transcripcionales en CCT con respecto al tumor primario en CaPa así como un perfil de genes con valor pronóstico que se asocian significativamente con variables clinicopatológicas de la enfermedad. Así mismo identificamos genes y procesos enriquecidos en CCT que potencialmente contribuyen a la diseminación metastásica en CaPa.

Abstract

Pancreatic cancer (PaCa) is the most lethal neoplasm, with a survival rate of 9%. PaCa is characterised by its aggressive nature and poor response to treatment, with 82% of cases having some degree of metastasis at diagnosis. The link between the primary tumour site and distant metastases are circulating tumour cells (CTCs), which can invade and incorporate into blood vessels, survive in the bloodstream, and evade the immune system to infiltrate distant tissues. For these reasons, characterisation of CTCs is essential to identify mechanisms that enable metastatic dissemination. CTCs constitute a non-invasive alternative in the study of patients with malignant tumours; these cells, considered as liquid biopsies, can allow the diagnosis and monitoring of the disease. Despite the central role of CTCs as agents of metastatic spread, most studies in PaCa are limited to quantifying the number of CTCs in blood, and a few have focused on characterising this cell population at the molecular level.

This project aims to identify transcriptional signatures associated with circulating tumour cells. To this end, expression data from primary tumour (PT), CCTs, and liver metastases (LM) derived from PaCa patients were selected from the Gene Expression Omnibus datasets GSE18670, GSE151580 and GSE114704. The data were processed through a bioinformatic workflow to obtain differential expression analysis between PT, CTCs, and LM. Gene set enrichment analysis was performed using the GSEA software. To determine gene essentiality, genes were queried on the gene dependency database of the Achilles-DepMap project. To correlate gene expression with clinical-pathological variables, data from The Cancer Genome Atlas - PanCancer CaPa cohort and normal pancreas from GTEx were accessed via UCSC Xena Browser. Data manipulation, cleaning, filtering, and visualisation were performed using the Rstudio dev-environment.

The results show that most genes in CTCs are under-expressed, indicating that CTCs show a decrease in transcriptional activity with respect to PT. In addition, CTCs and LM showed a negative enrichment of the epithelial-mesenchymal transition pathway. By data mining, 681 differentially expressed genes were identified in CTCs, common to different studies. Of these, 34 are significantly associated with overall survival and recurrence-free survival, conferring them prognostic value. Furthermore, the expression profiles of these 34 genes are significantly associated with the histological grade of the disease, as well as with tumour T-N classification, the

presence of residual tumour and the degree of response to treatment. Of the genes overexpressed in CTCs, 5 of them are also overexpressed in primary tumours. Within the expression cluster of these genes, 3 genes of particular interest were identified: WDR1 and CFLAR genes are shown to be highly essential in PaCa cell lines and are related to cytoskeleton remodelling and apoptosis evasion. The third gene identified, POU2F2 (OCT2), positively correlates with the expression of mesenchymal markers and negatively correlates with epithelial markers.

In conclusion, we have identified transcriptional changes in CTCs with respect to the primary tumour in PaCa as well as a gene signature with prognostic value that is significantly associated with clinical-pathological variables of the disease. We also identified genes and processes enriched in CTCs that potentially contribute to metastatic dissemination in PaCa.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Cáncer

Cáncer es el término utilizado comúnmente para denominar a un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de las células que componen a un tejido, frecuentemente formando masas celulares. Esta formación descontrolada y anormal de células recibe el nombre de neoplasia y cuando invade tejidos cercanos se conoce como neoplasia maligna. Al perderse la estructura y composición normal de los tejidos debido al desarrollo neoplásico, se compromete el correcto funcionamiento de los tejidos y en consecuencia se afecta gravemente la salud de los individuos involucrados. Además de invadir tejidos aledaños, las células neoplásicas son capaces de propagarse a otras regiones del cuerpo a través de los sistemas circulatorio y linfático. Esto produce tumores secundarios en regiones anatómicas distintas al sitio primario, en un fenómeno conocido como metástasis (Weinberg, 2013).

El desarrollo del cáncer comienza cuando las células normales atraviesan una transformación carcinogénica y adquieren un fenotipo maligno. Esta transformación ocurre como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas, epigenéticas y ambientales que modifican las capacidades de proliferación, apoptosis y migración de las células, entre otras funciones (Bertram, 2000).

Existen más de 100 tipos distintos de cáncer descritos a la fecha, comúnmente denominados de acuerdo con su sitio anatómico de origen. Por ejemplo, el origen del cáncer pulmonar radica en las células del pulmón, el cáncer mamario se origina en las células de la glándula mamaria y de manera similar puede ocurrir en todos los demás tejidos del cuerpo. También la gran diversidad de tumores que existen se clasifica de acuerdo con el tipo de tejido que les da origen. Así, los tumores originados en tejidos epiteliales escamosos son conocidos como carcinomas escamosos, aquellos originados en epitelios glandulares se denominan adenocarcinomas, aquellos que se forman en hueso y tejidos blandos o fibrilares son llamados sarcomas, mientras que los tumores sanguíneos reciben el nombre de leucemias (National Cancer Institute. NIH.).

A pesar de la gran diversidad y complejidad de los distintos tipos de tumores que existen, todos ellos comparten una serie de características comunes que les confieren a las células tumorales capacidades de proliferación, motilidad e invasión que no deberían poseer normalmente. Estas características moleculares que distinguen a las células de cualquier tumor se conocen como rasgos distintivos o *hallmarks* del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000)

Los hallmarks del cáncer, incluyen capacidades biológicas como (1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, (2) evasión de las señales supresoras de crecimiento, (3) resistencia a la muerte celular, (4) inmortalidad replicativa, (5) inducción de angiogénesis (6) activación de las

capacidades de invasión y metástasis, (7) desregulación del metabolismo energético y (8) evasión del sistema inmune (Figura 1).

La adquisición de estos hallmarks se debe principalmente a dos propiedades de las neoplasias. La primera es la inestabilidad genómica que promueve la mutabilidad y dota a las células cancerosas de alteraciones genéticas que impulsan la progresión tumoral. La segunda es la formación de un microambiente tumoral que favorece la interacción con células endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmune innato, lo cual desencadena un proceso inflamatorio que promueve el desarrollo de las capacidades malignas en las células neoplásicas (Hanahan & Weinberg, 2011b).

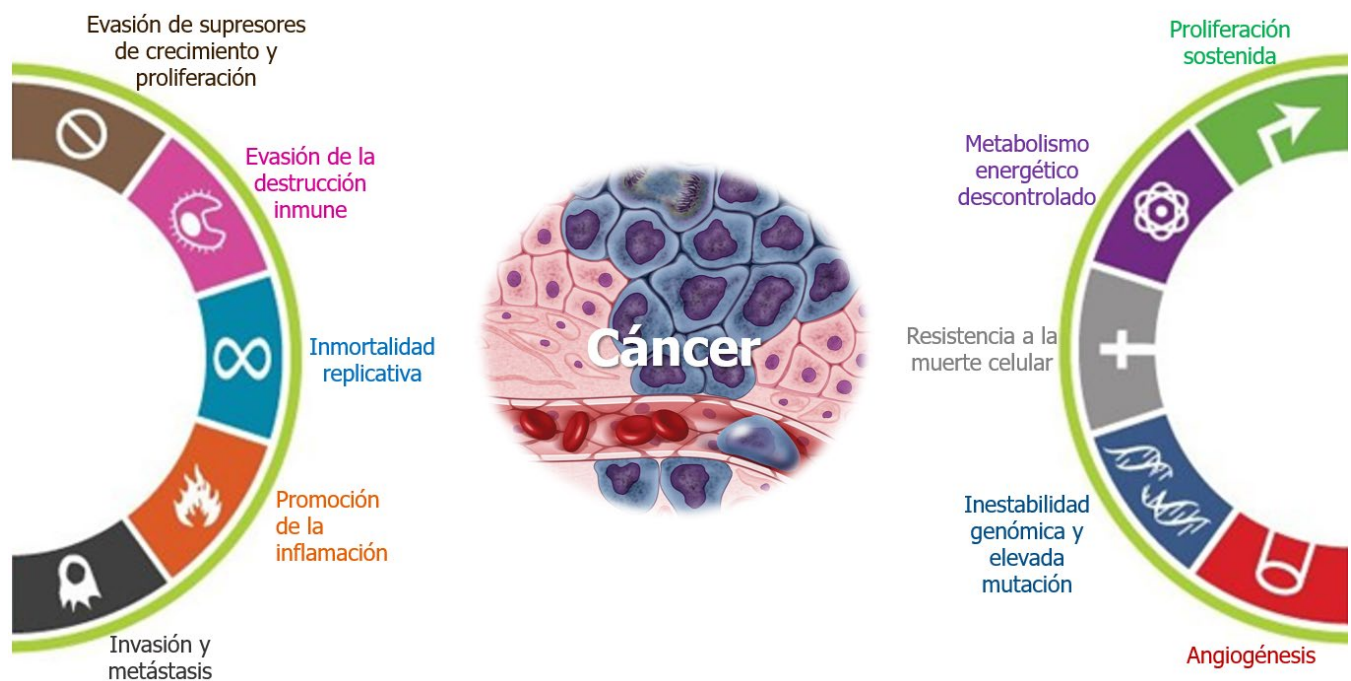


Figura 1. Los Hallmarks del cáncer son las capacidades biológicas alteradas que caracterizan a los tumores. Estas características distintivas de las neoplasias incluyen mantener la señalización proliferativa, eludir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis. Otro par de cualidades clave de los tumores son las alteraciones en el metabolismo energético que favorecen la progresión tumoral, y la evasión de los mecanismos de destrucción por parte del sistema inmune. A todas estas características subyacen dos rasgos fundamentales que promueven dichos hallmarks: la inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación. (Ilustración tomada y modificada del original de Hanahan & Weinberg, 2011).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las neoplasias malignas fueron el causante del 16.8% del total de muertes en 2019, ocupando el segundo puesto como principal causa de muerte a nivel mundial, tan solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares (32.2%). Además, se estima que las enfermedades neoplásicas serán la principal causa de muerte así

como la principal barrera para incrementar la esperanza de vida en todo el mundo durante el siglo XXI (World Health Organization, 2019).

Las enfermedades neoplásicas que representan el mayor porcentaje de casos de cáncer a nivel global son el cáncer de mama (11.7%), el cáncer de pulmón (11.4%), el cáncer colorrectal (10%) y el cáncer de próstata (7.3%). Por otra parte, aquellos que acumulan la mayor proporción de muertes son el cáncer de pulmón (18%), el cáncer colorrectal (9.4%), el cáncer de hígado (8.3%) y el cáncer de estómago (7.7%). En el caso de la república Mexicana, los cánceres con mayor incidencia y mortalidad en el año 2020 son el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el cáncer colorrectal (GLOBOCAN, 2020).

1.2 Cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas (CaPa) es la neoplasia maligna más letal en el mundo, con una tasa de letalidad del 91%. Entre las enfermedades neoplásicas, el cáncer de páncreas ocupa el duodécimo lugar en número de casos y el séptimo en número de muertes. Sin embargo, el cáncer de páncreas es el tipo de cáncer con peor pronóstico. La tasa de supervivencia en cinco años para pacientes con cáncer de páncreas es tan sólo del 9% y aproximadamente el 76% de los pacientes fallece en el primer año a partir de la fecha del diagnóstico (GLOBOCAN, 2020).

La mayoría de los casos diagnosticados corresponden a adenocarcinomas ductales pancreáticos (>90%), seguidos de tumores del tejido exocrino, y finalmente una pequeña proporción de neoplasias provenientes de las células endocrinas del páncreas. Aproximadamente el 60-70% de los adenocarcinomas se forman en la cabeza, el cuello o el proceso unciforme del páncreas, mientras que los tumores en el cuerpo (5-10%) y la cola (10-15%) del páncreas son menos frecuentes (McGuigan et al., 2018; Stathis & Moore, 2010).

En México, el cáncer de páncreas representa alrededor del 3% de todas las neoplasias malignas, y es responsable de aproximadamente el 6% de las muertes (Bray et al., 2018). A pesar de que este tipo de cáncer no es de los más frecuentes, los pacientes que lo padecen tienen un alto riesgo de fallecer. Tan solo en el año 2020 se registraron 4985 nuevos casos y 4720 decesos (GLOBOCAN, 2020). Se estima que durante los próximos años habrá un incremento en el número de casos y esta proporción de alta letalidad se mantendrá (Bray et al., 2018).

Los adenocarcinomas pancreáticos son en su mayoría cánceres esporádicos, ya que sólo el 10% surgen en el contexto de antecedentes familiares (Bartsch et al., 2012). Histológicamente, estos cánceres se caracterizan por una fuerte reacción desmoplásica la cual se compone en gran medida de proteínas de matriz extracelular que conforman un tejido fibroso duro. La reacción desmoplásica es tan extensa que por lo regular los tumores pancreáticos contienen solo entre 5% y 20% de células neoplásicas, mientras que el resto del volumen tumoral corresponde a estroma desmoplásico. Este estroma tiene gran relevancia clínica y biológica ya que dificulta la toma de biopsias para el diagnóstico y análisis genético, además de que actúa como barrera que impide la penetración de los fármacos antitumorales. Por si fuera poco, el es-

troma proporciona un sustrato en el cual residen fibroblastos asociados a tumor y otras células del sistema inmunológico que enriquecen el microambiente tumoral (Wood & Hruban, 2012).

La mayoría de los carcinomas pancreáticos se originan a partir de lesiones precursoras llamadas neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PaIN) las cuales pueden desde un grado bajo (PaIN 1) hasta un grado alto (PaIN 3) (Basturk et al., 2015). Las lesiones tempranas (PaIN1) presentan mutaciones en el oncogen KRAS, mientras que las lesiones avanzadas además se acompañan de mutaciones de pérdida de función de los genes supresores de tumor CDKN2A, TP53 y SMAD4 ([Figura 2](#)). Este último par son las mutaciones más tardías en la carcinogénesis molecular del cáncer de páncreas (Hosoda et al., 2017; Riva et al., 2018).

El CaPa es una enfermedad con gran heterogeneidad clínica a pesar de su contexto genético de mutaciones conductoras en tan sólo 4 genes. Por este motivo, otras alteraciones no genéticas como modificaciones epigenéticas, alteraciones en la expresión génica o interacciones microambientales, podrían ser esenciales en la progresión y el curso clínico de la enfermedad.

Una manera en la que se ha tratado de caracterizar la heterogeneidad biológica de los tumores pancreáticos ha sido a través del análisis del transcriptoma completo de los tumores. Los estudios de secuenciación masiva de RNA de células totales y más recientemente a nivel de célula única, han permitido identificar nuevas vías y procesos celulares biológicos cruciales de las células cancerosas y las células del microambiente tumoral, además de que han abierto camino hacia la identificación de nuevos subtipos tumorales de CaPa con comportamientos clínicos particulares. Sin embargo, actualmente no existe consenso en una clasificación molecular única del CaPa y permanece como un área intensa de investigación (Collisson et al., 2019; Pompella et al., 2020).

Además de la complejidad del CaPa, otro factor que impacta en la alta mortalidad de este tipo de neoplasias es el difícil diagnóstico de la enfermedad. Generalmente el CaPa es detectado en estadios avanzados cuando la enfermedad ya se ha diseminado a otros órganos (Yachida & Lacobuzio-Donahue, 2009). Aproximadamente solo el 10% de los pacientes reciben un diagnóstico en etapas tempranas en las cuales es factible la resección del tumor y una posible curación.

La detección temprana de cáncer de páncreas es difícil ya que es clínicamente silente hasta estadios avanzados de la enfermedad. Algunos indicadores son la presencia de dolor o de ascitis, que suele ser secundaria a carcinomatosis peritoneal. También se incluyen otros síntomas menos específicos como anorexia, vómito, náusea, tromboflebitis migratoria (síndrome de Trousseau), pancreatitis aguda, diabetes mellitus de diagnóstico reciente, esteatorrea y depresión (Franssen & Chan, 2011).

Los exámenes de sangre son poco específicos y el único marcador aprobado para la detección de cáncer de páncreas es el antígeno CA 19-9, sin embargo, su sensibilidad diagnóstica es baja y en muchas ocasiones puede estar relacionado a otras enfermedades no malignas (Kunovsky et al., 2018).

Los tumores pancreáticos se caracterizan por su naturaleza agresiva y la escasa respuesta a la quimioterapia y la radioterapia. La terapia más común es el uso de gemcitabina o 5-fluorouracilo junto con radiación, siendo la primera el estándar terapéutico. Cuando es posible el tratamiento quirúrgico estos fármacos se emplean como terapia adyuvante, sin embargo, sólo 10-15% de los pacientes se encuentran en esta categoría e incluso el 80% de ellos desarrollará metástasis regional o distante en un periodo menor a dos años (Stathis & Moore, 2010).

La letalidad de estos tumores se atribuye a la propensión a desarrollar metástasis a nivel regional o distante, lo cual hace inviable la aplicación de tratamiento quirúrgico (Yeo et al., 2002). El sitio involucrado con mayor frecuencia en la metástasis pancreática es el hígado, seguido por el peritoneo y los pulmones (Yachida & Lacobuzio-Donahue, 2009). Desafortunadamente, a pesar de los esfuerzos por tratar la enfermedad, las estrategias terapéuticas disponibles no logran disminuir la mortalidad ni mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas (Ferlay et al., 2016).

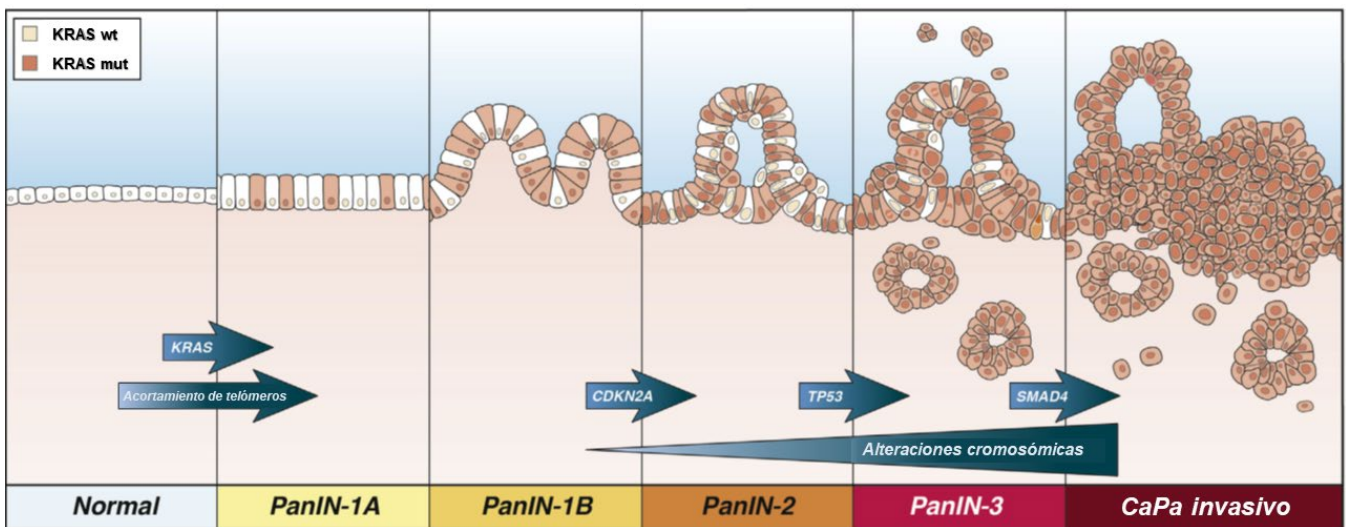


Figura 2. Modelo de carcinogénesis pancreática. La mayoría de las lesiones neoplásicas intraepiteliales del páncreas de grado bajo (PanIN-1) poseen mutaciones en *KRAS* además de acortamiento de los telómeros. La proporción de células portadoras de mutaciones de *KRAS* incrementa conforme progresa el grado de las lesiones intraepiteliales. La progresión de PanIN-1 a los estadios más avanzados PanIN-2 y PanIN-3 se asocia comúnmente con la inactivación de ambas copias de *CDKN2A*. Rara vez se suelen encontrar mutaciones de *TP53* en lesiones de grado bajo, pero se encuentran con frecuencia en estadios PanIN-3 y en neoplasias invasivas. La mutación de ambas copias de *SMAD4* es mucho más frecuente en la etapa de cáncer invasivo. Conforme progresa el desarrollo de la neoplasia se acumulan rearrreglos cromosómicos que favorecen la inactivación bialélica de estos y otros genes supresores de tumor. Se ha estimado que la inactivación de *BRCA2*, *ATM* y *ARID1A* podría ocurrir en etapas tardías y no parecen ser las mutaciones conductoras de la carcinogénesis pancreática (Imagen tomada y modificada de Wood et al., 2019)

1.3 Metástasis

La manifestación de metástasis es el resultado final de un proceso que involucra la diseminación de las células de un tumor a través de los vasos linfáticos y sanguíneos hasta llegar a órganos distantes, con la subsecuente adaptación y establecimiento de las células tumorales en estos tejidos lejanos (Gupta & Massagué, 2006).

Evidencias acumuladas demuestran que el tratamiento quirúrgico y la terapia adyuvante funcionan solo para curar tumores primarios bien delimitados, sin embargo, las metástasis son prácticamente incurables debido a la naturaleza sistémica de la enfermedad, así como a la resistencia de las células metastásicas a los agentes terapéuticos. Por tales características es que el 90% de las muertes relacionadas a tumores sólidos son debidas al desarrollo de metástasis (Valastyan & Weinberg, 2011; Wan et al., 2013).

El desarrollo de metástasis es uno de los rasgos distintivos del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011a) y es un fenómeno que ha intrigado a los patólogos desde hace más de un siglo. En 1889 el cirujano inglés Stephen Paget propuso la hipótesis de la semilla y el suelo, indicando que la metástasis no se debe al azar —el punto de vista predominante de esa época—, sino que ciertas células tumorales, que él equiparó con semillas, son compatibles con el medio ambiente de ciertos órganos (Fidler, 2003).

La metástasis es un proceso tumoral que podría tener su origen en poblaciones de células genéticamente heterogéneas que evolucionan por presiones microambientales selectivas. Se pueden distinguir varios fenómenos biológicos que constituyen la cascada de progresión metastásica ([Figura 3](#)): pérdida de adhesión celular, incremento en la motilidad y capacidad de invasión, intravasación y supervivencia en la circulación, extravasación y la eventual colonización de un sitio distante (Chambers, et al., 2002).

Cada uno de los pasos de la cascada metastásica es un punto de selección para diferentes propiedades biológicas de las células cancerosas y por lo tanto es un proceso que tiene el potencial de generar heterogeneidad entre las células del tumor primario y las células de los diferentes sitios metastásicos finales. Como resultado de estas presiones selectivas la enfermedad que una vez estuvo localizada se diversifica en enfermedades múltiples separadas en varios sitios del cuerpo y la heterogeneidad genética y epigenética que les dio origen contribuyen a la incapacidad de erradicar o atenuar la enfermedad metastásica (Hunter et al., 2018; McGranahan & Swanton, 2017).

Los primeros pasos de la cascada de la metástasis permiten la diseminación de las células cancerosas dado que estas adquieren características que les permiten abandonar el sitio primario e invadir otros tejidos. Un proceso celular muy importante que le confiere estas nuevas capacidades a las células cancerosas es el fenómeno de transición epitelial-mesenquimal (TEM), el cual normalmente está activo en las células durante la embriogénesis y en el proceso de reparación de los tejidos epiteliales en adultos. Sin embargo, las células cancerosas son capaces de activar este programa de transdiferenciación celular que conlleva la pérdida de algunas características epiteliales y la adquisición de ciertos rasgos de tipo mesenquimal (Lambert et al., 2017).

Las características que adquieren las células mediante el proceso de TEM son cruciales para la invasión y diseminación metastásica. Algunas de ellas son una mayor motilidad, invasividad y la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular. Este programa celular es dirigido por un conjunto de factores de transcripción maestros que inducen la TEM. Aquellos que han sido descritos con mayor detalle son los factores de transcripción Snail, Slug, Twist, y Zeb1, sin embargo, no son los únicos capaces de inducir TEM (Kalluri & Weinberg, 2009).

Adicionalmente, cabe resaltar que se ha descrito que las células cancerosas pueden adquirir la capacidad de formar tumores *de novo* posteriormente a la inducción de la TEM. Esto es de gran relevancia ya que la capacidad iniciadora de tumores es el rasgo distintivo de las células troncales del cáncer (CTC) y la existencia de células diseminadas con características de CTC sería crítica para iniciar tumores secundarios en sitios distantes. Además, la adquisición de rasgos mesenquimales favorece la resistencia de las células cancerosas a los tratamientos anti-neoplásicos, lo cual ofrece una explicación posible al hecho de que las enfermedades metastásicas son muy resistentes a la quimio y radioterapia (Lambert et al., 2017).

De acuerdo con la evidencia experimental acumulada, las señales producidas por el estroma tumoral son las responsables de la activación del programa de la TEM en las células neoplásicas. El estroma —compuesto por fibroblastos, células mieloides, linfoides, endoteliales y pericitos—, libera varias señales tales como TGF- β , Wnt y numerosas citocinas que inducen la activación de la TEM en las células cancerosas. Este fenómeno suele ser reversible en un proceso conocido como transición mesenquimal-epitelial (TME), volviendo a adquirir rasgos de tipo epitelial. Muy probablemente, más que tratarse de un proceso binario de cambio entre los estados epitelial y mesenquimal, éste es un proceso mucho más complejo que se manifiesta en un fenotipo celular mixto y plástico, con varios estados intermedios (Nieto et al., 2016; Thiery, 2002).

A pesar de que tradicionalmente se ha propuesto que la metástasis es un evento tardío en el desarrollo tumoral, algunos estudios han mostrado que la adquisición de características asociadas con la invasión y diseminación del cáncer puede ocurrir en etapas tempranas. El tiempo requerido para la progresión metastásica podría ser menor a lo esperado debido a que en un inicio se requieren más mutaciones y modificaciones epigenéticas para la carcinogénesis y formación de un tumor primario en comparación con el número de mutaciones posteriores que se requieren para formar un tumor secundario. También se ha documentado la diseminación de células en etapas tempranas del desarrollo tumoral, lo cual implica que tanto el tumor primario como la metástasis podrían progresar en paralelo. De hecho se han detectado células tumorales en circulación desde estadios iniciales de la enfermedad en varios tipos de cáncer como el pulmonar, gástrico, melanoma y cáncer de páncreas (Ilie et al., 2014; Mimori et al., 2008; Reid et al., 2013; Rhim et al., 2014)

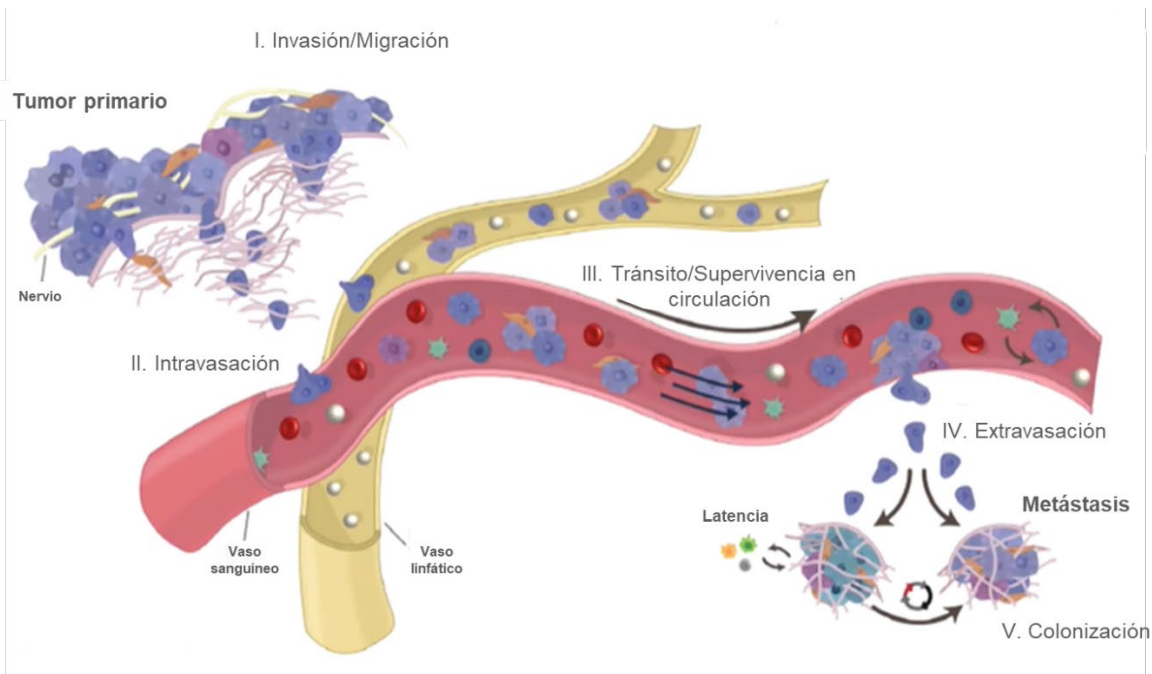


Figura 3. La cascada de la metástasis es un conjunto de eventos sistémicos y dinámicos a nivel temporal y anatómico. De forma general el proceso se puede dividir en varias etapas que comienzan por la **(I)** invasión y migración de las células neoplásicas en el tumor primario y en los tejidos aledaños a este. Enseguida la **(II)** intravasación de las células neoplásicas les permite adentrarse en vasos linfáticos y sanguíneos para transportarse a nivel sistémico. El **(III)** tránsito y supervivencia en la circulación es crucial para que las células puedan diseminarse hasta sitios anatómicos distantes. **(IV)** Posteriormente las células salen de la circulación (extravasación) y se arrestan en los sitios secundarios en donde establecen interacciones con el microambiente de estos tejidos y finalmente si las células cancerosas son capaces de proliferar ocurre la **(V)** colonización metastásica (Tomado y modificado de Chitty et al., 2018).

Se piensa que solo unas pocas células dentro de la heterogeneidad del tumor primario son capaces de dar lugar a la metástasis. Este pequeño número de células metastásicas se obtiene como resultado de la eliminación de las células que son incapaces de completar los procesos de la cascada metastásica, ya que cada uno de estos pasos representa una etapa de selección mediada por las señales microambientales distintas al órgano de origen (Fidler, 1975).

1.4 Células iniciadoras de la metástasis

Los tumores primarios constantemente liberan numerosas células que se diseminan de forma sistémica, sin embargo se estima que menos del 0.02% del total de células tumorales son capaces de establecer una metástasis (Cameron et al., 2000; Luzzi et al., 1998). Este fenómeno implica la existencia de una minúscula población de células con la capacidad de establecer colonias metastásicas viables en tejidos distantes. Este tipo particular de células recibe el nombre de células iniciadoras de metástasis (CIM).

Las CIM poseen características similares a las células troncales tumorales, también conocidas como células iniciadoras de tumor. Tales características como gran plasticidad fenotípica, así como la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse, confieren a las CIM mayor potencial maligno y la posibilidad para establecer un nuevo tumor produciendo poblaciones celulares heterogéneas en un órgano distinto al primario. Los rasgos característicos de las CIM son su capacidad tumorigénica, la habilidad para cambiar entre los estados epitelial y mesenquimal bidireccionalmente, la resistencia a la anoikis y apoptosis, la evasión del sistema inmune, así como características que les facilitan la adaptación a un nuevo microambiente; la interacción con células del nicho metastásico, la cooperación entre poblaciones clonales y la reprogramación de su actividad metabólica (Celià-Terrassa & Kang, 2016).

El origen exacto de las CIM aún es desconocido y no se sabe si adquieren sus cualidades desde que se encuentran en el tumor primario, durante su diseminación o hasta que llegan al sitio de metástasis. El estudio de estas células es esencial para la búsqueda de nuevos marcadores que permitan detectarlas de manera eficiente, así como también diseñar terapias clínicamente relevantes para impedir que estas puedan establecer nuevos tumores en órganos distantes.

Las tecnologías emergentes de secuenciación masiva han hecho posible adentrarse en el estudio de las CIM permitiendo la comparación del genoma completo entre tumores primarios y sus correspondientes metástasis. Con estos estudios se ha mostrado que las metástasis son mayormente de origen policlonal y se componen de poblaciones celulares heterogéneas (Gundem et al., 2015; McFadden et al., 2014). Particularmente los análisis de secuenciación de una sola célula han mostrado ser de gran utilidad para analizar las diferentes poblaciones celulares durante la progresión metastásica (Lawson et al., 2015).

Las CIM han sido descritas de manera muy somera y debido a la limitada caracterización de estas células se han formulado diferentes hipótesis en torno a su identidad. Por ejemplo, se ha hipotetizado que las CIM, debido a su capacidad de formar un nuevo tumor en un sitio distante, deben ser las mismas o análogas a las células iniciadoras de tumor, las cuales han sido caracterizadas por tener un fenotipo de tipo troncal (Singh et al., 2014).

En un reporte reciente (Fico, F., et al, 2019) se identificó una población de células de cáncer de mama con la capacidad de formar metástasis ($\text{Lin}^- \text{CD24}^+ \text{CD90}^+$) que a pesar de compartir ciertas características de troncalidad con las CIT ($\text{Lin}^- \text{CD90}^- \text{ALDH}^{\text{high}}$), respondían de forma diferente a la señalización vía TGF β , ya que la subpoblación $\text{Lin}^- \text{CD24}^+ \text{CD90}^+$ disminuía al inhibir a *Tgfbr1*, mientras que la subpoblación $\text{Lin}^- \text{CD90}^- \text{ALDH}^{\text{high}}$ se incrementaba. Esto indica que las capacidades de iniciación tumoral e iniciación metastásica corresponden a poblaciones celulares diferentes.

También en cáncer de mama, ha sido reportada la existencia de una subpoblación de células circulantes tumorales con capacidad iniciadora de metástasis en ensayos de xenotrasplante tumoral. El número de estas CIM putativas, identificadas por los marcadores $\text{EPCAM}^+ \text{CD44}^+ \text{CD47}^+ \text{MET}^+$, correlacionó con una menor supervivencia y un mayor número de focos metastásicos (Bacelli et al., 2013).

En otro estudio independiente (L. Yang et al., 2020), los autores describieron una subpoblación celular derivada de metástasis mamaria, caracterizada por una elevada expresión de receptores de PDGF y una alta capacidad metastásica en respuesta al estímulo con PDGF. La inhibición de PDGFR suprimió preferencialmente la formación de metástasis, pero no redujo la formación del tumor primario, lo cual sugiere que las células que forman el tumor secundario son independientes de aquellas que forman el tumor primario.

Poco es sabido sobre marcadores que permitan la identificación de las CIM. En el caso de carcinoma oral se identificó una subpoblación de células CD44⁺ con altos niveles de expresión del receptor de ácidos grasos CD36 y el uso de anticuerpos neutralizantes anti-CD36 inhibe casi por completo el desarrollo de metástasis *in vivo* (Pascual et al., 2017). Curiosamente esta subpoblación con capacidad de iniciar metástasis no expresa genes de tipo mesenquimal. Esto contrasta con la visión predominante de que la transición epitelio-mesenquima debe ser un rasgo necesario en la promoción de la metástasis (Yeung & Yang, 2017), apuntando a que el fenotipo de las CIM es más plástico de lo que se había pensado y probablemente asemeje un estado híbrido epitelial-mesenquimal-troncal.

Algunos hallazgos han mostrado que las células iniciadoras de metástasis son capaces de apropiarse de los mecanismos normales de regeneración epitelial propios de las células troncales, para adquirir potencial metastásico. En el caso del epitelio intestinal, la proteína de adhesión L1CAM está reprimida en estado quiescente, pero esta se activa cuando se pierde la integridad del epitelio y es necesaria para activar la regeneración. De forma similar en cáncer colorrectal, cuando se pierden los contactos epiteliales por las lesiones cancerosas se activa una población de células L1CAM⁺ farmacorresistentes que son necesarias para el desarrollo de metástasis (Ganesh et al., 2020). De este modo las CIM implementan un mecanismo de reparación de tejido en la progresión metastásica.

La identificación de las CIM tiene un potencial uso diagnóstico y pronóstico, además de que serían el blanco terapéutico ideal para evitar la propagación sistémica de las enfermedades neoplásicas, principalmente aquellas con elevada propensión al desarrollo metastásico y por consecuencia con elevada letalidad, como es el cáncer de páncreas.

1.5 Células circulantes tumorales

El nexo entre el sitio tumoral primario y las metástasis distantes son las células diseminadas en la circulación a partir del tumor primario. Estas células reciben el nombre de células circulantes tumorales (CCT) y son capaces de sortear varios obstáculos como atravesar el endotelio e incorporarse a los vasos sanguíneos. Estas células pueden transportarse como células individuales o como agregados multicelulares, siendo capaces de sobrevivir al estrés de la circulación y evadir al sistema inmunológico, hasta llegar a la microvasculatura de tejidos distantes en los cuales pueden infiltrarse.

Las CCT, tanto en forma de células individuales o como trombos multicelulares, muestran características mixtas de células epiteliales y de células mesenquimales, lo cual manifiesta la rele-

vancia del proceso de TEM en estas poblaciones celulares (Yu et al., 2013). Además, en estudios con pacientes se ha descrito que la fracción de CCT mesenquimales se incrementa progresivamente junto con el avance de la enfermedad y la adquisición de resistencia a los tratamientos. Este fenómeno de TEM representa un problema para los métodos de detección y enriquecimiento de CCT que se basan en el uso de marcadores epiteliales, ya que impide la captura de las células con fenotipo mesenquimal, las cuales podrían ser responsables de la formación de metástasis distantes.

La detección de CTC tiene un valor clínico importante pues al ser biopsias líquidas facilitarían el diagnóstico de cáncer dado que la presencia de CCT es común en varios tipos de carcinomas como el de colón, mama, pulmón y próstata. También pueden ser útiles en el monitoreo de la enfermedad y arrojar información sobre la respuesta de los pacientes al tratamiento tumoral además de que tienen potencial como indicadoras de enfermedad residual. Por otra parte, el aislamiento y expansión en cultivo de CCT sería de utilidad para realizar análisis genéticos y evaluar la sensibilidad de las células cancerosas a los tratamientos antineoplásicos (Woo & Yu, 2018).

Al estar en la circulación sanguínea, las CCT encuentran varios obstáculos como el flujo hidrodinámico, la presión, y la falta de adherencia a un sustrato. Además, las células cancerosas pueden ser atacadas por células del sistema inmunológico como las células NK. A pesar de esto, algunas interacciones con otras células presentes en la circulación podrían ser favorables para la supervivencia y tránsito de las CCT ([Figura 4](#)).

Las CCT se asocian con plaquetas las cuales pueden protegerlas del reconocimiento y eliminación por células NK. Este efecto protector está mediado por TGF- β y PDGF derivados de las plaquetas los cuales inhiben la actividad de las células NK, además de formar un efecto burbuja que proporciona protección física a las CCT (Labelle & Hynes, 2012). También las plaquetas pueden impactar en las señales intracelulares de las CCT mediante la activación de la señalización de TGF- β /SMAD y de la vía de NF- κ B y en consecuencia activando los programas celulares de TEM que facilitarían la posterior extravasación e invasión de las CCT (Labelle et al., 2011). Adicionalmente, las plaquetas pueden interactuar con las células endoteliales incrementando la permeabilidad de los vasos sanguíneos y facilitando la adhesión de las CCT con el endotelio vascular y favoreciendo la migración transendotelial (Schumacher et al., 2013).

Otro tipo celular del microambiente sanguíneo son los neutrófilos, los cuáles en términos generales promueven la formación metastásica. Por ejemplo, los neutrófilos pueden interactuar directamente con las células cancerosas al atraparlas en trampas extracelulares neutrofílicas (NET por sus iniciales en inglés). Estas redes compuestas por DNA liberado por los neutrófilos capturan a las células neoplásicas en la circulación y facilitan las interacciones adhesivas con la vasculatura. Estas interacciones, aunadas con la secreción de metaloproteasas de matriz extracelular, hacen de los neutrófilos excelentes promotores de la extravasación de las CCT. Adicionalmente, los neutrófilos también ejercen funciones inmunosupresoras ya que inhiben la respuesta antitumoral de los linfocitos T CD8⁺ y de las células NK en la circulación sanguínea (Spiegel et al., 2016).

Para poder salir de la vasculatura, las CCT realizan un proceso llamado migración transendotelial. Para que este proceso ocurra es necesaria la acción de varias moléculas que dañan la integridad del endotelio vascular. Muchas veces las CCT expresan catepsinas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ADAM12 y otras metaloproteinasas de matriz (MMPs) que les confieren una mayor capacidad de degradar proteínas de matriz extracelular y migrar a través del endotelio (Massagué & Obenauf, 2016; Reymond et al., 2013). En algunos casos, como en células de carcinoma mamario, se ha visto que las células pueden producir la proteína tipo angiopoietina 4 (ANGPTL4) en respuesta a TGF- β , favoreciendo la permeabilidad de los vasos sanguíneos e incrementando la capacidad metastásica (Padua et al., 2008).

También se ha descrito que el reclutamiento de macrófagos tiene un papel funcional en la extravasación ya que estos pueden convertirse en macrófagos asociados a metástasis los cuales liberan VEGF incrementando la capacidad la supervivencia y proliferación de las células cancerosas en el sitio metastásico además de incrementar la permeabilidad vascular (Wolf et al., 2012). Adicionalmente, otro mecanismo que puede alterar la integridad del endotelio vascular y permitir la extravasación de las CCT es un tipo de necrosis programada denominada necroptosis. Este fenómeno es inducido por las células neoplásicas sobre las células endoteliales (Strilic et al., 2016).

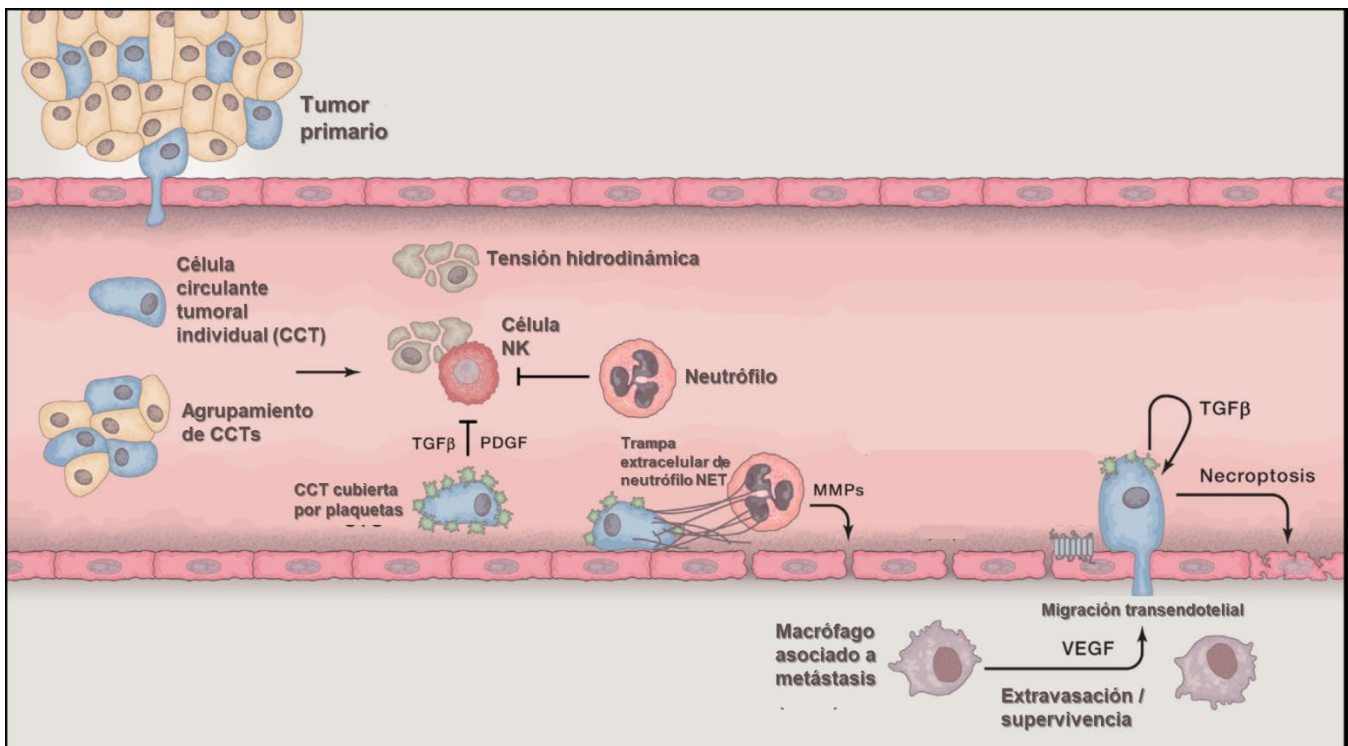


Figura 4. Las células circulares tumorales (CCT) pueden adentrarse en la circulación ya sea como células individuales o como agrupamientos multicelulares con interacciones celulares. El ambiente de la circulación puede ser hostil para las CCT por el propio estrés hidrodinámico de la sangre, así como por el ataque de células NK. Sin embargo, frecuentemente las CCT están envueltas en plaquetas que las protegen de las células NK y que liberan señales inmunosupresoras. Los neutrófilos también pueden tener un efecto protector de las CCT frente a las células NK, además de que al liberar trampas extracelulares de DNA (NETs) pueden facilitar la adhesión de las células

neoplásicas en la pared del endotelio vascular. Además, ciertas señales como TGF- β pueden promover la migración transendotelial de las CCT y ayudar a su extravasación. También los macrófagos desempeñan un papel relevante en la extravasación pues al diferenciarse en macrófagos asociados a metástasis aportan señales que permiten la migración transendotelial así como la supervivencia y proliferación de las células metastásicas. Imagen tomada y modificada de Lambert et al., 2017).

En el caso particular del cáncer de páncreas se ha documentado en modelos murinos mediante *single cell* RNA-seq, que las CCT son heterogéneas y al menos se pueden distinguir tres subpoblaciones con base en sus perfiles transcripcionales; una con fenotipo clásico de tipo epitelial, otra con expresión de genes plaquetarios y la tercera con un fenotipo proliferativo (Ting et al., 2014). También es característico de estas células la expresión de proteínas de matriz extracelular como SPARC enriquecidas en la interfaz epitelio-estroma, y que favorecen la actividad metastásica de las células. También en modelos murinos se ha observado una incrementada señalización de la vía de WNT la cual inhibe la anoikis e incrementa la capacidad metastásica de las células. (Yu et al., 2012).

En pacientes con cáncer de páncreas se ha mostrado que las CCT muestran mutaciones en KRAS al igual que sus correspondientes tumores primarios. También se ha reportado que se pueden detectar células epiteliales pancreáticas en la circulación en etapas muy tempranas del desarrollo tumoral e incluso en lesiones preneoplásicas. Por estas razones las CCT podrían ser una biopsia líquida de gran utilidad para el diagnóstico oportuno y el análisis genético del cáncer de páncreas (Kulemann et al., 2017; Rhim et al., 2014).

Adicionalmente, ha sido reportado que las CCT pancreáticas cambian sus perfiles de expresión en respuesta a la quimioterapia, particularmente aumentando la expresión de genes de tipo troncal (Amantini et al., 2019). También el número de CCT se asocia con la progresión de la enfermedad, ya que se pueden identificar más CCT con fenotipo mesenquimal en pacientes con invasión de nódulos linfáticos en comparación con aquellos que no la tienen (Zeinali et al., 2018). Además, el número de CCT presentes en la vena porta se asocia con la presencia de metástasis intrahepática y es un indicador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de páncreas. Estas CCT, al ser expandidas en cultivo in vitro, muestran resistencia a varios agentes antineoplásicos (Liu et al., 2018). En general, la identificación de CCT puede ser una herramienta diagnóstica útil para estratificar el riesgo de desarrollar metástasis e identificar resistencia a regímenes quimioterapéuticos (Effenberger et al., 2018).

Para estudiar las funciones biológicas cruciales para las CCT en cáncer de páncreas el enfoque adoptado en años recientes ha sido el análisis del transcriptoma de estas células. Sergeant y colaboradores en 2012 identificaron por medio de análisis de expresión del transcriptoma algunas vías enriquecidas como la vía de MAPK, así como un perfil de expresión génica relacionado con la motilidad celular.

Por su parte, Dimitrov-Markov et al. en 2020 mostró mediante *single cell*-RNA-seq, que las CCT poseían un transcriptoma diferente al de las células del tumor primario y a las de metástasis hepática, además de caracterizarse por una baja expresión de genes de proliferación y de matriz extracelular. También se identificó al gen de survivina BIRC5 como un regulador clave de la

mitosis y apoptosis. Tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento de survivina mostraron ser eficaces para promover la muerte de las células tumorales, así como la anoikis, sugiriendo que esta molécula tiene una función clave para la supervivencia de las CCT en la circulación.

En otro estudio (Franses et al., 2020) se identificó en CCT pancreáticas una alta correlación en la expresión de algunos genes de tipo troncal. Uno de estos genes fue LIN28B, el cual es un RNA oncofetal capaz de inhibir a la familia de miRNAs Let-7. Tanto la inhibición como la delección de LIN28B disminuyeron la capacidad metastásica de las células, mostrando que LIN28B desempeña un papel importante en las funciones biológicas de las CCT de páncreas.

Dado que las CCT se encuentran en la antesala de la iniciación metastásica, estudiarlas y caracterizarlas permitirá identificar subpoblaciones de CCT con capacidad de iniciar la metástasis. Los estudios de análisis de expresión del transcriptoma son una herramienta útil para lograr la caracterización molecular de estas células. Además, ofrecen la oportunidad de correlacionar perfiles de genes asociados con la formación de metástasis, así como identificar genes clave en la diseminación metastásica e identificar posibles blancos terapéuticos para las células responsables de la dispersión metastásica.

Capítulo 2

Propuesta de investigación

2.1 Planteamiento del problema

Debido al impacto de las metástasis en la sobrevivencia de los pacientes con cáncer de páncreas, la detección temprana del cáncer de páncreas es crucial. En este sentido el estudio de las células circulantes tumorales es fundamental ya que constituyen una biopsia líquida que permitiría el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad evitando la invasividad inherente a las biopsias tradicionales, las cuales son mucho más difíciles de obtener a partir de tumores y metástasis pancreáticos.

Las células circulantes tumorales poseen capacidades celulares únicas que les permiten dispersarse a través de la circulación y albergar precursores metastásicos. Este fenotipo celular es el resultado de un programa transcripcional que se asemeja a un estado híbrido epitelial/mesenquimal que confiere a las células circulantes tumorales sus cualidades únicas de invasión, supervivencia y formación de tumores secundarios. Por lo tanto, el análisis del transcriptoma de las células circulantes tumorales permitiría identificar perfiles de expresión asociados a los procesos celulares que hacen posible la diseminación metastásica.

A pesar de que las células circulantes tumorales son los agentes de la dispersión metastásica, la mayoría de los estudios realizados en cáncer de páncreas se han limitado a cuantificar el

número de células circulantes tumorales en sangre, y tan solo unos cuantos se han enfocado en caracterizar a nivel molecular a esta población celular. Es por estas razones que el propósito de esta tesis es analizar el transcriptoma de células circulantes tumorales de cáncer de páncreas con el objetivo de compararlo contra el patrón de expresión del tumor primario e identificar un perfil transcripcional asociado a la capacidad metastásica.

2.2 Hipótesis

Las células tumorales modifican su transcriptoma para adquirir ventajas funcionales durante el proceso de invasión y metástasis. Por lo tanto, las células circulantes tumorales tendrán perfiles de expresión transcripcionales correlacionados con los procesos de migración, adhesión, invasión y metástasis.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Identificar firmas transcripcionales asociadas a células circulantes tumorales.

2.3.2 Objetivos Particulares

- Analizar el perfil transcripcional de células circulantes tumorales en cáncer de páncreas.
- Identificar posibles marcadores de pronóstico y genes susceptibles de ser blancos terapéuticos.
- Identificar genes y vías clave del proceso metastásico en células circulantes tumorales.
- Seleccionar moléculas candidatas para realizar ensayos funcionales.

Capítulo 3

Metodología

3.1 Selección de datos de expresión de CCT

Como resultado de una búsqueda en el repositorio público de datos de genómica funcional Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), se obtuvieron tres conjuntos de datos identificados con los siguientes números de acceso: [GSE18670](#), [GSE151580](#) y [GSE114704](#). Estos tres estudios se seleccionaron por cumplir con las características de contener datos de expresión de células circulantes tumorales (CCT), de tumor primario pancreático y de metástasis hepática, todos ellos derivados de células de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma ductal pancreático.

En el primer conjunto de datos ([GSE18670](#)) Sergeant et al. en 2012 aislaron RNA total a partir de muestras de CCT, células sanguíneas, tumor primario pancreático y tejido pancreático sano. Las CCT se aislaron por selección negativa utilizando biomarcadores para eliminar las células sanguíneas normales (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). Los datos de expresión de cada uno de estos tejidos los obtuvieron a través de la plataforma [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (microarreglo de expresión). De este conjunto de datos se descargaron los archivos CEL disponibles para ser analizados.

En el caso del estudio [GSE151580](#) (J. Yang et al., 2021) se obtuvieron muestras de tumores pancreáticos y sus correspondientes metástasis hepáticas provenientes de pacientes. A partir de estas muestras se aisló RNA total, se prepararon librerías de cDNA con NEBNext RNA first and second Strand Synthesis Module (NEB, USA) y se realizó la secuenciación de lecturas cortas con Illumina HiSeq X-Ten (Illumina). La calidad de las lecturas se evaluó con FASTQC y las lecturas de baja calidad se eliminaron con trimGalore. Las lecturas resultantes se mapearon contra el genoma humano de referencia (hg19) utilizando el software STAR (v2.5.2b). En este conjunto de datos se descargaron los archivos de *read counts* disponibles en el portal de GEO.

Finalmente en el estudio [GSE114704](#) (Dimitrov-Markov et al., 2020) los autores obtuvieron células tumorales a partir de tumor primario, sangre periférica y metástasis en hígado derivados de un modelo de xenotrasplante tumoral derivado de pacientes. De cada muestra se aisló RNA de células individuales y se realizó secuenciación masiva de RNA en célula única (single cell-RNA-seq). Los valores de expresión se descargaron a partir del archivo de *read counts* disponible en GEO.

3.2 Exploración de los datos y análisis de expresión diferencial de genes

Los archivos CEL provenientes de microarreglos de expresión del estudio [GSE18670](#) fueron procesados con ayuda del software Transcription Análisis Console (TACx, Affymetrix) y se obtuvieron los valores de expresión de cada una de las muestras. También se utilizó el algoritmo de Limma para realizar el análisis de expresión diferencial entre las muestras de células circulantes

tumorales y tumor primario. A partir de este análisis se recuperaron las listas de genes diferencialmente expresados, así como los valores de tasa de cambio y los valores de p ajustados.

Los datos de expresión de RNA-seq obtenidos a partir de los estudios [GSE151580](#) y [GSE114704](#) se cargaron en la aplicación web integrated Differential Expression and Pathway análisis (iDEP.91, Ge et al., 2018) con la cual se realizó la exploración de los datos de expresión con el uso de agrupamientos jerárquicos no supervisados (Hierarchical clustering) y de análisis de componentes principales (PCA). Con estos análisis se puede observar la variabilidad de los datos de expresión y se pudo corroborar la correspondencia y agrupamiento entre muestras del mismo tipo: (I) tumor primario (TP), (II) células circulantes tumorales (CCT) y (III) metástasis hepáticas (Met).

También a través de iDEP se realizó el análisis de expresión diferencial entre CCT-TP y Met-TP, utilizando el algoritmo del programa DESeq2. Se obtuvieron las listas de genes diferencialmente expresados y los correspondientes valores de cambio (fold change) y valores de p ajustados.

3.3 Limpieza y filtrado de datos

Con las listas de genes diferencialmente expresados se realizó una limpieza y filtrado de los datos, conservando solo aquellos genes que tuvieran valores de fold change mayores a 2 o inferiores a -2, y con valores de p ajustados menores a 0.05. Además, utilizando la aplicación BiomaRt (Ensembl, EMMBL-EBI) se verificó la correspondencia entre los números de identificación de las plataformas Affymetrix e Illumina, convirtiendo todos a su correspondiente ENSEMBL ID. Solo se conservaron aquellos datos con ENSEMBL ID únicos. La manipulación de los datos se realizó en el ambiente de desarrollo Rstudio utilizando el paquete dplyr.

3.4 Enriquecimiento de sets de genes

Con las listas de genes obtenidos a partir de los análisis de expresión diferencial se realizaron análisis de enriquecimiento de sets de genes para cada una de las comparaciones entre muestras. Mediante la aplicación iDEP se utilizó el algoritmo de GSEA (fgsea preranked) para obtener los sets de genes enriquecidos en muestras de células circulantes tumorales y en muestras de metástasis hepáticas con respecto a sus correspondientes tumores primarios.

3.5 Identificación de genes comunes entre experimentos

Una vez obtenidos todos los ENSEMBL IDs para cada uno de los genes diferencialmente identificados, se realizaron operaciones de conjuntos y diagramas de Venn-Euler para identificar aquellos genes comunes entre experimentos. Las intersecciones entre listas de genes y los diagramas de Venn-Euler se realizaron con la herramienta de diagramas bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/.

3.6 Análisis de supervivencia

Los genes identificados como comunes entre experimentos fueron evaluados para conocer su grado de correlación con la supervivencia general y la supervivencia libre de recurrencia en datos de

pacientes con cáncer de páncreas pertenecientes a The Cancer Genome Atlas (TCGA) en la cohorte de adenocarcinoma ductal pancreático (PAAD). Los datos de supervivencia y expresión fueron analizados por medio de la herramienta web Kaplan Meier plotter kmplot.com/ (Nagy et al., 2021) comparando la supervivencia del cuartil con menor expresión contra el cuartil con mayor expresión de cada uno de los genes de interés dentro de la cohorte TCGA-PAAD. De este modo se obtuvieron los valores de Hazard Ratio y el valor de significancia estadística, así como las gráficas de Kaplan-Meier. Debido a que se evaluó el valor pronóstico de múltiples genes, fue necesario realizar la corrección de múltiples pruebas de hipótesis. Para tal propósito, se utilizó la herramienta multipletesting.com/ (Menyhart et al., 2021) y se obtuvieron valores ajustados de significancia (q-values) considerando como estadísticamente significativos aquellos genes con q-values menores a 0.05.

3.7 Análisis de variables clinicopatológicas y correlación de la expresión génica

Mediante el uso de UCSC Xena Browser xenabrowser.net/ (Goldman et al., 2020) se accedió a los datos de la cohorte de adenocarcinoma ductal pancreático (PAAD) de The Cancer Genome Atlas (TCGA). Utilizando los datos clínicos e histopatológicos disponibles se realizaron comparaciones de los niveles de expresión de los genes de interés. El análisis estadístico de los datos se realizó con el mismo UCSC Xena Browser y los datos de la cohorte fueron descargados para realizar las gráficas utilizando el paquete ggplot2 en Rstudio.

También a través de Xena Browser se realizaron los análisis de correlación de la expresión génica entre varios genes, obteniendo los coeficientes de correlación de Pearson y los valores de significancia estadística.

3.8 Esencialidad de los genes en líneas celulares de cáncer

A través del portal DepMap se realizó una búsqueda en la base de datos de proyecto Achilles depmap.org/portal/achilles/ (Tsherniak et al., 2017) el cual identifica y cataloga la esencialidad de los genes en cientos de líneas celulares de cáncer. En esta base de datos se consultaron las perturbaciones en la supervivencia de las células por efecto del silenciamiento con RNAi o deleción con CRISPR-Cas9 de genes individuales.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Las células circulantes tumorales disminuyen su actividad transcripcional con respecto a los tumores primarios pancreáticos.

En el último par de décadas las tecnologías genómicas de alto rendimiento se han utilizado extensamente para estudiar la expresión génica en diferentes tipos de tumores. Con estos estudios se han identificado numerosos genes diferencialmente expresados en diferentes etapas de la progresión tumoral de numerosos tipos de cáncer y de líneas celulares, y un gran número de estos datos se encuentran disponibles en repositorios digitales públicos.

En el caso particular del cáncer de páncreas, las características genéticas de los tumores metastásicos han sido ampliamente exploradas, mientras que los rasgos transcripcionales de las metástasis humanas derivadas de cáncer de páncreas aún son desconocidas en términos generales. Además, son escasos los estudios de muestras pareadas de tumor primario, metástasis y células circulantes tumorales, debido a la baja celularidad de los tumores de origen pancreático y a la dificultad de obtener biopsias de metástasis y células circulantes.

Con el propósito de explorar el transcriptoma de las células metastásicas del cáncer de páncreas, emprendimos una búsqueda de datos crudos derivados de experimentos de RNA-seq y microarreglos depositados en repositorio público Gene Expression Omnibus (GEO). Se seleccionaron aquellos estudios que permitieran comparar células circulantes tumorales contra tumor primario, o metástasis hepáticas contra tumor primario. Con estos datos se realizó un análisis de expresión diferencial para identificar diferencias en los perfiles transcripcionales entre estas tres diferentes modalidades de adenocarcinoma ductal pancreático. Los conjuntos de datos seleccionados se describen en la [tabla 1](#).

	Conjunto de datos	Especie	Tipo de muestras comparadas		Tecnología	
CCT – TP	1	GSE18670	<i>H. sapiens</i>	Células circulantes tumorales	Tumor primario	Array
	2	GSE114704	<i>H. sapiens</i>	Células circulantes tumorales	Tumor primario	scRNA-seq
Met – TP	3	GSE151580	<i>H. sapiens</i>	Metástasis hepática	Tumor primario	RNA-seq
	4	GSE114704	<i>H. sapiens</i>	Metástasis hepática	Tumor primario	scRNA-seq

Tabla 1. Características de los cuatro experimentos de transcriptoma seleccionados para el análisis de expresión diferencial de genes. Se compararon muestras de células circulantes tumorales (CCT) contra tumor primario (TP), y metástasis (Met) contra tumor primario.

En el caso de los estudios de RNA-seq, se recuperaron los conteos de lecturas directamente del GEO. Para los estudios de microrreglos de expresión, se descargaron los archivos CEL y se extrajeron los valores normalizados de expresión con el uso de la plataforma Transcriptome Analysis Console (TACx) de la compañía Afymetrix. El flujo de trabajo para el análisis de los datos se muestra en la [figura 5](#).

Con ayuda de la herramienta Integrated Differential Expression and Pathway análisis (IDEP.91) se realizó la exploración de los datos de expresión obtenidos de ambas tecnologías, obteniendo un análisis de agrupamiento jerárquico y un análisis de componentes principales en cada uno de los conjuntos de datos. Esta exploración no supervisada de los datos permitió identificar los grupos de muestras y la mejor forma de hacer comparaciones entre grupos.

Para identificar los genes diferencialmente expresados, se utilizó el software DESeq2 en los datos derivados de RNA-seq y el software Limma a través de TACx para los datos de arreglos de expresión. De este modo se obtuvieron los valores de cambio (fold change) y los valores de p ajustados por corrección de Benjamini-Hochberg (FDR). Los valores de corte para seleccionar genes diferencialmente expresados fueron una tasa de cambio ≥ 2 , o ≤ -2 , y un valor de FDR ≤ 0.01 .

Como se muestra en la [figura 6](#), la gran mayoría de los genes diferencialmente expresados entre células circulantes tumorales y tumor primario se encuentran regulados a la baja en los dos sets de datos analizados. Esta información es un indicio de que las CCT muestran una disminución de la actividad transcripcional con respecto a las células del tumor primario. Por otra parte, el número de genes diferencialmente expresados entre metástasis y tumor primario varió entre los dos sets de datos estudiados, mostrando que el panorama transcripcional de las metástasis es heterogéneo, ya que en uno de ellos la mayoría de los genes se identificaron como sobreexpresados, mientras que en el segundo la mayoría estaban subexpresados.

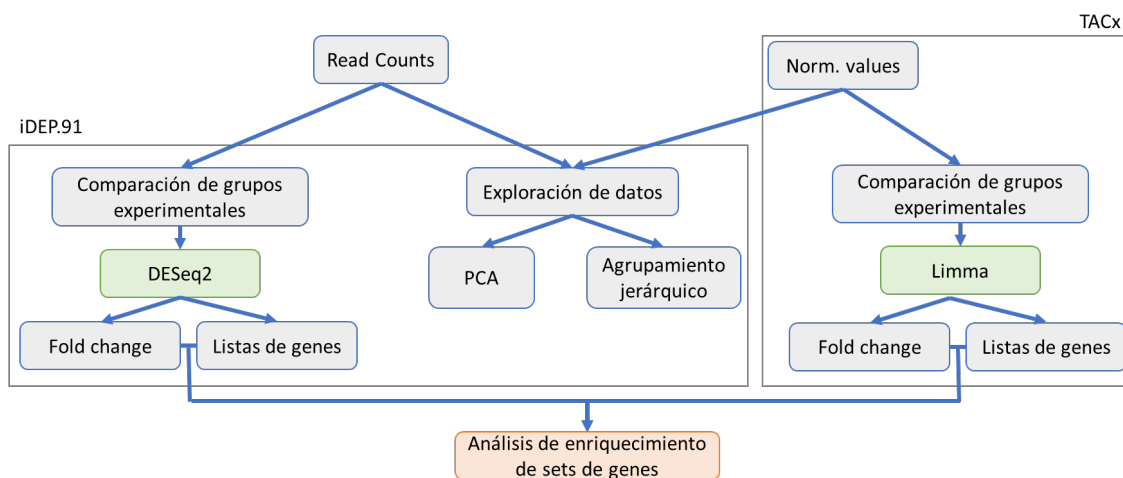


Figura 5. Flujo de trabajo para el análisis de expresión diferencial de genes.

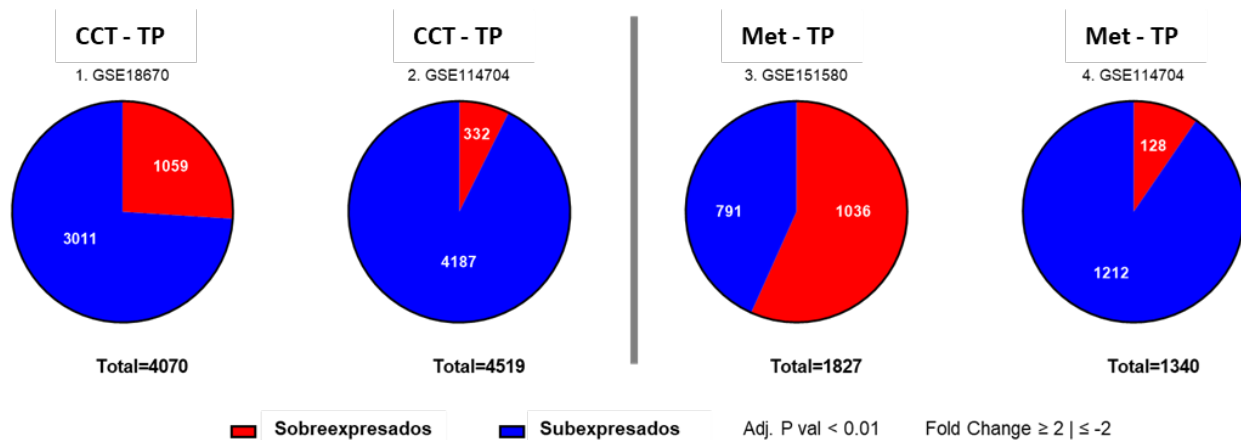


Figura 6. Número de genes diferencialmente expresados. En cada gráfico se representa el número de genes diferencialmente expresado entre células circulantes tumorales y tumor primario (CCT – TP); y metástasis hepáticas con respecto al tumor primario (Met – TP). Se consideraron como estadísticamente significativos aquellos genes con valores de P ajustados menores a 0.01 y tasas de cambio mayores a 2 o menores a -2.

4.2 Las células circulantes tumorales y las metástasis hepáticas tienen un enriquecimiento negativo de la transición epitelial-mesenquimal y de otros procesos biológicos

Para obtener más información sobre el transcriptoma de los tumores primarios, células circulantes y metástasis hepáticas, así como para poder identificar vías y procesos enriquecidos en cada uno de los conjuntos de datos, se realizó un análisis de enriquecimiento de sets de genes mediante el algoritmo de GSEA. Utilizando los sets de genes Gene Ontology (GO) y la base de datos de firmas moleculares (MSigDB), se identificaron las principales vías enriquecidas con un $FDR \leq 0.05$. Ciertos procesos enriquecidos fueron únicos para cada estudio, particularmente aquellos con puntajes de enriquecimiento más altos ([figura 7-A](#)). No obstante, cabe remarcar que el Hallmark Epithelial Mesenchymal Transition fue una vía enriquecida de forma concurrente en tres de los cuatro experimentos.

La vía de transición epitelial-mesenquimal muestra un puntaje de enriquecimiento normalizado negativo (NES), lo cual indicaría un cambio mesenquimal-epitelial. Coincide también que esta vía está enriquecida en los dos experimentos de células circulantes tumorales. Esto representa un indicio de que el fenómeno de transición mesenquimal-epitelial podría ser relevante en la biología de las células circulantes tumorales y es congruente con el papel que tiene este fenómeno de transdiferenciación en la progresión metastásica, el cual ha sido ampliamente discutido en la literatura científica.

Para poder visualizar más fácilmente los procesos biológicos de GO enriquecidos en cada uno de los sets de datos, se ilustraron en una nube de palabras los términos de ontología de genes más frecuentemente representados en el análisis de enriquecimiento. En términos generales, los procesos enriquecidos al alza en células circulantes tumorales con respecto al tumor prima-

rio están relacionados con ciclo celular, mitosis, fenómenos de señalización y procesos relacionados con plaquetas. En el caso de las metástasis hepáticas se encuentran enriquecidas vías asociadas a señalización intracelular, metabolismo hepático y carcinogénesis.

Por otra parte, los procesos más frecuentemente enriquecidos a la baja en CCT involucran fenómenos de señalización, transcripción, apoptosis y procesos asociados a cáncer. Mientras tanto, en metástasis se encuentran a la baja procesos de morfogénesis, desarrollo, organización y remodelación de la matriz extracelular e hipoxia ([figura 7-B](#)).

4.3 Los diferentes estudios de células circulantes tumorales comparten un perfil de expresión génica común que se asocia con la sobrevida de los pacientes

Para profundizar en la identificación de genes clave, y aprovechando la disponibilidad de datos provenientes de fuentes diferentes, nos enfocamos en tratar de identificar vías o procesos comunes entre los estudios y en buscar un perfil de expresión de varios genes compartidos entre los datos de células circulantes tumorales y los datos de metástasis hepáticas. Para tal efecto se agruparon y compararon los genes diferencialmente expresados de cada uno de los cuatro experimentos mediante diagramas de Venn-Euler para así poder identificar las intersecciones entre conjuntos.

Tal como se representa en la [figura 8](#), logramos identificar 681 genes diferencialmente expresados comunes a los dos experimentos de células circulantes tumorales, de los cuales 674 estaban expresados a la baja y tan solo 7 estaban sobreexpresados ([figura 8-A, C](#)). Por otra parte, tan solo se identificaron 65 genes en la intersección entre los dos experimentos de expresión diferencial en metástasis hepáticas, de los cuales 61 se encontraron a la baja y 4 al alza ([figura 8-B, D](#)).

Aprovechando la disponibilidad de bases de datos moleculares, clínicos y patológicos de cáncer de páncreas, decidimos adoptar un enfoque exploratorio de ciencia conducida por datos. Con el fin de indagar la significancia biológica y clínica de estos genes en cáncer de páncreas, analizamos su posible valor pronóstico utilizando datos de expresión y de sobrevida de la cohorte de adenocarcinoma pancreático del Atlas del Genoma del Cáncer Pan-Cancer (TCGA Pan-Cancer por sus siglas en inglés).

Los datos de la cohorte fueron separados en cuartiles comparando en cuartil inferior que agrupa a aquellos tumores con menor expresión del gen de interés contra el cuartil superior que agrupa a aquellos con la mayor expresión. De este modo se puede determinar si la baja o alta expresión de un gen se asocia con la probabilidad de supervivencia.

Para cada uno de los 681 genes comunes en células circulantes obtuvimos los valores de cociente de riesgo (Hazard Ratio) y el valor de P de significancia estadística. Al tratarse de un

análisis de prueba de hipótesis múltiple realizamos la corrección de los valores de significancia y se ajustaron mediante el método de Benjamini-Hochberg a un valor q .

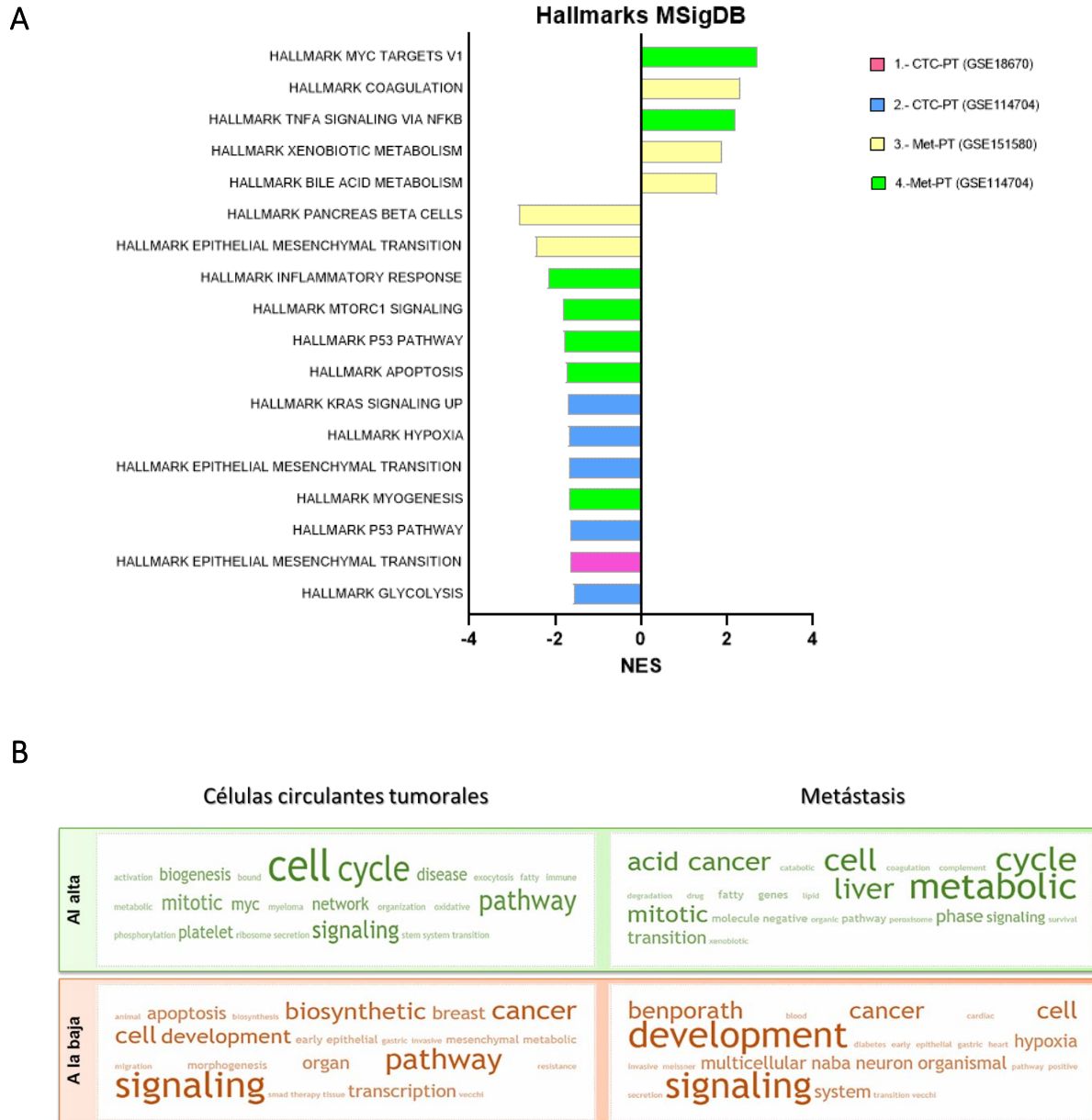


Figura 7. Análisis de enriquecimiento de sets de genes. Mediante el algoritmo de GSEA se identificaron los procesos enriquecidos en los genes diferencialmente expresados en cada uno de los estudios analizados comparando células circulantes tumorales contra tumor primario (CTC-PT) o metástasis hepática contra tumor primario (Met-PT). **A)** Puntajes de enriquecimiento normalizados de los principales procesos biológicos del conjunto de datos de Hallmark MSigDB, enriquecidos al alza y a la baja. **B)** Nube de palabras agrupando los términos de GO y MSigDB más frecuentemente enriquecidos en los 4 conjuntos de datos para las muestras de células circulantes tumorales o para las muestras de metástasis.

Genes Diferencialmente Expresados comunes entre experimentos

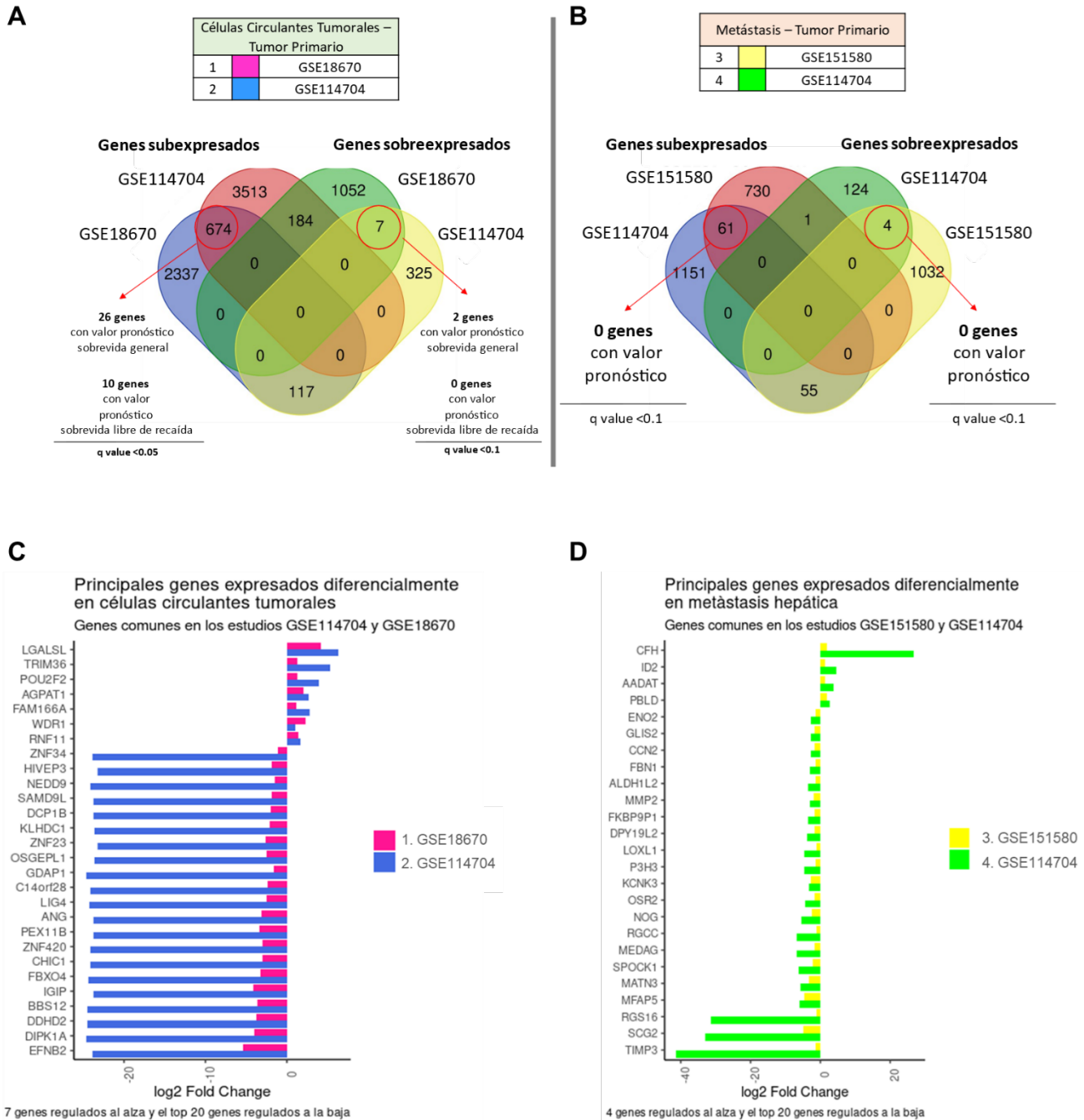
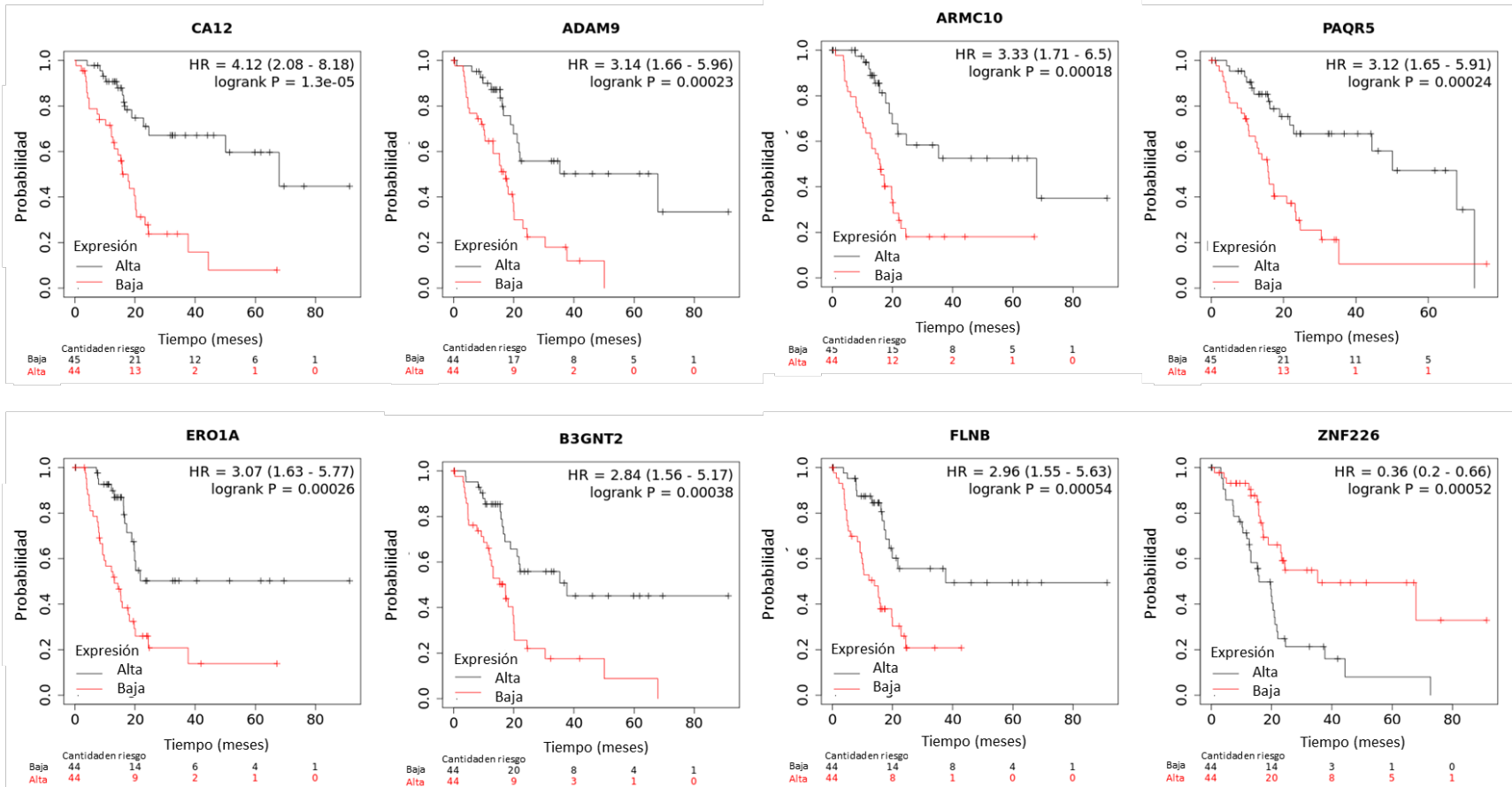


Figura 8. Comparación de los genes diferencialmente expresados compartidos entre experimentos. Mediante diagramas de Venn-Euler se compararon los conjuntos de genes comunes entre los experimentos de expresión diferencial de genes en células circulantes tumorales (**A**) y en metástasis (**B**). De los genes comunes entre experimentos se indica cuántos de ellos se relacionan con la supervivencia general o la supervivencia libre de recidiva (TCGA-PanCancer). Valores de cambio de los principales genes diferencialmente expresados en células circulantes tumorales, comunes entre los estudios GSE114704 y GSE18670 (**C**), y de los principales genes diferencialmente expresados en metástasis hepáticas, comunes entre los estudios GSE151580 y GSE114704 (**D**).

Sobrevida general



Sobrevida libre de reincidencia

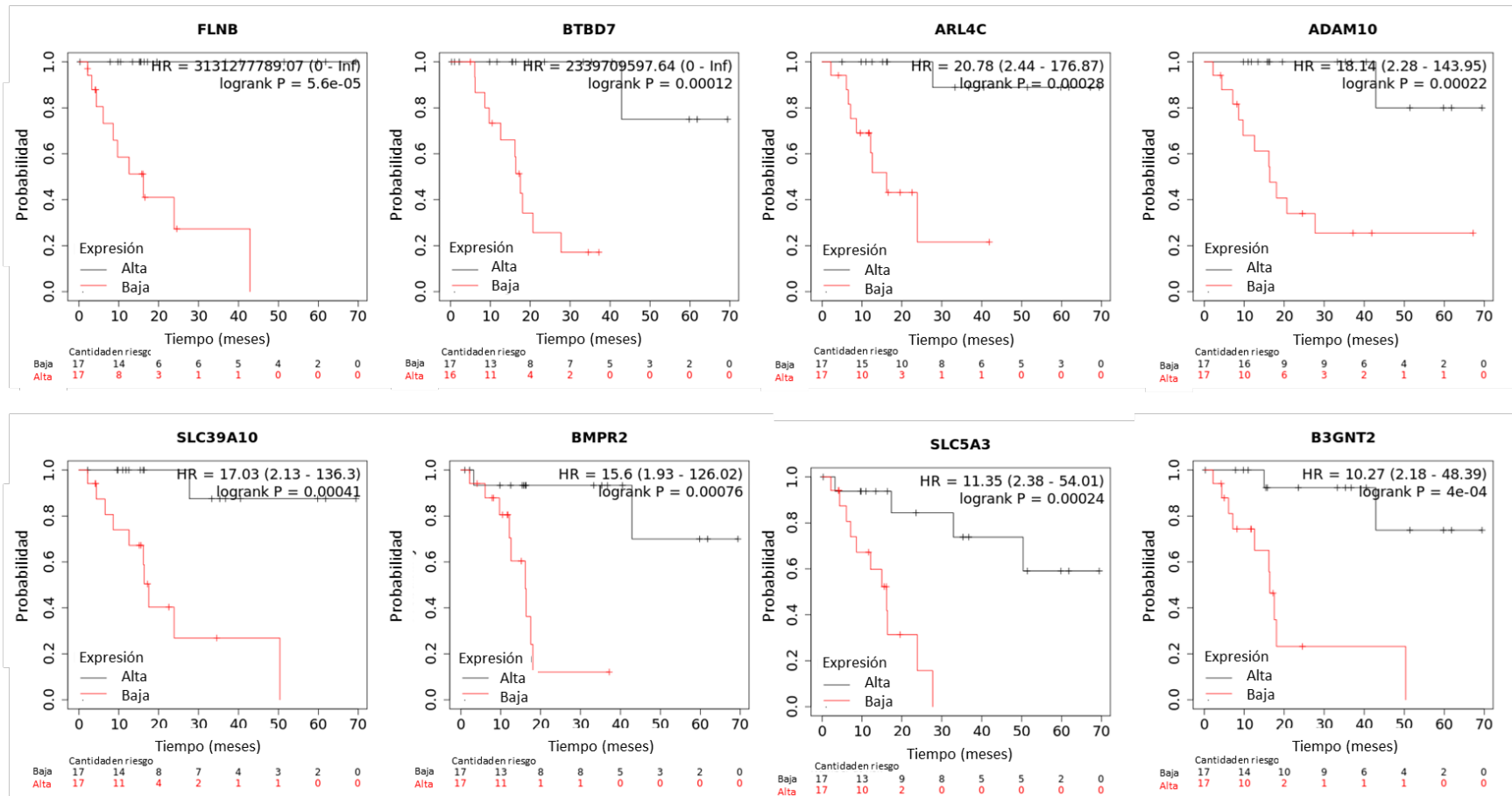


Figura 9. Principales genes diferencialmente expresados en CCT con valor pronóstico en cáncer de páncreas. Las gráficas de Kaplan-Meier muestran la probabilidad de supervivencia con respecto al tiempo en meses, comparando el cuartil de la cohorte con mayores niveles de expresión de cada gen contra el cuartil con expresión más baja. Se muestran los valores de Hazard Ratio (HR) y valor P de significancia estadística para los principales 8 genes con menor *q* value dentro del perfil de 34 genes identificados con valor pronóstico.

Tabla 2. Genes asociados con la sobrevida general (TCGA Pan-Cancer)

Gen	Hazard Ratio	q value	Regulación en CCT
CA12	4.12	0.00602967	DOWN
ARMC10	3.33	0.02319104	DOWN
ADAM9	3.14	0.02319104	DOWN
PAQR5	3.12	0.02319104	DOWN
ERO1A	3.07	0.02782925	DOWN
B3GNT2	3.07	0.0289888	DOWN
NCEH1	3.04	0.03905859	DOWN
FLNB	2.96	0.0289888	DOWN
SAMD9L	2.72	0.03905859	DOWN
ADAM10	2.7	0.03905859	DOWN
SLC44A1	2.7	0.03905859	DOWN
OSMR	2.66	0.03905859	DOWN
DDIT4	2.64	0.03905859	DOWN
PATJ	2.63	0.04033224	DOWN
ITGAV	2.53	0.03905859	DOWN
ASPH	2.52	0.04033224	DOWN
SSR3	2.5	0.04033224	DOWN
ZW10	2.47	0.04994993	DOWN
SLC5A3	2.45	0.04831466	DOWN
AGPAT1	0.45	0.07792189	UP
FAM120B	0.4	0.04033224	DOWN
ZNF419	0.39	0.04994993	DOWN
ZBTB4	0.38	0.03905859	DOWN
CD81	0.37	0.03905859	DOWN
ZNF226	0.36	0.0289888	DOWN
SMYD4	0.36	0.03905859	DOWN
FAM166A	0.36	0.06687648	UP
ZNF222	0.33	0.03905859	DOWN

Tabla 3. Genes asociados con la sobrevida libre de reincidencia (TCGA Pan-Cancer)

Gen	Hazard Ratio	q value	Regulación en CCT
FLNB	3131277789	0.02501623	DOWN
BTBD7	2339709598	0.02501623	DOWN
ARL4C	20.78	0.02501623	DOWN
ADAM10	18.14	0.02501623	DOWN
SLC39A10	17.03	0.02501623	DOWN
BMPR2	15.6	0.04502921	DOWN
SLC5A3	11.35	0.02501623	DOWN
B3GNT2	10.27	0.02501623	DOWN
DCBLD1	8.55	0.02501623	DOWN
LETMD1	0.06	0.02501623	DOWN

Dentro de los genes compartidos en células circulantes tumorales se identificaron 26 genes regulados a la baja y 2 genes regulados al alza, que mostraron una relación significativa (q -value < 0.05) con la sobrevida de los pacientes. Adicionalmente, 10 genes regulados a la baja mostraron una relación significativa con la sobrevida libre de reincidencia. En total se identificaron 34 genes que se asocian fuertemente con la sobrevida de los pacientes, lo cual los convierte en candidatos como genes marcadores de pronóstico ([tablas 2 y 3](#)).

En el caso de los genes comunes en estudios de metástasis hepática se siguió el mismo procedimiento para identificar genes con valor pronóstico asociado a la sobrevida de los pacientes. Sin embargo, en este caso no fue posible identificar genes cuyo q value fuera estadísticamente significativo. Es por este motivo, así como por el reducido número de genes comunes en metástasis hepáticas, que decidimos concentrarnos en el análisis de los datos provenientes únicamente de células circulantes tumorales.

Como se observa en la [figura 9](#), en la cual se ilustran las curvas de sobrevivencia asociada a la expresión de los genes con mayor cociente de riesgo (HR), pudimos hallar varios genes cuya expresión se relaciona estrechamente con la sobrevida general de los pacientes, y en la mayoría de los casos la expresión de estos genes representa un factor de pronóstico desfavorable.

En cuanto a los genes cuya expresión se asocia con la sobrevida libre de reincidencia, encontramos que estos presentan valores de Hazard Ratio muy grandes, lo cual indica que tienen un enorme valor pronóstico. Particularmente destacan los genes *BTBD7* y *FLNB*, pues sus HR son los más grandes de todos y al inspeccionar los gráficos de Kaplan-Meier se pone de manifiesto el pronóstico desfavorable asociado con la alta expresión de estos genes.

La fuerte asociación entre el pronóstico de la enfermedad con la expresión de este perfil de 34 genes es un indicio clave del posible papel biológico que desempeñan estos genes en el desarrollo del cáncer de páncreas.

4.4 El perfil de expresión transcripcional de células circulantes tumorales se asocia con variables clínico-patológicas del cáncer de páncreas

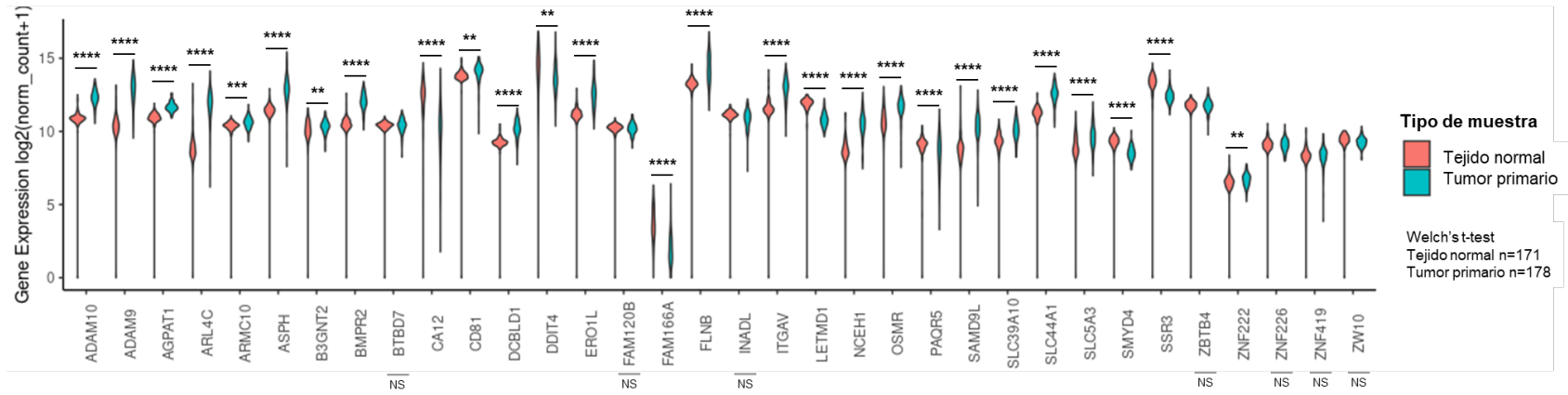
A partir de datos del proyecto Genotype-Tissue Expression (GTEx), obtuvimos los valores de expresión en tejido pancreático sano del perfil de 34 genes que identificamos y los comparamos con la expresión de estos mismos genes en muestras de tumores pancreáticos (TCGA Pan-Cancer). De estos 34 genes, 27 demostraron estar expresados diferencialmente entre tejido pancreático sano y tejido pancreático tumoral (Welch's test, $p < 0.05$) ([Figura 10-A](#)).

Para tratar de profundizar en el entendimiento de los genes comunes en los diferentes estudios, decidimos explorar la relación de la expresión de este perfil de 34 genes con diferentes variables clínicas. Para tal efecto utilizamos los datos clínicos y de expresión disponibles en la cohorte de adenocarcinoma ductal pancreático del TCGA Pan-Cancer. Comparamos las diferencias en el nivel de expresión de este perfil de genes entre muestras de grado histopatológico bajo y alto, clasificación T patológica temprana y avanzada, presencia de nódulos metastásicos, presencia de enfermedad residual, y respuesta completa al tratamiento o progresión de la enfermedad ([figura 10](#)).

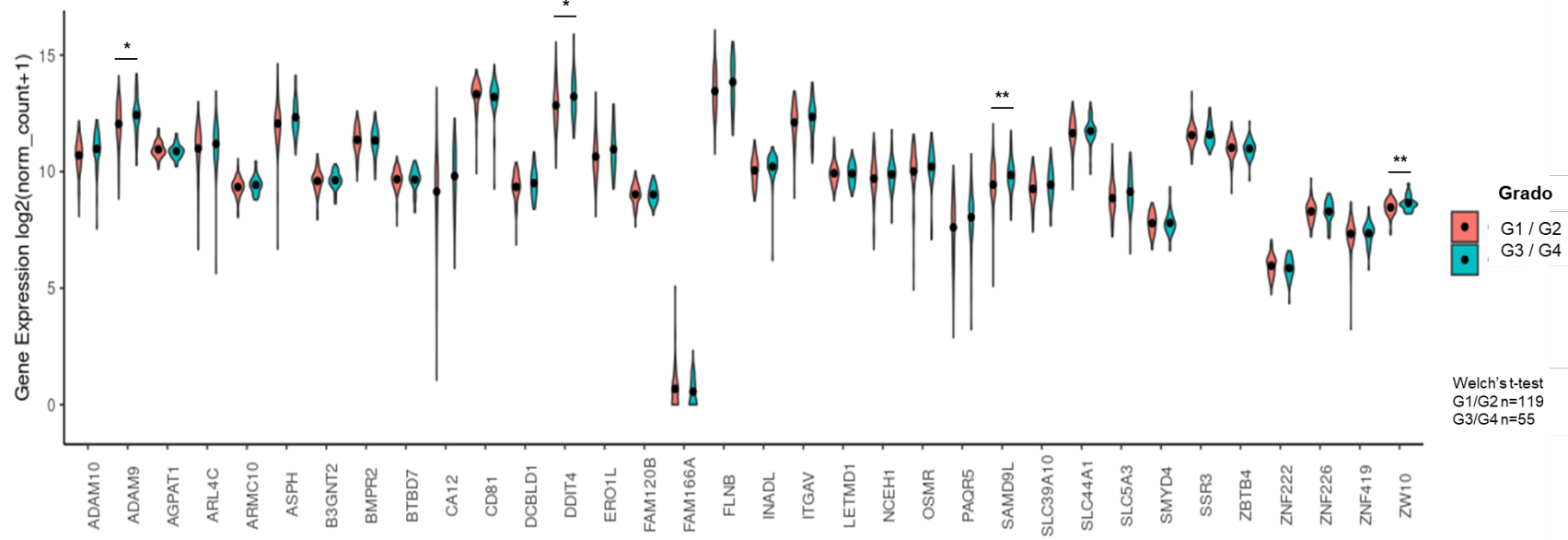
En cada uno de los casos se encontraron genes cuya expresión mostró diferencias asociadas a las distintas variables clínicas estudiadas: 4 genes mostraron relación con el grado de diferenciación histológica, 19 genes se relacionaron con la clasificación T patológica, 13 con la invasión de nódulos linfáticos, 15 con la presencia de enfermedad residual, y 9 con la respuesta completa al tratamiento. Estos resultados indican que este perfil de genes correlaciona significativamente tanto con las variables clínicas como con el pronóstico de la enfermedad y por lo tanto podrían ser genes de relevancia clínica y biológica para el estudio del cáncer de páncreas.

A**Expresión génica en páncreas normal y tumoral**

Cohorte: TCGA GTEx

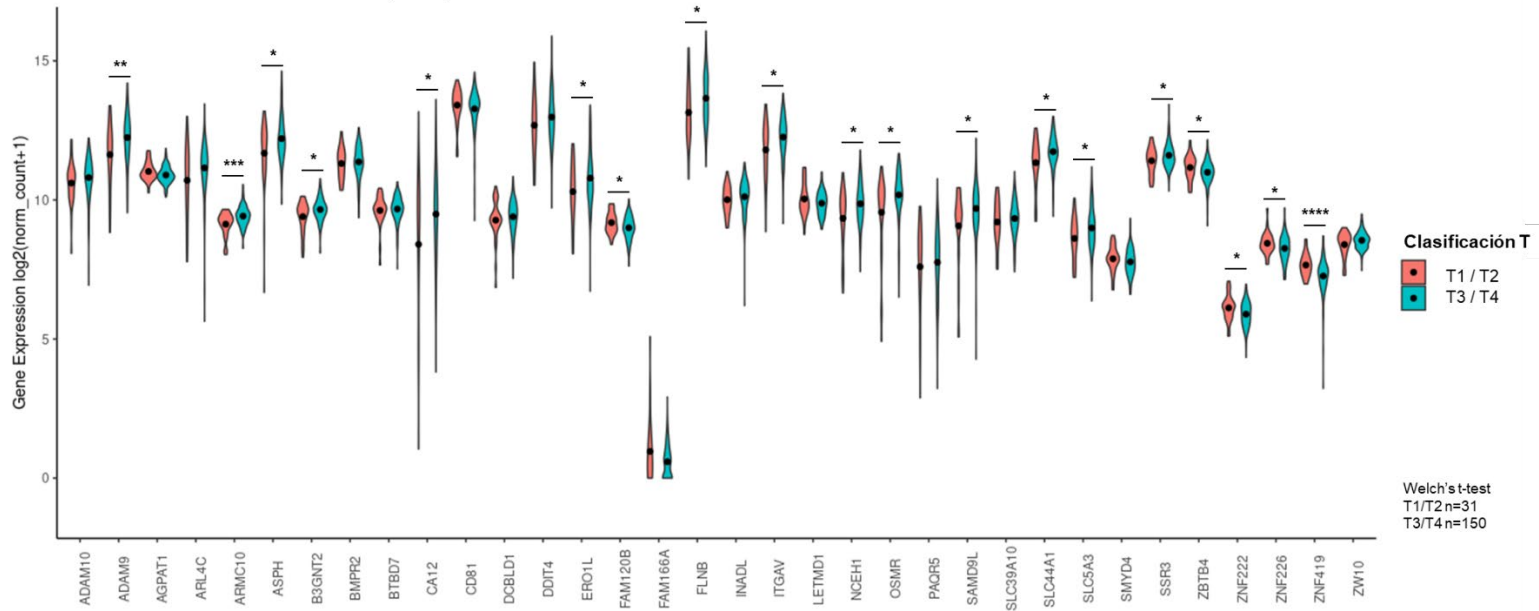
**B****Grado patológico**

Cohorte: TCGA – Pan-Cancer (pancreatic cancer)

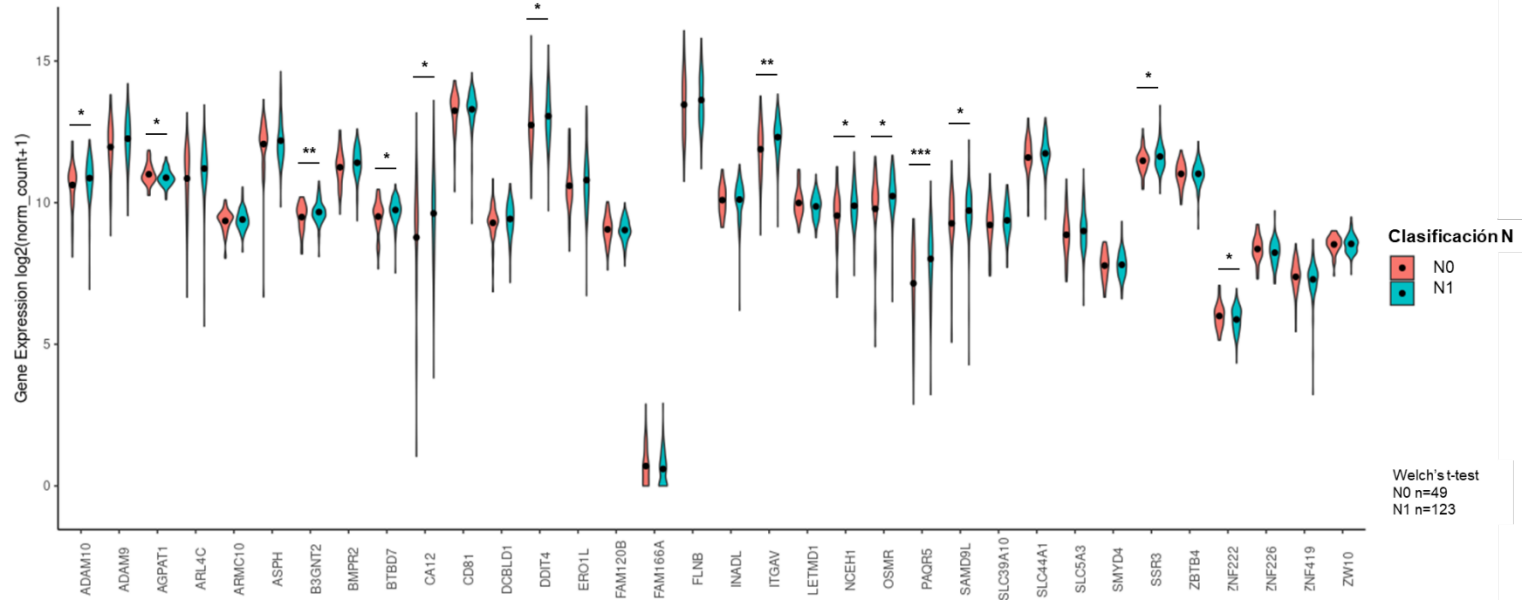


C

Clasificación T patológica
Cohorte: TCGA – Pancreatic Cancer (PAAD)

**D**

Clasificación N patológica
Cohorte: TCGA – Pancreatic Cancer (PAAD)



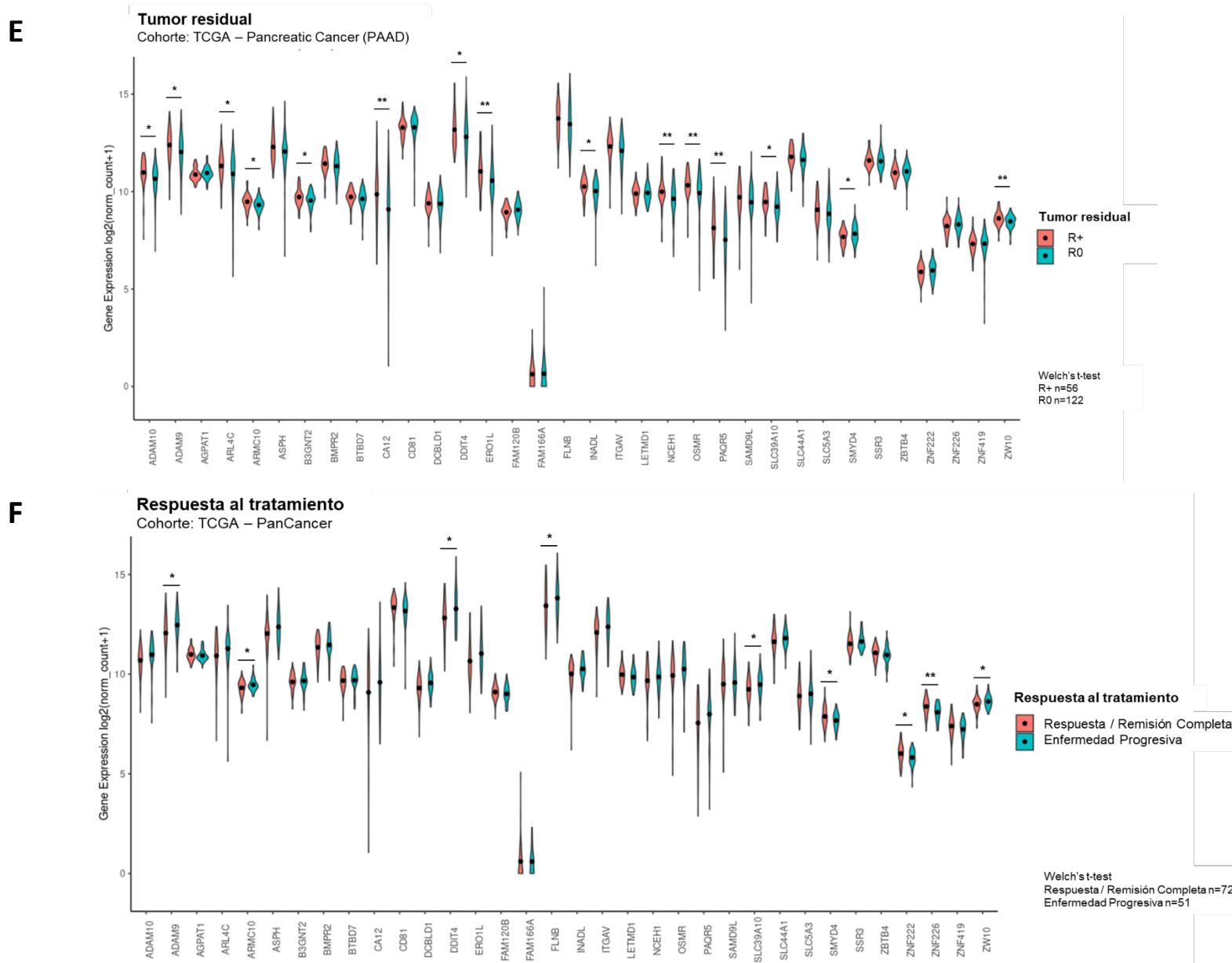


Figura 10. Comparación de los niveles de expresión del perfil de 34 genes en diferentes condiciones patológicas. Mediante el uso de bases de datos se comparó el nivel de expresión de los genes en muestras de páncreas sano contra muestras de tejido tumoral (A). También se compararon variables como el grado tumoral (B), la clasificación T y N patológicas (C-D), así como la presencia de tumor residual (E) y la respuesta al tratamiento (F) (p value: *<0.05, **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001, NS=No Significativo).

4.5 Los genes sobreexpresados en CCT forman un cluster de correlación

Con el propósito de identificar genes clave que pudieran desempeñar un papel relevante en la biología de las células circulantes tumorales, nos enfocamos en analizar los 7 genes sobreexpresados en los experimentos de células circulantes tumorales ([figura 8-C](#)). A través del explorador de datos UCSC Xena Browser accedimos a los datos de expresión génica de GTEx y TCGA Pan-Cancer. Con ellos pudimos comparar la expresión entre tejido pancreático normal y cáncer de páncreas de estos 7 genes ([figura 11](#)). Identificamos que los genes AGPAT1, LGALS1, POU2F2, RNF11, TRIM36 y WDR1 se encuentran sobreexpresados en muestras de cáncer de páncreas ($p < 0.05$, Welch's t-test) ([figura 11-B](#)).

Para determinar si existían grupos de genes cuya expresión pudiera estar correlacionada, particularmente con los 7 genes sobreexpresados en CCT, realizamos una matriz de correlación con los 681 genes identificados en común en los experimentos de células circulantes tumorales. Como era de esperarse, pudimos identificar un gran clúster de genes correlacionados conformado por la mayoría de los genes subexpresados en CCT con respecto al tumor primario ([figura 11-C](#)).

Cuando nos enfocamos en el pequeño grupo de los genes sobreexpresados en CCT, encontramos que la expresión de estos correlaciona estrechamente entre ellos y en conjunto forman un clúster de correlación. Fue interesante el hallazgo del gen CFLAR dentro de este clúster. CFLAR es un gen que codifica a la proteína inhibidora de la apoptosis c-FLIP, y el hecho de encontrarlo dentro de este clúster indica que su expresión se correlaciona significativamente con la de los genes que previamente habíamos identificado como sobreexpresados en CCT.

4.6 Los genes del clúster son esenciales en cáncer de páncreas, se asocian con la sobrevida libre de reincidencia y correlacionan con marcadores de transición epitelial-mesenquimal.

Para profundizar en el entendimiento de los genes que componen este clúster e indagar sobre su posible contribución en los procesos de diseminación metastásica, analizamos la expresión de estos genes en la cohorte de cáncer de páncreas del TCGA. Identificamos que la alta expresión de los genes CFLAR y WDR1 se relaciona con un pronóstico desfavorable en cáncer de páncreas asociado a la reincidencia tumoral ([figura 12-A, B](#)), mientras que la expresión del gen FAM166A se relaciona con una mayor sobrevida libre de reincidencia ([figura 12-C](#)). El resto de los genes miembros del clúster no mostraron tener relación alguna con la sobrevida de los pacientes.

Adicionalmente, observamos que la expresión del gen WDR1 es ligeramente mayor en los casos en los cuales la enfermedad tumoral progresa, en comparación con los casos que presentan una respuesta completa al tratamiento antineoplásico ([figura 12-D](#)). WDR1 es un gen que

codifica una proteína que regula el desensamble del citoesqueleto de actina, así como la migración e invasión en células cancerosas(H. Li et al., 2020).

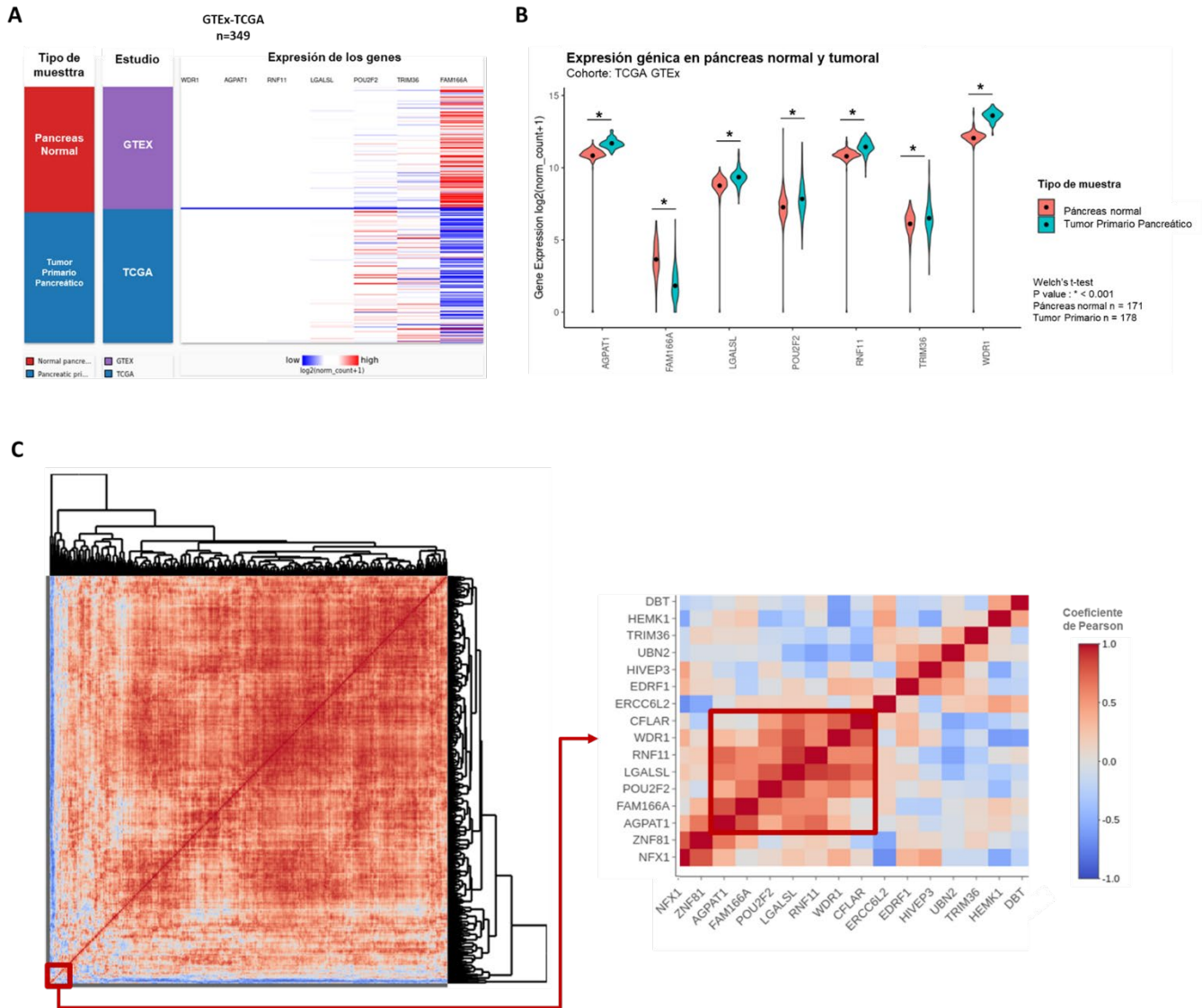


Figura 11. Los genes sobreexpresados en CCT se forman un clúster de coexpresión. Con el uso de bases de datos públicas se analizó la expresión de los 7 genes sobreexpresados en células circulantes tumorales. **A)** Mapa de calor de la expresión de los 7 genes en muestras de tumor primario de cáncer de páncreas (Xena browser). **B)** Se comparó la expresión de estos 7 genes entre muestras normales de páncreas y muestras de cáncer de páncreas. **C)** Mapa de calor agrupado jerárquicamente que representa los valores de correlación de los 681 genes diferencialmente expresados en los dos estudios de CCT. A la derecha se observa el clúster formado por el pequeño grupo de genes sobreexpresados en CCT y junto con ellos se agrupa el gen CFLAR.

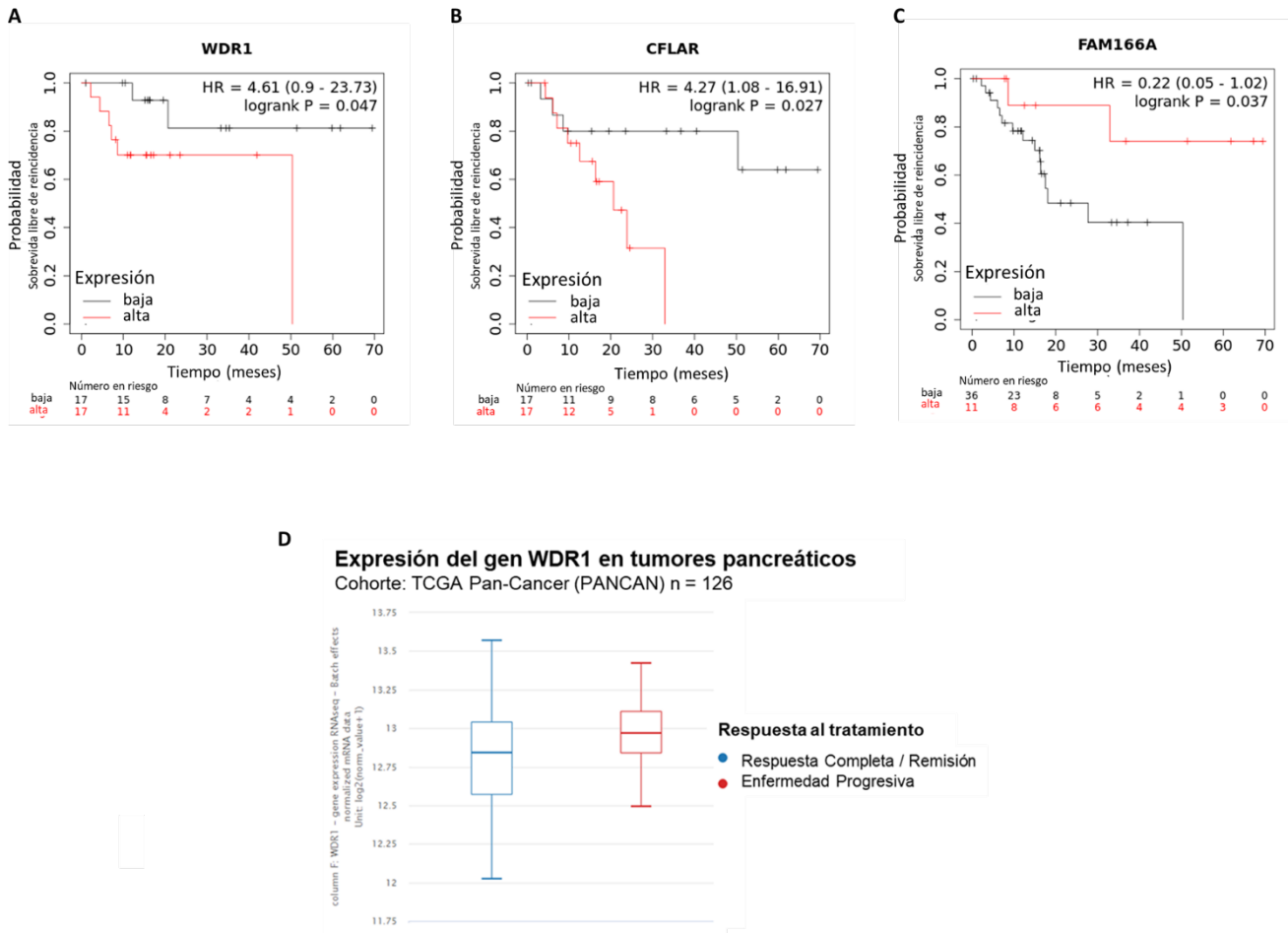


Figura 12. los genes correlacionados WDR1, CFLAR y FAM166A tienen valor pronóstico. Gráficas de Kaplan-Meier que representan la probabilidad de sobrevida libre de recidencia para los cuartiles con alta y baja expresión de los genes **(A)** WDR1, **(B)** CFLAR y **(C)** FAM166A. **(D)** Expresión del gen WDR1 en tumores con respuesta completa al tratamiento y en tumores con enfermedad progresiva.

Para estudiar la posible relevancia funcional en cáncer de páncreas de los genes que conforman al clúster de genes sobreexpresados en CCT, realizamos una búsqueda en la base de datos del proyecto Achilles-DepMap para identificar el nivel de esencialidad biológica de este grupo de genes ([figura 13](#)). Esta base de datos reúne información de las vulnerabilidades genéticas de múltiples líneas celulares y recopila experimentos de silenciamiento de genes mediante RNAi o knockout génico mediante CRISPR y el efecto que tiene la pérdida de expresión de un gen en la supervivencia de las líneas celulares. Este efecto se mide con el puntaje de efecto génico. A menor puntaje el efecto de la pérdida del gen es mayor. Los puntajes cercanos a -1, lo cual indica que el gen es esencial para la línea celular y que este le confiere ventajas para supervivencia celular.

A**WDR1**

Project Achilles - DepMap

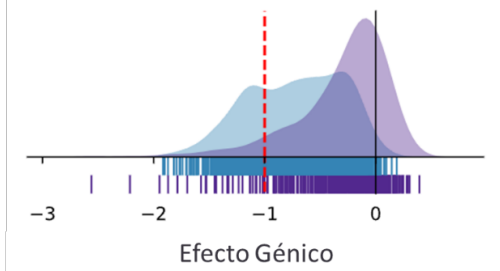
Líneas celulares dependientes

CRISPR (DepMap 21Q3 Public+Score, Chronos): 742/1032

ESENCIAL COMÚN

RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2): 75/386

FUERTEMENTE SELECTIVO

**B****CFLAR**

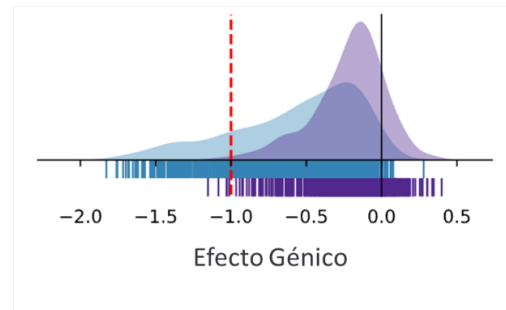
Project Achilles - DepMap

Líneas celulares dependientes

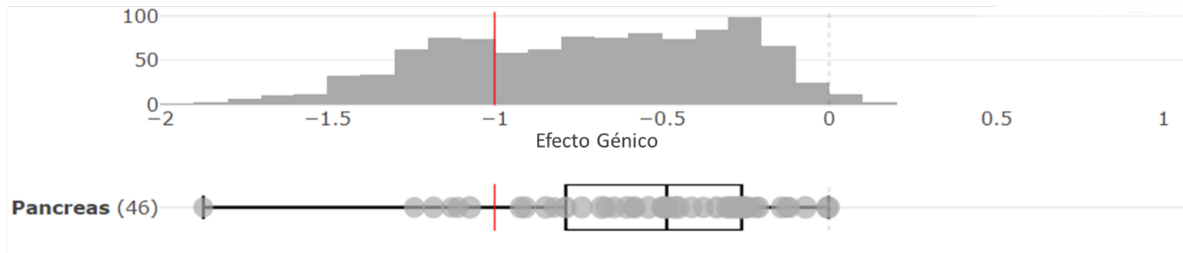
CRISPR (DepMap 21Q3 Public+Score, Chronos): 583/1032

FUERTEMENTE SELECTIVO

RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2): 64/708

**C****WDR1**

CRISPR (DepMap 21Q3 Public+Score, Chronos)

**D****CFLAR**

CRISPR (DepMap 21Q3 Public+Score, Chronos)

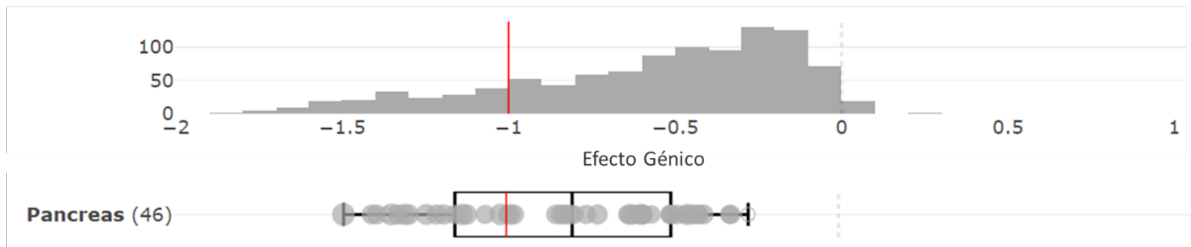


Figura 13. los genes WDR1 y CFLAR son esenciales en líneas celulares de CaPa. Gráficas de esencialidad de los genes **(A)** WDR1 y **(B)** CFLAR en todas las líneas celulares de la base de datos Achilles – DepMap. Los puntajes por debajo del umbral de -1 representan un efecto de perturbación génica alta debido a la delección (CRISPR) o inhibición (RNAi) del gen. Se ilustra también en gráficos de cajas y bigotes el efecto que tiene la delección por CRISPR de **(C)** WDR1 y **(D)** CFLAR en 46 líneas celulares de cáncer de páncreas. El histograma en gris muestra la distribución del puntaje de efecto génico en el resto de las líneas celulares que componen la base de datos.

Como resultado de analizar los genes que conforman nuestro clúster de genes sobreexpresados en CCT, identificamos que los genes WDR1 y CFLAR poseen valores elevados de esencialidad. De acuerdo con la perturbación génica causada por la delección de WDR1, este es un gen esencial común en la mayoría de las líneas celulares de la base de datos, mientras que CFLAR tiene un efecto selectivo en determinados tipos de líneas celulares. En líneas celulares de cáncer de páncreas ambos genes son esenciales pues tienen puntajes de efecto de perturbación muy cercanos a -1 o incluso por debajo de este. Esta información sugiere que WDR1 y CFLAR podrían desempeñar un papel relevante que le confiere una ventaja funcional a las células circulantes tumorales.

Finalmente, analizamos al gen POU2F2 (OCT2), el cual codifica a un factor de transcripción maestro. Utilizando datos de RNA-seq de tumores primarios (TCGA Pan-Cancer), comparamos la expresión de POU2F2 con respecto a la expresión de genes asociados con los fenotipo epitelial y mesenquimal (figura 14). Los datos muestran una correlación negativa de la expresión de POU2F2 con los genes de tipo epitelial, mientras que correlaciona de manera positiva con los genes de tipo mesenquimal. Dado que POU2F2 se sobreexpresa en células circulantes tumorales, estos datos sugieren que el fenómeno de transición epitelial-mesenquimal podría estar activo al menos de forma parcial en células circulantes tumorales.

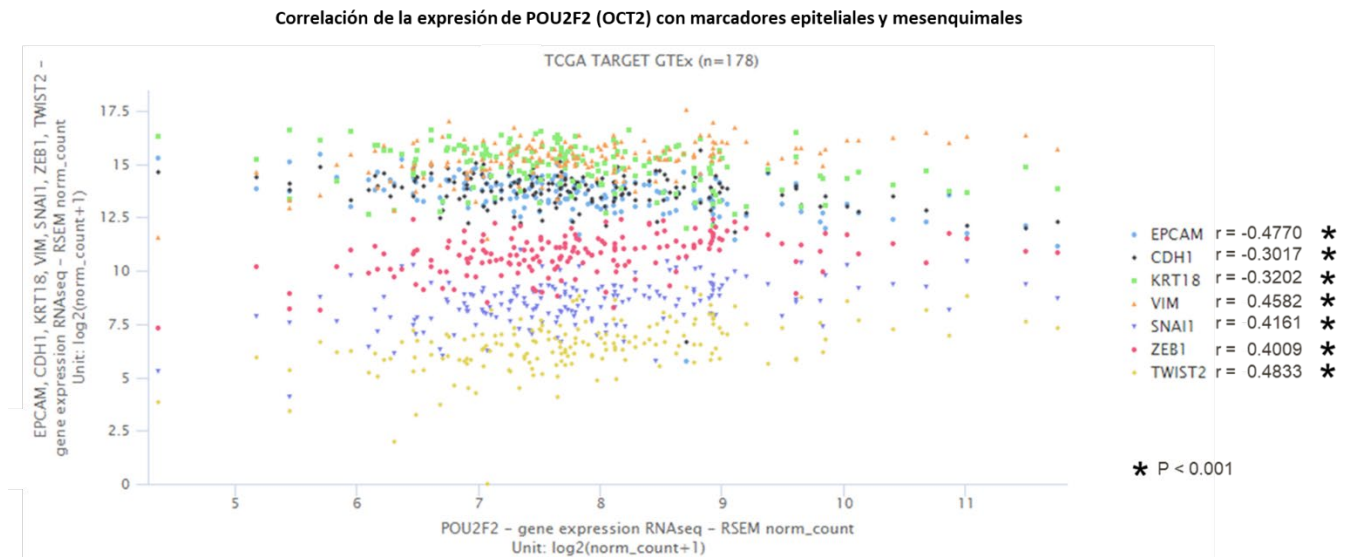


Figura 14. La expresión de POU2F2 correlaciona positivamente con genes mesenquimales y negativamente con genes epiteliales. Relación entre la expresión del gen POU2F2 y genes asociados a los fenotipos epitelial (EPCAM, CDH2, KRT18) y mesenquimal (VIM, ACTA2, SNAI1, ZEB1) en muestras de cáncer de páncreas.

Capítulo 5

Discusión

El cáncer de páncreas es una enfermedad letal con una rápida diseminación de las células neoplásicas lo cual conlleva al desarrollo de metástasis y con esto a la muerte. Mientras que se ha estudiado a profundidad el proceso de iniciación tumoral, el fenómeno de dispersión metastásica no ha sido descrito con suficiente detalle y al ser las células circulantes tumorales los agentes principales de la diseminación tumoral, estas células se convirtieron en el objeto de estudio de este proyecto de investigación.

En este trabajo investigamos los perfiles moleculares de muestras de tumores primarios, células circulantes tumorales y metástasis hepáticas de adenocarcinomas ductales pancreáticos. Nos enfocamos en identificar las diferencias a nivel de transcriptoma entre células de cada una de estas tres formas del cáncer de páncreas que representan momentos diferentes de la progresión de la cascada de la metástasis. Los hallazgos de este trabajo proporcionan conocimiento nuevo y auténtico sobre los mecanismos moleculares de la dispersión metastásica en cáncer de páncreas, los cuales podrían tener implicaciones considerables en el pronóstico y monitoreo de precisión de pacientes con cáncer de páncreas.

Una de las virtudes de este trabajo es que conjunta distintas fuentes de datos de expresión provenientes de grupos de investigación independientes. Esto nos ha permitido reunir un mayor número de datos y representar de mejor forma la heterogeneidad de las CCT y de las metástasis. De este modo hemos logrado identificar genes y procesos que se encuentran consistentemente afectados en varios estudios diferentes. Así mismo, el enfoque que hemos adoptado de ciencia conducida por datos provenientes de repositorios públicos permite condensar información de varias fuentes y producir hallazgos que pueden ser fácilmente reproducibles y comparables.

Uno de estos hallazgos ha sido la identificación de una mayoría de genes diferencialmente expresados que se subexpresan en CCT con respecto al tumor primario pancreático, lo cual indica una disminución de la actividad transcripcional de las CCT. Este fenómeno concuerda con lo observado en CCT de cáncer de mama con capacidad metastásica (Boral et al., 2017; Lang et al., 2018) las cuales muestran menor actividad transcripcional con respecto a tumores mamarios primarios. Sin embargo, en algunos otros reportes de cáncer de próstata, cáncer hepático o en modelos murinos de cáncer de páncreas no se observa esta sobrerrepresentación de genes subexpresados en CCT (Miyamoto et al., 2015; Ting et al., 2014). Estas diferencias podrían ser debidas a la heterogeneidad intratumoral y a la heterogeneidad de las células circulantes tumorales en los diferentes tipos de cáncer y en distintos momentos de la enfermedad.

La transición epitelial-mesenquimal reversa como rasgo de las CCT de cáncer de páncreas.

El proceso de dispersión metastásica es un fenómeno complejo que involucra múltiples etapas desde la invasión local, la intravasación, la supervivencia en la circulación, la extravasación y la colonización de tejidos distantes. De acuerdo con nuestros resultados, podemos pensar que las células tumorales tienen un fenotipo plástico que les permite intercambiar entre procesos distintos de acuerdo con las necesidades que encuentran en cada paso de la cascada metastásica.

Identificamos que en cuanto a procesos biológicos de Gene Ontology, para las células del tumor primario toma gran relevancia la capacidad de respuesta a un ambiente hipóxico, la remodelación de la matriz extracelular y una transición hacia un fenotipo mesenquimal que favorezca la migración y la invasión de tejidos. Mientras tanto, para las células que ya han colonizado el hígado pareciera ser más relevante activar procesos que permitan sobrevivir en el ambiente colonizado, tales como el metabolismo de biomoléculas abundantes en el hígado.

Por otra parte, el enriquecimiento de los fenómenos de ciclo celular, disminución de la transcripción y de la apoptosis en CCT parecieran indicar un cambio de prioridades funcionales de las células cancerosas, pasando de priorizar la invasión celular a otorgarle mayor relevancia a la supervivencia en la circulación. Tal como lo muestran los análisis de GSEA que realizamos, las CCT tienen un enriquecimiento negativo del proceso de transición epitelial-mesenquimal, lo cual es un indicio de que estas células tienden a una reversión parcial hacia el fenotipo epitelial. Este resultado es congruente con lo reportado por otros investigadores quienes han demostrado que en cáncer de páncreas las células metastásicas muestran una transición epitelial-mesenquimal reversa, con un marcado incremento en la expresión de E-cadherina y disminución de N-cadherina (J. Yang et al., 2021). Cabe destacar también que ha sido reportado que la sobreexpresión de E-cadherina promueve la supervivencia de las células tumorales en circulación y la diseminación tumoral en órganos distantes (Padmanaban et al., 2019).

Estas observaciones son perfectamente compatibles con el modelo de diseminación metastásica que propone que las poblaciones de células circulantes tumorales pueden tener distintos grados de diferenciación epitelial-mesenquimal (Yadavalli et al., 2017). En tumores como el cáncer de mama se han identificado subpoblaciones heterogéneas de CCT con fenotipos epiteliales o mesenquimales con capacidades celulares diferentes. Mientras que las CCT mesenquimales muestran una mayor interacción con células de sistema inmune, lo cual disminuye la vigilancia inmunológica, las CCT con fenotipo de tipo epitelial muestran un enriquecimiento de vías de proliferación y de señales de interacción con megacariocitos y de activación de plaquetas (Brechtbuhl et al., 2020), hallazgo que resulta interesante debido al efecto prometastásico que tienen las plaquetas en las células cancerosas (T. Li et al., 2021; Lucotti & Muschel, 2020).

A partir de esta información y con base en nuestros análisis, conjeturamos que el enriquecimiento de la transición epitelial-mesenquimal en CCT podría incrementar su capacidad de intravasación, mientras que el viraje hacia una transición mesenquimal-epitelial en las CCT podría contribuir a la supervivencia y diseminación de estas células.

La utilidad del enfoque de ciencia conducida por datos y el valor pronóstico del perfil de expresión de las células circulantes tumorales

Nosotros consideramos que los análisis bioinformáticos y de ciencia de datos son una herramienta invaluable para la identificación de vías o procesos que favorecen la supervivencia de las CCT y que además pueden ser muy útiles para acotar moléculas o factores clínicamente significativos que pudieran tener un valor diagnóstico, pronóstico o terapéutico.

Con respecto a los estudios previamente publicados de manera independiente a partir de los cuales obtuvimos los sets de datos de expresión, nosotros hemos logrado integrarlos para identificar transcritos desregulados comunes y evaluar su asociación con variables clínicas y patológicas del cáncer de páncreas.

Previamente se habían identificado algunos genes sobreexpresados en CCT, cuyo nivel de expresión podía predecir la supervivencia de los pacientes sometidos a resección tumoral quirúrgica en cáncer de páncreas (Sergeant et al., 2012). Gracias a que logramos conjuntar un mayor número de datos nosotros logramos ampliar el número de genes identificados en CCT que poseen valores de pronóstico altamente significativos para predecir la supervivencia general y la sobrevida libre de reincidencia en los pacientes, lo cual fue posible también por el buen tamaño muestral de la cohorte de cáncer de páncreas de The Cancer Genome Atlas.

Entre los genes con valor pronóstico asociado a la sobrevida libre de reincidencia, el gen de la anhidrasa carbónica 12 (CA12) fue aquel con el cociente de riesgo más grande y el valor de q más pequeño. Las anhidrasas carbónicas se involucran en la regulación intracelular y extracelular del pH. Particularmente el gen CA12 ha mostrado ser de valor pronóstico en cáncer de mama y cáncer de páncreas (Du et al., 2021; Y. Li et al., 2019), además de que su expresión es modulada como consecuencia de la transición epitelial-mesenquimal (Vergara et al., 2020). Experimentalmente se ha mostrado que la inhibición de CA12 favorece la proliferación y disminuye la apoptosis de líneas celulares de cáncer de páncreas (Du et al., 2021) y coincide que en CCT hemos identificado este gen subexpresado con relación al tumor primario.

Otros genes asociados a la sobrevida general cuentan con evidencia previa de su papel en el desarrollo neoplásico. Por ejemplo el gen de la metaloproteasa ADAM9 es conocido por su papel en la invasión tumoral y en la intravasación en adenocarcinomas ductales pancreáticos (Grützmann et al., 2004; Haoyuan & Yanshu, 2020; Oria et al., 2019). Por otra parte, ARMC10, un regulador de la fusión y fisión mitocondrial, también se asocia a la sobrevida en pacientes con glioblastoma (Cai et al., 2020; Z. Chen et al., 2019), mientras que el gen del receptor de progesterona PAQR5 es un gen que se sobreexpresa en tumores de ovario y endometrio (Charles et al., 2010; Sinreih et al., 2018). Adicionalmente, el gen ERO1L tiene un alto nivel de expresión en tumores primarios de páncreas, pulmón, riñón y en glioma (Shergalis et al., 2020). Además, es un marcador de hipoxia que se asocia con la actividad glicolítica y la capacidad de invasión de las células neoplásicas (J. Zhang et al., 2020; Zilli et al., 2021).

En cuanto a los genes relacionados con la sobrevida libre de reincidencia, hicimos algunos hallazgos interesantes debido a los valores de Hazard Ratio tan elevados de algunos de estos

genes. Destacan genes como FLNB, el cual suprime la formación de metástasis al regular negativamente la actividad de MMP-9 y la secreción de VEGF-A a través de la vía de MAPK/ERK (Bandaru et al., 2014). Además, es conocido que FLNB es capaz de favorecer la apoptosis (Ma et al., 2020) y un cambio en el splicing de este gen se relaciona con la transición epitelial-mesenquimal (J. Li et al., 2018).

Otro gen relevante es BTBD7, el cual ha sido reportado como promotor de la transición epitelial-mesenquimal y como regulador negativo de la expresión de E-cadherina en cáncer pulmonar (Fan et al., 2014; Luo et al., 2015) además de ser un factor crucial para la formación de metástasis de origen colorrectal (Grisard et al., 2019).

ARL4C es otro gen que identificamos con valor pronóstico en la supervivencia libre de recurrencia. Se ha descrito que este gen se expresa en niveles elevados en cánceres pulmonares, colorectales y en glioblastoma. La expresión de este gen promueve la migración, la proliferación y la formación de estructuras tubulares además de relacionarse con una menor supervivencia en los pacientes (Q. Chen et al., 2021; Fujii et al., 2015; Matsumoto et al., 2017). En cáncer de páncreas la expresión de ARL4C promueve la expresión de CTGF a través de la vía e YAP. Como consecuencia, la secreción de CTGF induce la activación de las células estelares pancreáticas, permitiendo la interacción de las células tumorales con el estroma pancreático lo cual favorece la proliferación, la farmacoresistencia y la troncalidad en las células neoplásicas (X. Chen et al., 2021).

Además de los genes mencionados, también identificamos otros con valores de Hazard Ratio bastante considerables, como el gen de la metaloproteasa ADAM10 (Cheng et al., 2021; Mueller et al., 2021; Padmanabhan, 2016; Sun et al., 2017) y el receptor de la proteína morfogenética de hueso BMP2 (Gomez-Puerto et al., 2019; Y. Wang et al., 2021) los cuales han sido investigados ampliamente por su papel promotor de la proliferación, invasión, migración y remodelación de la matriz extracelular.

El perfil de expresión de los genes coincide con indicadores clínicos de la enfermedad y podría ser de relevancia biológica

Además de ser útil como un primer indicio de la relevancia biológica de los transcritos identificados en la diseminación metastásica, el perfil de expresión conformado por estos podría tener una utilidad clínica al asociarse con varios indicadores de la enfermedad como lo son el tamaño tumoral (T), la presencia de nódulos linfáticos metastásicos (N), así como la respuesta al tratamiento antineoplásico y la presencia de enfermedad residual. La cuantificación de la expresión de estos transcritos podría ayudar a constituir un panel de genes predictivos del desarrollo y desenlace de la enfermedad. En el caso del cáncer de páncreas la cuantificación de la expresión de estos transcritos podría ser útil para estratificar a los pacientes e identificar a aquellos con mayor riesgo de presentar metástasis distantes.

Para identificar potenciales factores conductores de la metástasis en CCT no solo nos guiamos mediante el análisis de datos clínicos y de supervivencia provenientes de The Cancer Genome Atlas. Además, analizamos aquellos transcritos sobreexpresados en CCT con respecto al tumor

primario. Estos transcritos son particularmente atractivos porque podrían servir como marcadores de CCT.

Mediante un análisis de correlación de la expresión de estos genes encontramos que forman un clúster dentro del cual destaca la presencia de cuatro genes: FAM166A, WDR1, CFLAR y POU2F2. Los primeros tres se asocian de manera significativa con la supervivencia libre de recurrencia en pacientes con CaPa. Además, el gen WDR1 tiende a expresarse más en muestras de pacientes que no responden al tratamiento antitumoral.

WD repeat domain 1 (WDR1) es un gen asociado con la dinámica del citoesqueleto de actina que conduce la motilidad celular. En tumores mamarios, WDR1 se expresa más en aquellos de tipo basal y se asocia con una menor supervivencia de las pacientes, además de que la sobreexpresión de este gen inducida por STAT3 incrementa la migración en células MDA-MB-231 (D. Zhang et al., 2020). De igual forma en WDR1 promueve la proliferación y migración celular en cáncer pulmonar y en carcinoma hepatocelular (Zheng et al., 2018).

Recientemente en cáncer de páncreas se identificó mediante un análisis proteómico que WDR1 incrementa su expresión conforme progresan las etapas del adenocarcinoma. Además, se mostró que el silenciamiento de WDR1 suprime el crecimiento tumoral y disminuye drásticamente la formación de metástasis in vivo. A nivel molecular, el silenciamiento de WDR1 disminuye la actividad de la vía de Wnt/ β -Catenina, ya que WDR1 previene la degradación mediada por ubiquitinación de β -Catenina (H. Li et al., 2020).

CFLAR es un gen que codifica a la proteína c-FLIP. Esta proteína es un inhibidor de la apoptosis mediada por los receptores de muerte Fas, DR4, and DR5 y juega un papel clave en la supervivencia de las células malignas en varios tipos de cáncer como el carcinoma renal, colorectal o el cáncer de mama (Bagnoli et al., 2010; Luebke et al., 2019; Safa & Pollok, 2011; Wilson et al., 2007). Particularmente en el contexto de células circulantes tumorales de cáncer de mama, existe evidencia de que las CCT desarrollan resistencia a la apoptosis mediada por receptores de muerte y esto les permite sobrevivir en condiciones de baja adherencia (Twomey & Zhang, 2019). Posiblemente en el caso que hemos estudiado, las CCT pancreáticas podrían estar presentando un fenómeno similar de evasión de la apoptosis gracias a la sobreexpresión de CFLAR.

El gen POU2F2 codifica al factor de transcripción OCT2, cuya expresión ha sido asociada con la promoción de la metástasis en cáncer gástrico (S. M. Wang et al., 2016) y puede ser modulada por los miR-198 y miR-218, los cuales se subexpresan en cáncer pancreático y gástrico (Marin-Muller et al., 2013). Además, POU2F2 promueve la tumorigénesis, proliferación y motilidad de las células de cáncer pulmonar, lo cual sugiere que puede desempeñar un papel importante en la cascada de la metástasis.

Recientemente ha sido demostrado que POU2F2 conduce a un cambio metabólico hacia la glicólisis aeróbica y que promueve la progresión de glioblastoma. También se ha observado que POU2F2 promueve la migración en líneas celulares de cáncer cervical y que su expresión puede ser promovida indirectamente por el lnc-RNA ARAP1-AS1. Toda esta evidencia sugiere

que POU2F2 podría tener un papel funcional en la diseminación metastásica al estar sobreexpresado en CCT pancreáticas.

Capítulo 6

Conclusiones y perspectivas

Mediante el uso de bases de datos públicas pudimos recuperar datos de expresión de RNA-seq y microarreglos para analizar el transcriptoma de muestras de tumor primario, metástasis y células circulantes tumorales de cáncer de páncreas. Con estos análisis hemos identificado vías enriquecidas en células circulantes tumorales y metástasis hepáticas, siendo notorio que la vía de transición epitelial-mesenquimal se encuentra modulada en células circulantes tumorales.

También hemos identificado un conjunto de genes desregulados en células circulantes tumorales que son comunes a dos estudios independientes. Dentro de este conjunto, un perfil de 34 genes se relaciona de forma muy significativa con la probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer de páncreas y se asocian con varios indicadores clínico-patológicos de la enfermedad. Además, identificamos un clúster de coexpresión entre los genes sobreexpresados en células circulantes tumorales dentro del cual destacan WDR1, CFLAR y POU2F2. Tanto WDR1 como CFLAR se relacionan negativamente con la probabilidad de reincidencia tumoral y cuentan con evidencia experimental que señala que son genes esenciales en líneas celulares de cáncer de páncreas, por lo que su sobreexpresión podría conferir una ventaja funcional a las células circulantes tumorales. Por otro lado, la expresión de POU2F2 correlaciona con genes asociados al fenómeno de transición epitelial-mesenquimal. La información aquí presentada sugiere que estos genes pueden desempeñar una función relevante en la diseminación metastásica desempeñada por las células circulantes tumorales y pueden ser candidatos prometedores para posteriores ensayos funcionales en modelos de metástasis *in vitro* e *in vivo*.

Referencias Bibliográficas

- Amantini, C., Morelli, M. B., Nabissi, M., Piva, F., Marinelli, O., Maggi, F., Bianchi, F., Bittoni, A., Berardi, R., Giampieri, R., & Santoni, G. (2019). Expression Profiling of Circulating Tumor Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients: Biomarkers Predicting Overall Survival. *Frontiers in Oncology*, 9(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00874>
- Bacelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bäuerle, T., Wallwiener, M., Holland-Letz, T., Höfner, T., Sprick, M., Scharpff, M., Marmé, F., Sinn, H. P., Pantel, K., Weichert, W., & Trumpp, A. (2013). Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature Biotechnology*, 31(6), 539–544. <https://doi.org/10.1038/nbt.2576>
- Bagnoli, M., Canevari, S., & Mezzanzanica, D. (2010). Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: A key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 42, Issue 2, pp. 210–213). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.015>
- Bandaru, S., Zhou, A. X., Rouhi, P., Zhang, Y., Bergo, M. O., Cao, Y., & Akyürek, L. M. (2014). Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis*, 3(9), 119. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.33>
- Bartsch, D. K., Gress, T. M., & Langer, P. (2012). Familial pancreatic cancer - current knowledge. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 9, Issue 8, pp. 445–453). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.111>
- Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J. A., Shimizu, M., Takaori, K., ... Furukawa, T. (2015). A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *American Journal of Surgical Pathology*, 39(12), 1730–1741. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000533>
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 21, Issue 6, pp. 167–223). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)
- Boral, D., Vishnoi, M., Liu, H. N., Yin, W., Sprouse, M. L., Scamardo, A., Hong, D. S., Tan, T. Z., Thiery, J. P., Chang, J. C., & Marchetti, D. (2017). Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis. *Nature Communications*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00196-1>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Journal for Clinicians*, 00(00), 1–31. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brechbuhl, H. M., Vinod-Paul, K., Gillen, A. E., Kopin, E. G., Gibney, K., Elias, A. D., Hayashi, M., Sartorius, C. A., & Kabos, P. (2020). Analysis of circulating breast cancer cell heterogeneity and interactions with peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Carcinogenesis*, 59(10), 1129–1139. <https://doi.org/10.1002/mc.23242>
- Cai, H. Q., Liu, A. S., Zhang, M. J., Liu, H. J., Meng, X. L., Qian, H. P., & Wan, J. H. (2020). Identifying Predictive Gene Expression and Signature Related to Temozolomide Sensitivity of Glioblastomas. *Frontiers in Oncology*, 10, 669. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00669>
- Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Cameron, M. D., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V., Morris, V. L., Groom, A. C., Chambers, A. F., & Macdonald, I. C. (2000). *Temporal Progression of Metastasis in Lung: Cell Survival, Dormancy, and Location Dependence of Metastatic Inefficiency* *Temporal Progression of Metastasis in Lung: Cell Survival, Dormancy, and*. 2541–2546.
- Celià-Terrassa, T., & Kang, Y. (2016). Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes & Development*,

30(8), 892–908. <https://doi.org/10.1101/gad.277681.116>

- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 563–572. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Charles, N. J., Thomas, P., & Lange, C. A. (2010). Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPR/PAQR) in Ovarian Cancer Cells: Implications for Progesterone-Induced Signaling Events. *Hormones and Cancer*, 1(4), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0023-9>
- Chen, Q., Fu, W. J., Tang, X. P., Wang, L., Niu, Q., Wang, S., Lin, Y., Cao, M. F., Hu, R., Wen, H. Y., Wang, Y., Zhang, X., & Yao, X. H. (2021). ADP-Ribosylation factor like GTPase 4C (ARL4C) augments stem-like traits of glioblastoma cells by upregulating ALDH1A3. *Journal of Cancer*, 12(3), 818–826. <https://doi.org/10.7150/jca.45052>
- Chen, X., Zhang, Y., Qian, W., Han, L., Li, W., Duan, W., Wu, Z., Wang, Z., & Ma, Q. (2021). ARL4C promotes the growth and drug resistance of pancreatic cancer by regulating tumor-stromal interactions. *iScience*, 24(12), 103400. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103400>
- Chen, Z., Lei, C., Wang, C., Li, N., Srivastava, M., Tang, M., Zhang, H., Choi, J. M., Jung, S. Y., Qin, J., & Chen, J. (2019). Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics. *Nature Communications*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08004-0>
- Cheng, Y., Lin, L., Li, X., Lu, A., Hou, C., Wu, Q., Hu, X., Zhou, Z., Chen, Z., & Tang, F. (2021). ADAM10 is involved in the oncogenic process and chemo-resistance of triple-negative breast cancer via regulating Notch1 signaling pathway, CD44 and PrPc. *Cancer Cell International*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01727-5>
- Chitty, J. L., Filipe, E. C., Lucas, M. C., Herrmann, D., Cox, T. R., & Timpson, P. (2018). Recent advances in understanding the complexities of metastasis. In *F1000Research* (Vol. 7). <https://doi.org/10.12688/f1000research.15064.1>
- Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., & Biankin, A. V. (2019). Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y>
- Dimitrov-Markov, S., Perales-Pat On, J., Bockorny, B., Dopazo, A., Mu~ Noz, M., Ba~ Nos, N., Bonilla, V., Menendez, C., Duran, Y., Huang, L., Perea, S., Muthuswamy, S. K., Al-Shahrour, F., Lopez-Casas, P. P., & Hidalgo, M. (2020). *Discovery of New Targets to Control Metastasis in Pancreatic Cancer by Single-cell Transcriptomics Analysis of Circulating Tumor Cells*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-1166>
- Du, Y., Xin, Z., Liu, T., Xu, P., Mao, F., & Yao, J. (2021). Overexpressed CA12 has prognostic value in pancreatic cancer and promotes tumor cell apoptosis via NF- κ B signaling. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(5), 1557–1564. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03447-9>
- Effenberger, K. E., Schroeder, C., Hanssen, A., Wolter, S., Eulenburg, C., Tachezy, M., Gebauer, F., Izbicki, J. R., Pantel, K., & Bockhorn, M. (2018). Improved risk stratification by circulating tumor cell counts in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(12), 2844–2850. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0120>
- Fan, C., Miao, Y., Zhang, X., Liu, D., Jiang, G., Lin, X., Han, Q., Luan, L., Xu, Z., & Wang, E. (2014). Btbd7 contributes to reduced E-cadherin expression and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-704>
- Ferlay, J., Partensky, C., & Bray, F. (2016). More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 55(9–10), 1158–1160. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2016.1197419>
- Fico, F., Bousquenaud, M., Rüegg, C., & Santamaria-Martínez, A. (2019). Breast Cancer Stem Cells with Tumor-versus Metastasis-Initiating Capacities Are Modulated by TGFBR1 Inhibition. *Stem Cell Reports*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.05.026>
- Fidler, I. J. (1975). Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo. *Cancer*

Research, 35(1), 218–224.

- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Franses, J. W., Philipp, J., Missios, P., Bhan, I., Liu, A., Yashaswini, C., Tai, E., Zhu, H., Ligorio, M., Nicholson, B., Tassoni, E. M., Desai, N., Kulkarni, A. S., Szabolcs, A., Hong, T. S., Liss, A. S., Fernandez-del Castillo, C., Ryan, D. P., Maheswaran, S., ... Ting, D. T. (2020). Pancreatic circulating tumor cell profiling identifies LIN28B as a metastasis driver and drug target. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17150-3>
- Franssen, B., & Chan, C. (2011). Cáncer de páncreas; el punto de vista del cirujano. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 76(4), 353–361.
- Fujii, S., Matsumoto, S., Nojima, S., Morii, E., & Kikuchi, A. (2015). Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and may represent a novel therapeutic target. *Oncogene*, 34(37), 4834–4844. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.402>
- Ganesh, K., Basnet, H., Kaygusuz, Y., Laughney, A. M., He, L., Sharma, R., O’Rourke, K. P., Reuter, V. P., Huang, Y.-H., Turkekul, M., Er, E. E., Masilionis, I., Manova-Todorova, K., Weiser, M. R., Saltz, L. B., Garcia-Aguilar, J., Koche, R., Lowe, S. W., Pe’er, D., ... Massagué, J. (2020). L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. *Nature Cancer*, 1(1), 28–45. <https://doi.org/10.1038/s43018-019-0006-x>
- Ge, S. X., Son, E. W., & Yao, R. (2018). iDEP: An integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2486-6>
- GLOBOCAN. (2020). *Global cancer observatory*. <https://gco.iarc.fr/>
- Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repěčka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., & Haussler, D. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology*, 38(6), 675–678. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>
- Gomez-Puerto, M. C., Iyengar, P. V., García de Vinuesa, A., ten Dijke, P., & Sanchez-Duffhues, G. (2019). Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. In *Journal of Pathology* (Vol. 247, Issue 1, pp. 9–20). J Pathol. <https://doi.org/10.1002/path.5170>
- Grisard, E., Coan, M., Cesaratto, L., Rigo, I., Zandonà, L., Paulitti, A., Andreuzzi, E., Rampioni Vinciguerra, G. L., Poletto, E., Del Ben, F., Brisotto, G., Biscontin, E., Turetta, M., Dassi, E., Mirnezami, A., Canzonieri, V., Vecchione, A., Baldassarre, G., Mongiat, M., ... Nicoloso, M. S. (2019). Sleeping beauty genetic screen identifies miR-23b::BTBD7 gene interaction as crucial for colorectal cancer metastasis. *EBioMedicine*, 46, 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.044>
- Grützmann, R., Lüttges, J., Sipos, B., Ammerpohl, O., Dobrowolski, F., Alldinger, I., Kersting, S., Ockert, D., Koch, R., Kalthoff, H., Schackert, H. K., Saeger, H. D., Klöppel, G., & Pilarsky, C. (2004). ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2004 90:5, 90(5), 1053–1058. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601645>
- Gundem, G., Van Loo, P., Kremeyer, B., Alexandrov, L. B., Tubio, J. M. C., Papaemmanuil, E., Brewer, D. S., Kallio, H. M. L., Högnäs, G., Annala, M., Kivinummi, K., Goody, V., Latimer, C., O’Meara, S., Dawson, K. J., Isaacs, W., Emmert-Buck, M. R., Nykter, M., Foster, C., ... Bova, G. S. (2015). The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*, 520(7547), 353–357. <https://doi.org/10.1038/nature14347>
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. In *Cell* (Vol. 127, Issue 4, pp. 679–695). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell*, 100, 57–70. https://ac.els-cdn.com/S0092867400816839/1-s2.0-S0092867400816839-main.pdf?_tid=6395a6ff-ad78-4294-b771-89e143c5c293&acdnat=1520984046_7402cfa8a622022a227f56a255544d06

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011a). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011b). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haoyuan, M. A., & Yanshu, L. I. (2020). Structure, regulatory factors and cancer-related physiological effects of ADAM9. *Cell Adhesion & Migration*, *14*(1), 165. <https://doi.org/10.1080/19336918.2020.1817251>
- Hosoda, W., Chianchiano, P., Griffin, J. F., Pittman, M. E., Brosens, L. A. A., Noë, M., Yu, J., Shindo, K., Suenaga, M., Rezaee, N., Yonescu, R., Ning, Y., Albores-Saavedra, J., Yoshizawa, N., Harada, K., Yoshizawa, A., Hanada, K., Yonehara, S., Shimizu, M., ... Wood, L. D. (2017). Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *Journal of Pathology*, *242*(1), 16–23. <https://doi.org/10.1002/path.4884>
- Hunter, K. W., Wakefield, L., Amin, R., Deasy, S., & Ha, N.-H. (2018). Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity. *Nature Publishing Group*, *18*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.126>
- Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J. M., Padovani, B., Mouroux, J., Marquette, C. H., & Hofman, P. (2014). "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with Chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE*, *9*(10), 4–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111597>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 119, Issue 6, pp. 1420–1428). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kulemann, B., Rösch, S., Seifert, S., Timme, S., Bronsert, P., Seifert, G., Martini, V., Kuvendjiska, J., Glatz, T., Hussung, S., Fritsch, R., Becker, H., Pitman, M. B., & Hoepfner, J. (2017). Pancreatic cancer: Circulating Tumor Cells and Primary Tumors show Heterogeneous KRAS Mutations. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04601-z>
- Kunovsky, L., Tesarikova, P., Kala, Z., Kroupa, R., Kysela, P., Dolina, J., & Trna, J. (2018). *The Use of Biomarkers in Early Diagnostics of Pancreatic Cancer*. <https://doi.org/10.1155/2018/5389820>
- Labelle, M., Begum, S., & Hynes, R. O. (2011). Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*, *20*(5), 576–590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>
- Labelle, M., & Hynes, R. O. (2012). The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. In *Cancer Discovery* (Vol. 2, Issue 12, pp. 1091–1099). American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0329>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. In *Cell* (Vol. 168, Issue 4, pp. 670–691). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Lang, J. E., Ring, A., Porras, T., Kaur, P., Forte, V. A., Mineyev, N., Tripathy, D., Press, M. F., & Campo, D. (2018). RNA-Seq of Circulating Tumor Cells in Stage II–III Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, *25*(8), 2261–2270. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6540-4>
- Lawson, D. A., Bhakta, N. R., Kessenbrock, K., Prummel, K. D., Yu, Y., Takai, K., Zhou, A., Eyob, H., Balakrishnan, S., Wang, C., Yaswen, P., Goga, A., & Werb, Z. (2015). *Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells*. <https://doi.org/10.1038/nature15260>
- Li, H., Liu, X., Jiang, S., Zhou, X., Yao, L., Di, Y., Jiang, Y., Gu, J., Mao, Y., Li, J., Jin, C., Yang, P., & Fu, D. (2020). WD repeat-containing protein 1 maintains β -Catenin activity to promote pancreatic cancer aggressiveness. *British Journal of Cancer*, *123*(6), 1012–1023. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0929-0>
- Li, J., Choi, P. S., Chaffer, C. L., Labelle, K., Hwang, J. H., Giacomelli, A. O., Kim, J. W., Ilic, N., Doench, J. G., Ly, S. H., Dai, C., Hagel, K., Hong, A. L., Gjoerup, O., Goel, S., Ge, J. Y., Root, D. E., Zhao, J. J., Brooks, A. N., ... Hahn, W. C. (2018). An alternative splicing switch in FLNB promotes the mesenchymal cell state in human breast cancer.

ELife, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.37184>

- Li, T., Guo, T., Liu, H., Jiang, H., & Wang, Y. (2021). Platelet-derived growth factor-BB mediates pancreatic cancer malignancy via regulation of the Hippo/Yes-associated protein signaling pathway. *Oncology Reports*, 45(1), 83–94. <https://doi.org/10.3892/OR.2020.7859>
- Li, Y., Lei, B., Zou, J., Wang, W., Chen, A., Zhang, J., Fu, Y., & Li, Z. (2019). High expression of carbonic anhydrase 12 (CA12) is associated with good prognosis in breast cancer. *Neoplasma*, 66(3), 420–426. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180819N624
- Liu, X., Li, C., Li, J., Yu, T., Zhou, G., Cheng, J., Li, G., Zhou, Y., Lou, W., Wang, X., Gong, G., Liu, L., & Chen, Y. (2018). Detection of CTCs in portal vein was associated with intrahepatic metastases and prognosis in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Cancer*, 9(11), 2038–2045. <https://doi.org/10.7150/jca.23989>
- Lucotti, S., & Muschel, R. J. (2020). Platelets and Metastasis: New Implications of an Old Interplay. *Frontiers in Oncology*, 0, 1350. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01350>
- Luebke, T., Schwarz, L., Beer, Y. Y., Schumann, S., Misterek, M., Sander, F. E., Plaza-Sirvent, C., & Schmitz, I. (2019). c-FLIP and CD95 signaling are essential for survival of renal cell carcinoma. *Cell Death and Disease*, 10(6), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1609-y>
- Luo, F. Y., Liu, Z. H., Hu, Q. H., Lin, G. Q., Tang, C. E., Zhang, W. X., & Zhuang, W. (2015). Association of BTBD7 with metastasis and poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Journal of Cancer*, 6(5), 477–481. <https://doi.org/10.7150/jca.11715>
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 865–873. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3)
- Ma, H. R., Cao, L., Wang, F., Cheng, C., Jiang, R., Zhou, H., Xie, Z., Wuermanbieke, S., & Qian, Z. (2020). Filamin B extensively regulates transcription and alternative splicing, and is associated with apoptosis in HeLa cells. *Oncology Reports*, 43(5), 1536–1546. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7532>
- Marin-Muller, C., Li, D., Bharadwaj, U., Li, M., Chen, C., Hodges, S. E., Fisher, W. E., Mo, Q., Hung, M. C., & Yao, Q. (2013). A tumorigenic factor interactome connected through tumor suppressor MicroRNA-198 in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(21), 5901–5913. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3776>
- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Matsumoto, S., Fujii, S., & Kikuchi, A. (2017). JB special review - Wnt signaling: Biological functions and its implications in diseases: Arl4c is a key regulator of tubulogenesis and tumourigenesis as a target gene of Wnt - β -catenin and growth factor - Ras signalling. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 161, Issue 1, pp. 27–35). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw069>
- McFadden, D. G., Papagiannakopoulos, T., Taylor-Weiner, A., Stewart, C., Carter, S. L., Cibulskis, K., Bhutkar, A., McKenna, A., Dooley, A., Vernon, A., Sougnez, C., Malstrom, S., Heimann, M., Park, J., Chen, F., Farago, A. F., Dayton, T., Shefler, E., Gabriel, S., ... Jacks, T. (2014). Genetic and clonal dissection of murine small cell lung carcinoma progression by genome sequencing. *Cell*, 156(6), 1298–1311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.031>
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. In *Cell* (Vol. 168, Issue 4, pp. 613–628). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>

- Menyhart, O., Weltz, B., & Györfy, B. (2021). MultipleTesting.com: A tool for life science researchers for multiple hypothesis testing correction. *PLOS ONE*, *16*(6), e0245824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245824>
- Mimori, K., Fukagawa, T., Kosaka, Y., Kita, Y., Ishikawa, K., Etoh, T., Linuma, H., Sasako, M., & Mori, M. (2008). Hematogenous metastasis in gastric cancer requires isolated tumor cells and expression of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Clinical Cancer Research*, *14*(9), 2609–2616. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4354>
- Miyamoto, D. T., Zheng, Y., Wittner, B. S., Lee, R. J., Zhu, H., Broderick, K. T., Desai, R., Fox, D. B., Brannigan, B. W., Trautwein, J., Arora, K. S., Desai, N., Dahl, D. M., Sequist, L. V., Smith, M. R., Kapur, R., Wu, C. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., ... Haber, D. A. (2015). RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science*, *349*(6254), 1351–1356. <https://doi.org/10.1126/science.aab0917>
- Mueller, A. C., Piper, M., Goodspeed, A., Bhuvane, S., Williams, J. S., Bhatia, S., Phan, A. V., van Court, B., Zolman, K. L., Peña, B., Oweida, A. J., Zakem, S., Meguid, C., Knitz, M. W., Darragh, L., Bickett, T. E., Gadwa, J., Mestroni, L., Taylor, M. R. G., ... Karam, S. D. (2021). Induction of ADAM10 by radiation therapy drives fibrosis, resistance, and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer Research*, *81*(12), 3255–3269. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3892>
- Nagy, Á., Munkácsy, G., & Györfy, B. (2021). Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. *Scientific Reports*, *11*(1), 6047. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84787-5>
- National Cancer Institute. NIH. (n.d.). *What Is Cancer? - National Cancer Institute*. Retrieved August 12, 2018, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). EMT: 2016. In *Cell* (Vol. 166, Issue 1, pp. 21–45). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Oria, V. O., Lopatta, P., Schmitz, T., Preca, B. T., Nyström, A., Conrad, C., Bartsch, J. W., Kulemann, B., Hoepfner, J., Maurer, J., Bronsert, P., & Schilling, O. (2019). ADAM9 contributes to vascular invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Oncology*, *13*(2), 456. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12426>
- Padmanaban, V., Krol, I., Suhail, Y., Szczerba, B. M., Aceto, N., Bader, J. S., & Ewald, A. J. (2019). E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, *573*(7774), 439–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1526-3>
- Padmanabhan, J. (2016). ADAM10 Proteases and Pancreatic Cancer. *Pancreas - Open Journal*, *1*(2), e8–e10. <https://doi.org/10.17140/poj-1-e003>
- Padua, D., Zhang, X. H. F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., & Massagué, J. (2008). TGFβ Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell*, *133*(1), 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.046>
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C. S., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J. A., Bescós, C., Croce, L. Di, & Benitah, S. A. (2017). Article Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature Publishing Group*, *541*(7635), 41–45. <https://doi.org/10.1038/nature20791>
- Pompella, L., Tirino, G., Pappalardo, A., Caterino, M., Ventriglia, A., Nacca, V., Orditura, M., Ciardiello, F., & De Vita, F. (2020). Pancreatic cancer molecular classifications: From bulk genomics to single cell analysis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082814>
- Reid, A. L., Millward, M., Pearce, R., Lee, M., Frank, M. H., Ireland, A., Monshizadeh, L., Rai, T., Heenan, P., Medic, S., Kumarasinghe, P., & Ziman, M. (2013). Markers of circulating tumour cells in the peripheral blood of patients with melanoma correlate with disease recurrence and progression. *British Journal of Dermatology*, *168*(1), 85–92. <https://doi.org/10.1111/bjd.12057>
- Reymond, N., D'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. In *Nature*

Reviews Cancer (Vol. 13, Issue 12, pp. 858–870). <https://doi.org/10.1038/nrc3628>

- Rhim, A. D., Thege, F. I., Santana, S. M., Lannin, T. B., Saha, T. N., Tsai, S., Maggs, L. R., Kochman, M. L., Ginsberg, G. G., Lieb, J. G., Chandrasekhara, V., Drebin, J. A., Ahmad, N., Yang, Y. X., Kirby, B. J., & Stanger, B. Z. (2014). Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology*, *146*(3), 647–651. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.007>
- Riva, G., Pea, A., Pilati, C., Fiadone, G., Lawlor, R. T., Scarpa, A., & Luchini, C. (2018). Histo-molecular oncogenesis of pancreatic cancer: From precancerous lesions to invasive ductal adenocarcinoma. In *World Journal of Gastrointestinal Oncology* (Vol. 10, Issue 10, pp. 317–327). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v10.i10.317>
- Safa, A. R., & Pollok, K. E. (2011). Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. *Cancers*, *3*(2), 1639. <https://doi.org/10.3390/CANCERS3021639>
- Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, K. K., Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2013). Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor. *Cancer Cell*, *24*(1), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.008>
- Sergeant, G., van Eijdsden, R., Roskams, T., Van Duppen, V., & Topal, B. (2012). Pancreatic cancer circulating tumour cells express a cell motility gene signature that predicts survival after surgery. *BMC Cancer*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-527>
- Shergalis, A. G., Hu, S., Bankhead, A., & Neamati, N. (2020). Role of the ERO1-PDI interaction in oxidative protein folding and disease. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 210). Pharmacol Ther. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107525>
- Singh, M., Manoranjan, B., Mahendram, S., & Mcfarlane, N. (2014). *Brain Metastasis-Initiating Cells: Survival of the Fittest*. 9117–9133. <https://doi.org/10.3390/ijms15059117>
- Sinreih, M., Knific, T., Thomas, P., Frković Grazio, S., & Rižner, T. L. (2018). Membrane progesterone receptors β and γ have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *178*, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.011>
- Spiegel, A., Brooks, M. W., Houshyar, S., Reinhardt, F., Ardolino, M., Fessler, E., Chen, M. B., Krall, J. A., Decock, J., Zervantonakis, I. K., Iannello, A., Iwamoto, Y., Cortez-Retamozo, V., Kamm, R. D., Pittet, M. J., Raulet, D. H., & Weinberg, R. A. (2016). Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discovery*, *6*(6), 630–649. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1157>
- Stathis, A., & Moore, M. J. (2010). Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *7*(3), 163–172. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.236>
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., Pasparakis, M., & Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, *536*(7615), 215–218. <https://doi.org/10.1038/nature19076>
- Sun, X., Wang, Y., Ma, R., & Li, W. (2017). Clinical significance of ADAM10 and ADAM17 in gastric and colorectal cancers: A systematic review and meta-analysis. In *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* (Vol. 10, Issue 4, pp. 5941–5948). www.ijcem.com/
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, *2*(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Ting, D. T., Wittner, B. S., Ligorio, M., Vincent Jordan, N., Shah, A. M., Miyamoto, D. T., Aceto, N., Bersani, F., Brannigan, B. W., Xega, K., Ciciliano, J. C., Zhu, H., MacKenzie, O. C., Trautwein, J., Arora, K. S., Shahid, M., Ellis, H. L., Qu, N., Bardeesy, N., ... Haber, D. A. (2014). Single-cell RNA sequencing identifies extracellular matrix gene expression by pancreatic circulating tumor cells. *Cell Reports*, *8*(6), 1905–1918. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.029>

- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P. G., Weir, B. A., Kryukov, G., Cowley, G. S., Gill, S., Harrington, W. F., Pantel, S., Krill-Burger, J. M., Meyers, R. M., Ali, L., Goodale, A., Lee, Y., Jiang, G., Hsiao, J., Gerath, W. F. J., Howell, S., Merkel, E., ... Hahn, W. C. (2017). Defining a Cancer Dependency Map. *Cell*, *170*(3), 564–576.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>
- Twomey, J. D., & Zhang, B. (2019). Circulating tumor cells develop resistance to TRAIL-induced apoptosis through autophagic removal of death receptor 5: Evidence from an in vitro model. *Cancers*, *11*(1), 94. <https://doi.org/10.3390/cancers11010094>
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. In *Cell* (Vol. 147, Issue 2, pp. 275–292). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- Vergara, D., Ravaoli, S., Fonzi, E., Adamo, L., Damato, M., Bravaccini, S., Pirini, F., Gaballo, A., Barbano, R., Pasculli, B., Franck, J., Fournier, I., Salzet, M., & Maffia, M. (2020). Carbonic anhydrase XII expression is modulated during epithelial mesenchymal transition and regulated through protein kinase c signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 715. <https://doi.org/10.3390/ijms21030715>
- Wan, L., Pantel, K., & Kang, Y. (2013). Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature Medicine*, *19*(11), 1450–1464. <https://doi.org/10.1038/nm.3391>
- Wang, S. M., Tie, J., Wang, W. L., Hu, S. J., Yin, J. P., Yi, X. F., Tian, Z. H., Zhang, X. Y., Li, M. Bin, Li, Z. S., Nie, Y. Z., Wu, K. C., & Fan, D. M. (2016). POU2F2-oriented network promotes human gastric cancer metastasis. *Gut*, *65*(9), 1427–1438. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308932>
- Wang, Y., Guo, H., Zhang, Z., Wang, Q., Tian, X., & Yang, Y. (2021). Inhibition of bone morphogenetic protein receptor 2 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma growth by regulating GRB2/ PI3K/AKT axis. *Annals of Translational Medicine*, *9*(7), 557–557. <https://doi.org/10.21037/atm-20-2194>
- Weinberg, R. A. (2013). *The Biology of Cancer* (2nd ed., Vol. 53, Issue 9). Garland Science. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wilson, T. R., McLaughlin, K. M., McEwan, M., Sakai, H., Rogers, K. M. A., Redmond, K. M., Johnston, P. G., & Longley, D. B. (2007). c-FLIP: A key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer Research*, *67*(12), 5754–5762. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3585>
- Wolf, M. J., Hoos, A., Bauer, J., Boettcher, S., Knust, M., Weber, A., Simonavicius, N., Schneider, C., Lang, M., Stürzl, M., Croner, R. S., Konrad, A., Manz, M. G., Moch, H., Aguzzi, A., van Loo, G., Pasparakis, M., Prinz, M., Borsig, L., & Heikenwalder, M. (2012). Endothelial CCR2 Signaling Induced by Colon Carcinoma Cells Enables Extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK Pathway. *Cancer Cell*, *22*(1), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.023>
- Woo, D., & Yu, M. (2018). Circulating tumor cells as “liquid biopsies” to understand cancer metastasis. In *Translational Research* (Vol. 201, pp. 128–135). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.003>
- Wood, L. D., & Hruban, R. H. (2012). Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. In *Cancer Journal (United States)* (Vol. 18, Issue 6, pp. 492–501). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31827459b6>
- Wood, L. D., Yurgelun, M. B., & Goggins, M. G. (2019). Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, *156*(7), 2041–2055. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.039>
- World Health Organization. (2019). *Global health estimates: Leading causes of death*. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
- Yachida, S., & Lacobuzio-Donahue, C. A. (2009). The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. In *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* (Vol. 133, Issue 3, pp. 413–422). <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.3.413>
- Yadavalli, S., Jayaram, S., Manda, S. S., Madugundu, A. K., Nayakanti, D. S., Tan, T. Z., Bhat, R., Rangarajan, A.,

- Chatterjee, A., Gowda, H., Thiery, J. P., & Kumar, & P. (2017). Data-Driven Discovery of Extravasation Pathway in Circulating Tumor Cells. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep43710>
- Yang, J., Lin, P., Yang, M., Liu, W., Fu, X., Liu, D., Tao, L., Huo, Y., Zhang, J., Hua, R., Zhang, Z., Li, Y., Wang, L., Xue, J., Li, H., & Sun, Y. (2021). Integrated genomic and transcriptomic analysis reveals unique characteristics of hepatic metastases and pro-metastatic role of complement C1q in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genome Biology*, *22*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02222-w>
- Yang, L., Li, N., Xue, Z., Liu, L. R., Li, J., Huang, X., Xie, X., Zou, Y., Tang, H., & Xie, X. (2020). Synergistic therapeutic effect of combined PDGFR and SGK1 inhibition in metastasis-initiating cells of breast cancer. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0485-4>
- Yeo, T. P., Hruban, R. H., Leach, S. D., Wilentz, R. E., Sohn, T. A., Kern, S. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Goggins, M., Canto, M. I., Abrams, R. A., Laheru, D., Jaffee, E. M., Hidalgo, M., & Yeo, C. J. (2002). Pancreatic cancer. *Current Problems in Cancer*, *26*(4), 176–275. <https://doi.org/10.1067/mcn.2002.129579>
- Yeung, K. T., & Yang, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology*, *11*(1), 28–39. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12017>
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., Isakoff, S. J., Ciciliano, J. C., Wells, M. N., Shah, A. M., Concannon, K. F., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, *339*(6119), 580–584. <https://doi.org/10.1126/science.1228522>
- Yu, M., Ting, D. T., Stott, S. L., Wittner, B. S., Ozsolak, F., Paul, S., Ciciliano, J. C., Smas, M. E., Winokur, D., Gilman, A. J., Ulman, M. J., Xega, K., Contino, G., Alagesan, B., Brannigan, B. W., Milos, P. M., Ryan, D. P., Sequist, L. V., Bardeesy, N., ... Haber, D. A. (2012). RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature*, *487*(7408), 510–513. <https://doi.org/10.1038/nature11217>
- Zeinali, M., Murlidhar, V., Fouladdel, S., Shao, S., Zhao, L., Cameron, H., Bankhead, A., Shi, J., Cuneo, K. C., Sahai, V., Azizi, E., Wicha, M. S., Hafner, M., Simeone, D. M., & Nagrath, S. (2018). Profiling Heterogeneous Circulating Tumor Cells (CTC) Populations in Pancreatic Cancer Using a Serial Microfluidic CTC Carpet Chip. *Advanced Biosystems*, *2*(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800228>
- Zhang, D., Wan, L., Yang, F., Liu, W., Liu, L., He, S., & Xie, N. (2020). VWCE Functions as a Tumor Suppressor in Breast Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.586342>
- Zhang, J., Yang, J., Lin, C., Liu, W., Huo, Y., Yang, M., Jiang, S. H., Sun, Y., & Hua, R. (2020). Endoplasmic reticulum stress-dependent expression of ero1l promotes aerobic glycolysis in pancreatic cancer. *Theranostics*, *10*(18), 8400–8414. <https://doi.org/10.7150/thno.45124>
- Zheng, L., Hu, F., Li, J., Wang, Z., Deng, L., Xiao, B., Li, J., & Lei, X. (2018). WDR1 predicts poor prognosis and promotes cancer progression in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *11*(12), 5682. [/pmc/articles/PMC6963092/](https://doi.org/10.1155/2018/5682)
- Zilli, F., Marques Ramos, P., Auf der Maur, P., Jehanno, C., Sethi, A., Coissieux, M.-M., Eichlisberger, T., Sauteur, L., Rouchon, A., Bonapace, L., Pinto Couto, J., Rad, R., Jensen, M. R., Banfi, A., Stadler, M. B., & Bentires-Alj, M. (2021). The NFIB-ERO1A axis promotes breast cancer metastatic colonization of disseminated tumour cells. *EMBO Molecular Medicine*, *13*(4), e13162. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013162>